Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Caractérisation du stress oxydant chez le crabe chinois Eriocheir sinensis exposé au cadmium: systèmes antioxydants impliqués dans le processus d'acclimatation

Berlage, Laure

Award date:
2006

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 04. May. 2024

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

CARACTERISATION DU STRESS OXYDANT CHEZ LE CRABE CHINOIS *ERIOCHEIR SINENSIS* EXPOSE AU CADMIUM. SYSTEMES ANTIOXYDANTS IMPLIQUES DANS LE PROCESSUS D'ACCLIMATATION

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de

licencié en Sciences biologiques

Laure BERLAGE
Septembre 2006

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Caractérisation du stress oxydant chez le crabe chinois *Eriocheir sinensis* exposé au cadmium. Systèmes antioxydants impliqués dans le processus d'acclimatation

BERLAGE Laure

Résumé

La résistance des organismes aquatiques à des concentrations élevées en cadmium peut être augmentée chez des individus chroniquement exposés à ce métal. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans ce processus d'acclimatation chez le crabe chinois *Eriocheir sinensis*, nous avons caractérisé le stress oxydant dans différents tissus après une exposition aiguë (500 µg Cd/l pendant 3 jours), chronique (10 ou 50 µg Cd/l pendant 30 jours) ou chronique suivie directement par une contamination aiguë. La peroxydation des lipides LPO ne présente pas d'augmentation significative dans aucune condition ni dans aucun organe étudié (hépatopancréas, branchies antérieures et postérieures). Les branchies antérieures sont les organes les plus sensibles au cadmium. Dans celles-ci, une augmentation significative des niveaux de glutathion total GSH a été observée après des expositions chroniques et aiguës (214,1 ± 243,3 nmol GSH/g tissu et 855,1 ± 643,1 nmol GSH/g tissu) par rapport au groupe contrôle (45,1 ± 72,0 nmol GSH/g tissu). Chez ces mêmes individus, nous remarquons également une augmentation significative de l'activité de la glutathion S-transférase GST (74,4 ± 20 nmolCDNB/min/mg prot et 103,7 ± 35,98 nmolCDNB/min/mg prot contre 38,5 ± 20,3 nmolCDNB/min/mg prot pour le groupe contrôle). L'activité de la glutathion peroxydase GPx augmente de façon significative uniquement en condition aiguë (5,9 ± 2,3 nmol NADPH/min/mg prot contre 2,3 ± 1,8 nmol NADPH/min/mg prot pour le groupe contrôle). Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour la glutathion réductase GR, la catalase CAT et la superoxyde dismutase SOD. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé l'analyse protéomique dans le but de déceler d'éventuelles protéines carbonylées par la méthode des gels 2D. Une dérivatization au DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) et l'utilisation d'anticorps spécifiques ont permis de détecter les groupements carbonyles de ces protéines. Ainsi, nous avons pu observer qu'une exposition au cadmium augmente le degré de carbonylation des protéines au sein des branchies antérieures. Ce travail suggère que le cadmium induit un stress oxydant complexe dans les branchies du crabe chinois. Le type d'exposition (aiguë ou chronique) appelle des réponses différentes. Ainsi, le GSH total et la GST agiraient en première ligne de défense mais également dans une défense à long terme et expliqueraient en partie une résistance accrue au cadmium. Par contre la GPx interviendrait uniquement dans une réponse rapide et à court terme.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2006

Promoteur : P. Kestemont

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - http://www.fundp.ac.be/fundp.html

Oxidative stress in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Antioxidative systems explaining acclimation

BERLAGE Laure

Abstract

An increase resistance to an elevated cadmium exposure can be observed in aquatic organisms chronically exposed to this metal. In order to investigate mechanisms involved in acclimation process in the Chinese crab *Eriocheir sinensis*, we characterised the oxidative stress status in different tissues after direct acute exposure (500 µg Cd/l for 3 days), chronic (10 or 50 µg Cd/l for 30 days) or chronic, immediately followed by acute, exposure. Lipid peroxidation LPO did not show any significant increase in any conditions nor in any studied organs (hepatopancreas, anterior and posterior gills). Anterior gills are the most sensitive organs to cadmium. In these gills, a significant increase of total glutathion GSH level was observed after acute and chronic exposure (214,1 ± 243,3 nmol GSH/g tissu and 855,1 ± 643,1 nmol GSH/g tissue) compared to controls (45,1 ± 72,0 nmol GSH/g tissue). In the same crabs, we also observed a significant increase of the glutathione S-transferase GST activity (74,4 ± 20 nmolCDNB/min/mg prot and 103,7 ± 35,98 nmolCDNB/min/mg prot against 38,5 ± 20,3 nmolCDNB/min/mg prot for controls). Activity of glutathione peroxidase GPx increased significantly only after acute contamination (5,9 ± 2,3 nmol NADPH/min/mg prot against 2,3 ± 1,8 nmol NADPH/min/mg prot for controls). On the other hand, no significant difference was shown for glutathione reductase GR, catalase CAT and superoxide dismutase SOD. Secondly, we used proteomic analysis to point out possible oxidized proteins using 2D gels. DNPH derivatization and specific antibodies allowed the detection of carbonyl groups on proteins. By this mean, we observed that cadmium increases the degree of protein carbonylation in anterior gills. The present work demonstrates that cadmium induces a complex oxidative stress in Chinese crab gills. Different responses occur depending on the type of exposure (acute or chronic). Thus, GSH and GST would act in short and long term defence against cadmium exposure and would partly explain increased resistance to this metal. On the contrary, GPx would take place only in rapid and short term response.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2006

Promoteur: P.Kestemont

Remerciements

Un tout grand merci à tous qui m'avez aidé de loin ou de près à la réalisation de ce travail.

Merci au Professeur Patrick Kestemont pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire au sein de son unité

Merci au Docteur Frédéric Silvestre pour ses conseils et son aide judicieuse, mais également pour tous les moments de chouette conversation

Merci à Marie-Claire Forget pour son aide au labo et les longues discussions

Merci à Virginie pour les réponses aux questions souvent posées et pour la bonne ambiance au sein de l'unité

Merci à Fatima pour les fous rires

Merci à Marie-Aline, Annerick, Jenny, Nathalie, Pierre-Yves, Caro, greg et Thibault pour ces deux années en URBO ; merci aux deux matchos du Jura ainsi qu'à André et Anne-Laure

Merci à Sév, Dédé, Aurélie, Raphi, Blandine et tous les autres de bio pour ces 4 merveilleuses années

Merci à Papa, maman pour m'avoir permis de réaliser ce que j'aime
A Pauline, Claire et Juliane d'être là, toujours à mes cotés

Merci à toi à Xa de vivre mes folies et mes tempêtes…

Liste des abréviations

ADN – acide désoxyribonucléique
Ag – argent
APS –
BCS – *bathocuproine disulfonic acid*
Ca – calcium
CAT – catalase
Cd – cadmium
CDNB – 1-chloro-2,-dinitrobenzène
CHAPS – 3-3((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate
Cl – chlore
Cu – cuivre
DNP – 2,4-dinitrophényl hydrazone
DNPH – 2,4-dinitrophénylhydrazine
DTNB – 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)
DTT – dithiothreitol
ECL – chémiluminescence
EDTA – *étylenediaminetétraacetic acid*
GPx – glutathion peroxydase
GR – glutathion réductase
GSH – glutathion réduit ou gamma-glutamylcysteinylglycine
GSSG – glutathion oxydé
GST – glutathion S-transférase
H_2O_2 – peroxyde d'hydrogène
HAPs – hydrocarbures aromatiques polycycliques
Hg – mercure
IEF – focalisation isoélectrique (*iso-electric focusing*)
IPG – gradient de pH immobilisé (*immobilized pH gradient*)
LOOHs – hydroperoxydes lipidiques
LPO- peroxydation des lipides
MDA – malondialdéhyde
mM – millimolaire
MTs – métallothionéines
Na – sodium
$NADP^+$- nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH – nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite
NBT – *nitroblue tétrazolium*
NH_4 – ammonium
nmol – nanomole
NO_2 – nitrite
NO_3 – nitrate
$O_2^{\cdot -}$ – anion superoxyde
OH^- – radical hydroxyle
PDI – protéine disulfure isomérase
ROH – alcool
ROOHs – peroxydes organiques
ROS – espèce réactive de l'oxygène

SAB – sérum albumine bovine
SDS – sodium dodécyl sulfate
SOD- superoxyde dismutase
SSA – acide 5-sulphosalicylique
TBA – acide thiobarbiturique
TBARS – *thiobarbituric acid reactive substance*
TCA – acide trichloroacétique
TEMED – tétraméthylène diamine
$TiOSO_4$ – oxysulfate de titane
Tris – Tris-(hydroxyméthylamino-méthane)
U – unité
Zn – zinc

Table des matières

I. Introduction **1**
1. Le modèle biologique : le crabe chinois Eriocheir sinensis 1
1.1. Introduction 1
1.1.1. Caractéristiques générales 1
1.1.2. Distribution et abondance 2
1.1.3. Impacts de l'introduction du crabe chinois 2
1.2. Physiologie branchiale 3
1.2.1. Branchies antérieures 3
1.2.2. Branchies postérieures 3

2. Le Cadmium 4
2.1. Introduction 4
2.1.1. Propriétés et utilisations 4
2.1.2. Exposition et pollution 5
A. Pollution atmosphérique 5
B. Pollution des sols 5
C. Pollution du milieu aquatique 5
2.2. Toxicité du cadmium 6
2.2.1. Introduction 6
A. Voie d'entrée du cadmium 6
B. Stockage 6
C. Excrétion 7
2.2.2. Modes d'action 7

3. Notion de stress oxydant 7
3.1. Espèces réactives à l'oxygène 8
3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène et leurs sources 8
3.1.2. Dommages cellulaires des ROS 8
3.1.3. Oxydation des protéines 9
A. Introduction 9
B. Modifications réversibles et irréversibles 9
C. Identification des groupements carbonyles 10
3.2. Systèmes de défense 11
3.2.1. Systèmes enzymatiques 11
3.2.2. Systèmes non enzymatiques 12
3.3. Biomarqueurs en écotoxicologie 13
3.3.1. Types de biomarqueurs 13
3.3.2. Rôles des biomarqueurs Réponse stress 13
3.3.3. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques 13
A. Activités antioxydantes chez les animaux aquatiques 13
B. Réponses des animaux aquatiques au stress oxydant dû aux contaminants de l'environnement 14
C. Réponses des crustacés brachyoures à divers contaminants de l'environnement 14
3.4. Induction d'un stress oxydant suite à une exposition au cadmium 15

4. Acclimatation suite à un stress provoqué par un xénobiotique 15
4.1. Exposition chronique et aiguë 15
4.2. Processus d'acclimatation 16
4.2.1. Acclimatation et cadmium 17
4.2.2. Mécanismes conférant une résistance accrue à des xénobiotiques 17
4.2.3. Coûts d'une résistance à des xénobiotiques 18

6. Objectifs 20

II. Matériel et méthodes 21
1. Choix du modèle d'étude 21

2. Capture et acclimatation 21

3. Contamination 21

4. Dissection 22

5. Dosage de l'osmolalité 22

6. Dosage des biomarqueurs de stress oxydant 23
6.1. Préparation des échantillons et homogénéisation 23
6.2. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO) 23
6.3. Dosage du glutathion total (GSH) 24
6.4. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx) 24
6.5. Dosage de la glutathion réductase (GR) 24
6.6. Dosage de la glutathion S-transférase (GST) 25
6.7. Dosage de la catalase (CAT) 25
6.8. Dosage de la superoxyde dismutase totale (SOD) 26
6.9. Dosage des protéines par la méthode de Lowry 26

7. Analyse protéomique 26
7.1. Préparation des échantillons et homogénéisation 27
7.2. Electrophorèse en IEF 27
7.3. Marquage au DNPH (dérivatization) 27
7.4. Equilibration et 2D 28
7.5. Western-Blot 28
7.6. Marquage aux anticorps anti-DNP/HRP 29
7.7. Révélation 29
7.8. Coloration du gel à l'argent 29
7.9. Dosage des protéines par la méthode Bradford 30

8. Traitement statistique des données 30

III. Résultats 31
1. Température de l'eau et oxygène dissous lors des contaminations chroniques et aiguës 31
1.1. Rappel du protocole expérimental 31

1.2. Température de l'eau 31
1.3. Oxygène dissous 32

2. Effet d'une contamination chronique et aiguë au cadmium sur l'osmolalité et le taux de survie 32
2.1. Osmolalité 32
2.2. Taux de survie 33

3. Dosage des biomarqueurs de stress oxydant 33
3.1. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO) 33
3.2. Dosage du glutathion total (GSH) 35
3.3. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx) 37
3.4. Dosage de la glutathion réductase (GR) 38
3.5. Dosage de la glutathion S-transférase (GST) 39
3.6. Dosage de la catalase (CAT) 41
2.7. Dosage de la superoxyde dismutase totale (SOD) 42

4. Approche protéomique 43
4.1. Rappel du protocole expérimental et objectif de l'analyse 43
4.2. Carbonylation des protéines 43

IV. Discussion, conclusions et perspectives 45
1. Le cadmium engendre des modifications de l'osmolalité 45
2. Les branchies antérieures sont les organes les plus sensibles au cadmium 46
3. Le cadmium induit un stress oxydant 47
4. Une exposition aiguë au cadmium induit l'augmentation des activités ou des concentrations de GSH, GPx et GST 48
5. Une exposition chronique au cadmium peut induire un processus d'acclimatation, mais quels en sont les mécanismes ? 50
6. Le sexe des individus pourrait intervenir sur l'état de stress oxydant dû au cadmium au sein des branchies antérieures 52
7. Le cadmium induit peu d'effets sur l'état de stress oxydant au niveau de l'hépatopancréas (HP) et des branchies postérieures (BP) 53
8. La GR, CAT et SOD ne sont pas de bons biomarqueurs d'une contamination au cadmium 54
9. Discussion de l'utilisation de l'analyse protéomique en écotoxicologie 55
10. Conclusions 56

Bibliographie 58

Première partie :
INTRODUCTION

Figure I.1. Crabe chinois *Eriocheir sinensis*

Introduction

Beaucoup de cours d'eau, y compris les fleuves belges, sont pollués par des déchets agricoles, industriels et domestiques. Ces déchets comprennent généralement une grande variété de polluants organiques et inorganiques incluant les huiles, les graisses, les plastiques, les phénols, les métaux lourds et les particules solides en suspension. Cet incroyable déversement de produits mène inévitablement à des perturbations environnementales pouvant être considérées comme des sources de stress potentielles pour les communautés biotiques.
Le contact constant des organismes avec divers contaminants présents dans leur milieu de vie est susceptible de mener à un processus d'acclimatation, défini comme une augmentation de la tolérance des individus exposés à une concentration élevée, généralement létale d'une substance toxique, suite à une exposition chronique à une concentration sublétale de cette même substance (McDonagh et Wood, 1993).
Parmi les métaux lourds, l'accumulation de cadmium dans les cours d'eau peut être responsable d'une importante augmentation d'espèces réactives de l'oxygène dans les tissus des invertébrés et vertébrés aquatiques. Suite à cela, les organismes mettent en place des systèmes de défense pour contrer les dommages d'un stress oxydant (attaque des constituants cellulaires comme les protéines, les lipides et les acides nucléiques).
Le crabe chinois *Eriocheir sinensis*, puissant osmorégulateur, de par ses extraordinaires migrations de reproduction, est susceptible d'être en contact avec de nombreux polluants et donc de subir des dégâts cellulaires ainsi que de mettre en place une résistance accrue aux contaminants.
C'est dans ce contexte général que nous allons étudier le rôle des enzymes antioxydantes et l'oxydation des protéines dans le processus d'acclimatation chez ce crustacé décapode.

1 Le modèle biologique : le crabe chinois *Eriocheir sinensis*

1.1. Introduction

1.1.1. Caractéristiques générales

Le crabe chinois est originaire d'Asie et plus précisément de la province de Fukien en Chine, au nord de la péninsule coréenne. On le reconnaît à sa carapace verte olive voire brune claire, parfois tachetée et aux poils situés sur les pinces des juvéniles et des adultes (Figure I.1). Sa classification se résume comme suit :

Phylum :	arthropodes
Sous-phylum :	crustacés
Classe :	malacostracés
Sous-classe :	eumalacostracés
Super-ordre :	eucarides
Ordre :	décapodes
Infra-ordre :	brachyoures
Super-famille :	grapsidoidés
Famille :	grapsidés

Genre : *Eriocheir*
Espèce : *Eriocheir sinensis*

Espèce catadrome, les crabes adultes matures vivant en eaux douces migrent vers les eaux maréales afin de s'y reproduire. Au printemps, les larves sont libérées et vont se métamorphoser en crabes juvéniles qui migreront vers les estuaires et plus tard vers les eaux douces (Rudnick et al, 2003). Le crabe chinois vit entre un et cinq ans dans les rivières et est destiné à mourir après la saison de reproduction (Panning, 1938).

1.1.2. Distribution et abondance

Ce crustacé décapode pose une réelle menace pour les écosystèmes marins et dulcicoles. Il est considéré comme une peste en Europe et a été découvert pour la première fois en Allemagne en 1912 (Veldhuisen, 1999). Depuis, il pullule dans les rivières belges, françaises, portugaises, luxembourgeoises, anglaises, polonaises (Normant, 2000) et autres pays européens nordiques (Rudnick et al, 2003). La population de crabes chinois a cependant légèrement diminué dans les années 40 en Europe suite à une augmentation de la pollution des eaux[1].
Cette espèce fut récemment introduite en Amérique du Nord, dans la Baie de San Francisco (Veldhuizen, 1999) ainsi qu'à Hawaï (Panning, 1939). Son introduction est due aux activités humaines ; qu'elle soit volontaire pour le marketing ou involontaire via les ballasts des bateaux (Normant, 2000). Le succès de l'invasion du crabe chinois dans ces différents pays est influencé par les conditions comparables entre les régions d'origines et celles envahies, par leur faculté à tolérer d'importantes variations de température et de salinité ainsi que par les niches écologiques inoccupées en Mer du Nord et dans les estuaires (Panning, 1939).

1.1.3. Impacts de l'introduction du crabe chinois

L'introduction du crabe chinois en Europe et en Amérique du Nord présente des conséquences économiques et écologiques.

Son comportement à creuser pour se protéger des prédateurs provoque l'érosion et une instabilité des berges et des digues (Herborg, 2003). La population importante de crabes juvéniles dans les eaux marines perturbe le secteur de la pêche en provoquant une usure des filets. Certains pêcheurs récoltent jusqu'à 200 crabes par prise[1]. Dans les estuaires, ils perturbent les sports nautiques et la pêche à la crevette. On estime l'impact financier s'élevant à plus de 80 millions d'euros depuis 1912[2].
L'impact potentiel le plus dommageable est sans doute écologique. En effet, l'importante population de ce crustacé provoque un changement dans la structure des communautés d'invertébrés au sein des estuaires et des eaux douces que ce soit par une prédation directe ou indirecte. Caractérisé par un régime omnivore, le crabe chinois se nourrit aussi d'œufs de poissons tels que ceux de l'esturgeon, de la truite ou du saumon[3].

Pendant leur migration, les crabes peuvent parcourir jusqu'à 11,5 km/jour et traverser les terres humides afin d'éviter les barrages (Herborg, 2003). Ils colonisent ainsi de nouveaux bassins hydrographiques (Rainbow, 2005).

[1] http://www.wsg.washington.edu/outreach/mas/nis/mittencrab.html
[2] http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?si=38&fr=1&sts=
[3] http://www.pac.dfo-mpo.gc.ca/recfish/Species/exotic_f.html

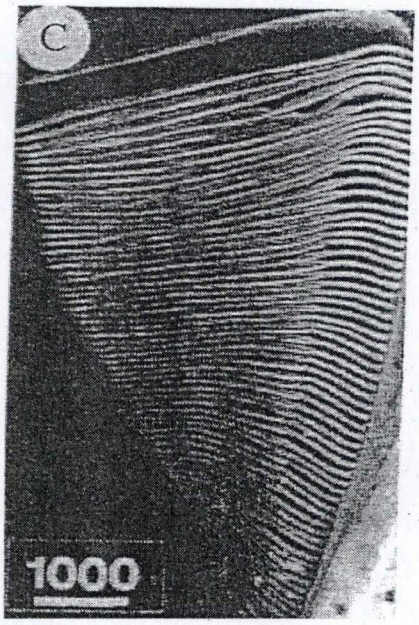


Figure I.2. Phyllobranchies de crabes chinois Eriocheir sinensis en microscopie électronique (Gilles et al, 2006).

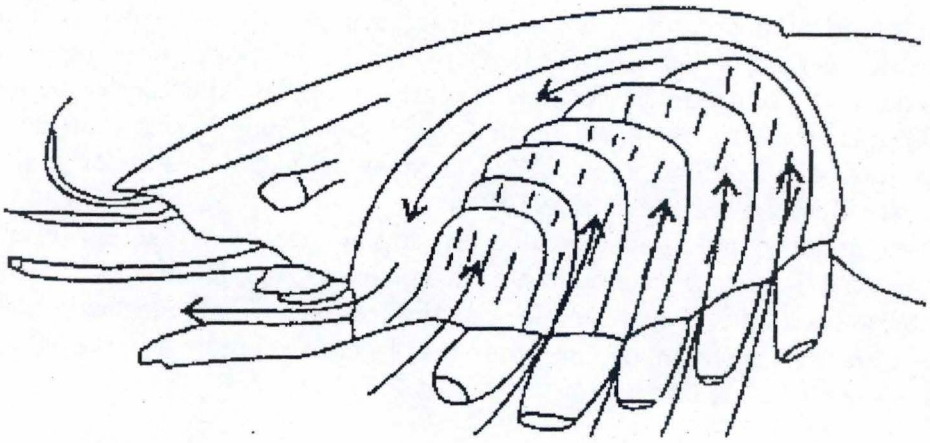


Figure I.3. Courant d'eau dans la cavité branchiale chez les crustacés décapodes (Gilles et al, 2006).

Ce crustacé présente aussi un impact sur la santé humaine car il est l'hôte secondaire de la Douve des poumons *Paragonimus westermani*. Fort heureusement, le climat trop froid en Europe empêche la survie de l'espèce de mollusque servant d'hôte primaire au parasite et prévient donc toute dissémination (Rainbow, 2005).

Le contrôle des populations de crabes chinois est cependant rendu difficile par son abondance, son omniprésence, son taux élevé de reproduction et son importante tolérance aux variations environnementales (Rudnick et al, 2003).

1.2. Physiologie branchiale

Le crabe chinois *Eriocheir sinensis* se retrouve dans des milieux bien différents au cours de sa vie suite aux migrations de reproduction. Les mécanismes de régulations ioniques sont donc distincts que l'animal se trouve en milieu marin ou dulcicole. En effet, le crabe est osmoconforme dans le premier milieu et hyperosmorégulateur dans le second. Chez les crustacés décapodes hyperosmorégulateurs, nous distinguons deux types de branchies : les branchies antérieures et les branchies postérieures. Celles-ci diffèrent par leur morphologie et leur physiologie respective au sein de l'individu, il est donc nécessaire d'en détailler leur rôle.

Le crabe chinois possède 8 paires de phyllobranchies (Figure I.2). Leur organisation anatomique particulière, en général plissée, leur permet d'obtenir une surface d'échange considérable dans un volume relativement peu important. Elles sont logées dans la cavité branchiale qui les protège des agressions externes (Gilles et al, 2006).

1.2.1. Branchies antérieures

Les cinq paires de branchies les plus antérieures sont dites *« respiratoires »* car ne s'opère aucun transport actif de Na^+ et de Cl^-. Ces structures présentent un épithélium beaucoup plus fin comparé aux branchies postérieures. Leur rôle essentiel sera donc d'oxygéner le sang de l'organisme. L'eau entre dans les cavités branchiales par des fentes situées au niveau des pattes et ressort par un passage exhalant situé en avant, au niveau de la bouche et où les scaphognatites (épipodite au niveau de la seconde maxillaire) créent par leurs mouvements un courant sortant (Figure I.3). Le mouvement d'eau au niveau des branchies s'effectue à l'inverse du mouvement de l'hémolymphe (Figure I.4). Ce système permet d'obtenir une meilleure extraction de l'O_2 (Hour, 1966).

Concernant les mouvements ioniques, les branchies antérieures sont perméables au Na^+. Ce cation entre de manière passive à l'intérieur de la cellule épithéliale et crée de ce fait une différence de potentiel (ddp) négative à l'extérieur. Il traversera ensuite le pôle basolatéral par l'intermédiaire d'une Na^+/K^+-ATPase pour arriver dans l'hémolymphe. Le Na^+ diffuse également via des espaces paracellulaires (Silvestre, 2005) (Figure I.5). Concernant les mouvements de l'ion Cl^-, aucun flux n'a pu être observé à travers la membrane apicale.

1.2.2. Branchies postérieures

Les 3 paires de branchies les plus postérieures sont dites *« osmorégulatrices »* et sont responsables du transport des deux ions cités précédemment. Leur épithélium présente des *cellules pavimenteuses* ainsi que des *ionocytes* dont les membranes plasmiques forment des invaginations souvent profondes et extrêmement plissées augmentant largement la surface et permettant ainsi une expression plus large de canaux et transporteurs. Ces invaginations sont

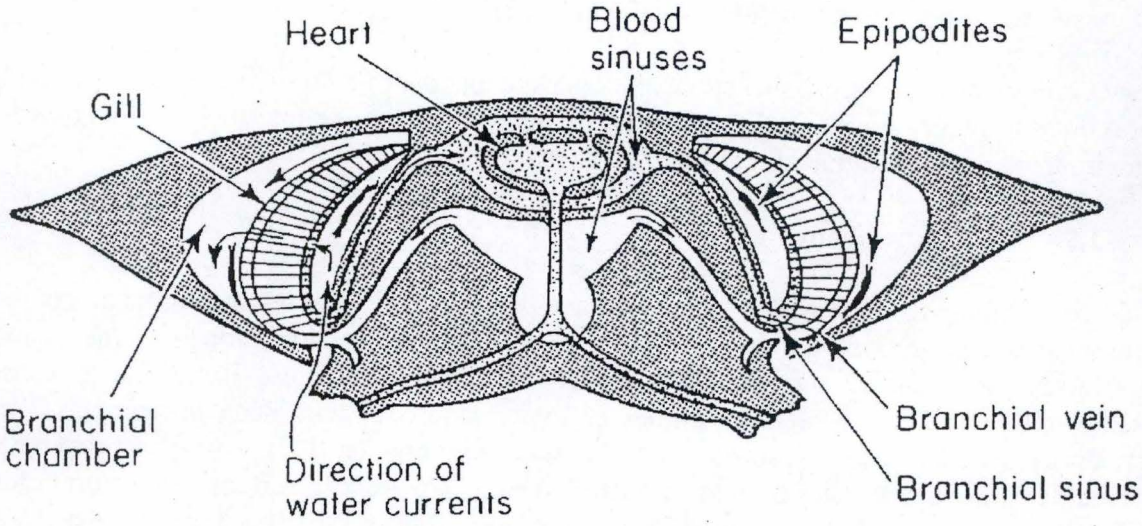


Figure I.4. Trajet à contre-courant de l'eau et de l'hémolymphe chez les crustacés décapodes (Hour, 1966).

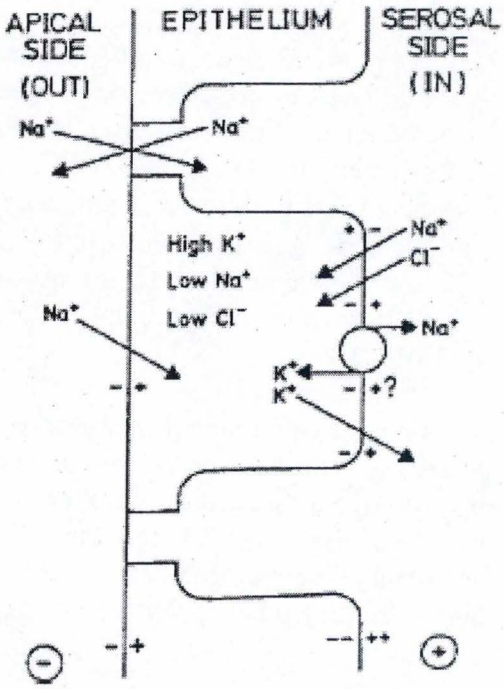


Figure I.5. Modèle fonctionnel d'une branchie antérieure de crabe chinois *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce (d'après Péqueux et Gilles, 1988)

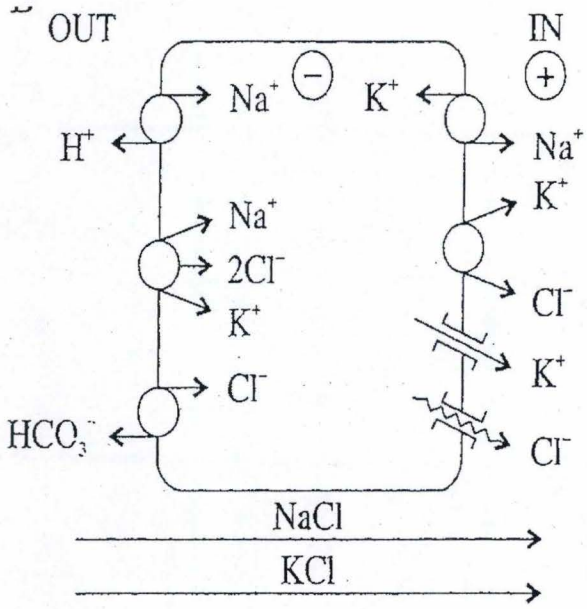


Figure I.6. Modèle fonctionnel d'une branchie postérieure de crabe chinois *Eriocheir sinensis* adapté à l'eau douce (d'après Gilles et al, 2006).

Tableau I.1 : propriétés physiques du Cadmium

Symbole chimique	Cd
Forme	Blanc, léger
Caractéristiques	malléable, flexible, ductile
Point de fusion	321°C
Numéro atomique	48
Poids atomique	112,41
Densité	8,64 g/cm^3
Rayon ionique	97 pm

en outre remplies de mitochondries, mettant la source d'énergie à portée directe des sites de transport actif qui l'utilisent (Gilles et al, 2006).

L'entrée de NaCl à la face apicale de l'épithélium branchial implique essentiellement un échangeur HCO_3^-/Cl^- localisé au niveau des cellules pavimenteuses pour le Cl^- et un canal Na^+ couplé à l'activité d'une H^+-ATPase localisés au niveau des cellules riches en mitochondries pour le Na^+ (Gilles et al, 2006). Il semble que ces deux ions entrent également via un cotransport Na^+-K^+-$2Cl^-$ au niveau de la membrane apicale. Les ions Cl^- traverseront la membrane basolatérale pour se retrouver dans l'hémolymphe via des canaux chlorure suivant un gradient électrochimique en K^+. La Na^+/K^+-ATPase permettra le transport des ions Na^+ vers l'hémolymphe (Figure I.6).

2 Le Cadmium

2.1. Introduction

Le Cadmium est un métal lourd placé dans le groupe IIb des éléments de transition dans le tableau périodique. Il est fréquemment associé au Zinc. La production de cadmium n'a de cesse d'augmenter et a atteint 19 700 t an^{-1} en 2000. La Belgique est le 3éme producteur de cadmium au monde, derrière le Japon et le Canada, avec 1573 t an^{-1} en 1993 (OCDE, 1994) et le 2éme consommateur mondial après le Japon. La prise de conscience concernant les effets néfastes de ce métal s'est faite au début des années 50. On observe ainsi une diminution dans la production et la consommation dès 1960 jusqu'à nos jours[4].

2.1.1. Propriétés et utilisations

Le cadmium a un poids atomique de 112,4 et un point de fusion de 321°C (tableau I.1). A l'état naturel, il peut se présenter sous deux degrés d'oxydation (0 et +2) ; toutefois on observe rarement le cadmium au degré 0 (état métallique). Son temps de demi-vie dans l'environnement est de 10 à 25 ans. Son rayon ionique, de 97 pm, est proche de celui du calcium ce qui explique la facilité avec laquelle il prend la place de ce dernier dans divers processus physiologiques.

Dans la nature, le cadmium se trouve sous forme de traces ou d'impuretés (<0,3%) dans le minerai de zinc ou sphalérite (ZnS). Ce métal ne se dégrade pas dans l'environnement, mais sa mobilité, sa biodisponibilité et son temps de séjour dans différents milieux peuvent subir l'influence de processus physiques et chimiques. Les principales causes naturelles de pénétration du cadmium dans l'atmosphère sont le transport éolien de particules du sol, les incendies de forêts et les émissions volcaniques. Il est donc naturellement présent dans l'air, l'eau, le sol et les aliments. A l'échelle planétaire, on estime que les émissions naturelles de cadmium sont d'environ 1300 t par année. On estime aussi que les activités humaines rejettent dans l'atmosphère de 3 à 10 fois plus de cadmium que les sources naturelles (Nriagu, 1988).

Ses caractéristiques remarquables telles que sa grande résistance à la corrosion, son faible point de fusion et sa conduction électrique font du cadmium un excellent composé résistant aux produits chimiques et aux hautes températures. Il est aussi largement utilisé dans les alliages, les pigments et les stabilisants ainsi que dans les batteries au Nickel-Cadmium

[4] www.cadmium.org

rechargeables. Suite à sa capacité à absorber les neutrons, ce métal est également employé dans les réacteurs nucléaires.

2.1.2. Exposition et pollution

A. Pollution atmosphérique

Dans l'atmosphère, les composés du cadmium tel que l'oxyde de cadmium sont surtout présents sous forme particulaire. Ces particules ont un temps de séjour très bref dans la troposphère (de 1 à 4 semaines) et sont extraites de l'air sous forme de dépôts humides et secs.
La production majeure du cadmium atmosphérique étant due aux activités humaines, les plus hautes concentrations de ce métal sont mesurées dans les villes industrielles et dans le voisinage des exploitations d'extraction par fusion (Fleischer, 1974). Il est aussi présent dans la fumée de tabac et constitue ainsi une des plus importantes sources d'exposition au cadmium pour les humains. Chaque cigarette contient approximativement de 1,5 à 2 µg de Cd desquels 70% se retrouvent sous forme de fumée (Fleischer, 1974).
La prise de cadmium par l'alimentation est d'environ de 35 à 90 µg/jour. On observe des symptômes de toxicité, tels que des problèmes intestinaux, des dysfonctionnements du foie, des dommages rénaux ou des problèmes osseux lorsque l'exposition alimentaire atteint des concentrations critiques de l'ordre de 250 à 300 µg/jour. De tels symptômes furent observés chez des fermiers japonais suite à une consommation de cadmium s'élevant de 600 à 1000 µg/jour. Cette maladie, appelée communément *maladie de itaï-itaï*, était causée par l'ingestion de riz hautement contaminé au cadmium. Les plants de riz avaient été irrigués avec de l'eau s'écoulant en amont de mines de zinc.
Bien que l'exposition au cadmium par voie alimentaire puisse être importante, l'inhalation est beaucoup plus dangereuse que l'ingestion. En effet, par cette voie, le métal est directement en contact avec les organes vitaux. Le cadmium inhalé peut ainsi causer de l'emphysème et des pneumonies. D'autres symptômes comme une diminution des fonctions immunitaires réduisant ainsi la résistance aux virus et aux bactéries ainsi qu'une augmentation du risque de cancer des poumons ou de la prostate furent également observés.

B. Pollution des sols

La pollution des sols par le cadmium est surtout due à l'épandage de fertilisants au phosphate et aux précipitations. L'accumulation du cadmium par les plantes varie en fonction de l'espèce et de la variété des végétaux. Le facteur le plus important contrôlant la consommation de cadmium par les plantes est le pH du sol. En effet, plus celui-ci est bas, plus la prise sera favorisée. On observe également que le déplacement du cadmium et son accumulation potentielle dans les organismes vivants augmentent lorsque la teneur en matières organiques est faible et lorsque la taille des particules et la teneur en humidité sont élevées. La phytotoxicité du cadmium se manifeste par une réduction de la photosynthèse, la nécrose et le rachitisme. On observe une absence de développement et d'élongation des racines chez des semis exposés à des solutions de sels de cadmium.

C. Pollution du milieu aquatique

Dans les milieux aquatiques, la mobilité et la biodisponibilité du cadmium s'accroissent lorsque le pH, la dureté, la concentration de matières en suspension et la salinité sont faibles et lorsque le potentiel redox est élevé (Bjerregaard, 1994). Ainsi, lors du passage d'un milieu

Tableau I.2 : Concentration en cadmium dans différents fleuves et estuaires (Cd D; cadmium dissous ; Cd P : cadmium particulaire)

	Région amont		Région aval (zone de mélange)		
	Cd D (ng/l)	Cd P (mg/kg)	Max Cd D (ng/l)	Cd P (mg/kg)	Référence
Amazone	50				Boyle *et al.*, 1982
Léna	3-12		34		Guieu *et al.*, 1996
Mississipi	18-20		33		Shiller & Boyle, 1991
Saint-Laurent	11-16	0,3-5	25	0,2-0.5	Cossa, 1990
Loire	24	1,5	60	0,47	Boutier *et al.*, 1993
Gironde (1984-1985)	20-100	6-14	400	1	Jouanneau *et al.*, 1990
Gironde (1994)	40-70	1,8-7	130	0,53	Kraepiel *et al.*, 1994
Rhône (1995)	5-38	0,2-1,5			Thomas & Huang, 1996
Rhône (1996)		55	0,8		Elbaz-Poulichet *et al.*, 1996
Escaut	20	8,8	90	3,7	Baeyens, 1998
Èbre	40	5,8			Guieu *et al.*, 1991

estuarien à un milieu marin, on observe une augmentation de la proportion des espèces solubles de chlorure de cadmium tel que CdCl, $CdCl_2$, $CdCl_3$. Toutefois, l'absorption du cadmium dans les eaux marines est plus lente que dans les eaux douces et estuariennes suite à sa concurrence avec le calcium. On observe ainsi que la composition ionique du milieu environnant affecte l'accumulation de cadmium dans l'organisme à 4 niveaux différents : (1) en affectant la spéciation du cadmium et de ce fait la biodisponibilité de celui-ci dans le milieu ; (2) par la compétition pour les sites des ions spécifiques présents dans le milieu (ex. calcium) ; (3) en affectant les propriétés générales de perméabilité des surfaces externes ; (4) en changeant la capacité de liaison du cadmium aux tissus (Bjerregaard, 1994).

La contamination par le cadmium des eaux douces et marines pose de sérieux problèmes car celui-ci s'y retrouve en quantités importantes. Les concentrations dites naturelles varient entre 15 et 120 ng Cd/l (Devos, 1998) (tableau I.2). La pollution au cadmium en Belgique est principalement inféodée au bassin sidérurgique de Liège. On note une concentration moyenne inférieure à 0,2 µg Cd/l au niveau de la station de pompage de Tailfer, par contre celle-ci s'élève à 0,9 µg Cd/l à Liège. Cette valeur est tout de même inférieure au seuil de potabilité de la Société Wallonne de Distributions d'Eau (<5 µg Cd /l).

Plusieurs études sur la létalité du cadmium et sur sa toxicité sur la reproduction ont montré que les crustacés étaient les plus sensibles au cadmium alors que les larves d'insectes étaient les plus tolérantes. Chez le poisson, le cadmium a des effets sur la croissance, la reproduction, les fonctions respiratoires et l'osmorégulation (Devos, 1998). Ainsi, lors d'une contamination aigue, ce métal perturbe la balance calcique aux niveaux des branchies (Zohouri, 2001).

2.2. Toxicité du cadmium

2.2.1. Introduction

A. Voies d'entrée du cadmium

Le cadmium est un toxique cumulatif : l'excellente solubilité de cet élément dans les acides faibles explique pour une large part son absorption dans l'organisme.
Chez les mammifères marins et animaux terrestres, le cadmium rentre dans l'organisme par ingestion ou inhalation.
Chez les poissons et les invertébrés aquatiques, les branchies et l'intestin sont les principaux sites d'absorption du cadmium mais aussi les obstacles prédominants pour contrôler les mécanismes d'absorption des métaux disponibles dans le milieu externe ou dans les proies contaminées. (Schoenmakers, 1992 ; Andres, 2000).

B. Stockage

Chez les animaux terrestres, 5% du cadmium sont résorbés au travers de l'appareil gastro-intestinal et viennent s'accumuler dans le foie et le cortex rénal.
Chez les poissons, les branchies sont les premiers organes à stocker et à transférer le cadmium vers le compartiment sanguin. Le métal se retrouve par la suite dans le foie où il se lie avec des métallothionéines puis est transféré vers le rein (Lock et Janssen, 2001). Celui-ci est l'organe principal d'accumulation de beaucoup de métaux suite à son importante irrigation sanguine.

Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire (<1000 daltons) permettant le processus de désintoxication des cellules. Plusieurs études ont montré que le cadmium induit la synthèse de ce type de protéine (Lock et Janssen, 2001 ; Pérez-Coll et al, 1999).
Bien que les muscles forment environ 60% du poids total du poisson, le cadmium présente de faibles concentrations dans ce compartiment. Ceci peut s'expliquer par le taux très élevé de décontamination dans ce tissu (Cinier et al, 1999 cité dans Andres, 2000). En conséquence, cela réduit fortement les risques de transferts trophiques chez les prédateurs et plus particulièrement chez les populations humaines locales consommant ces poissons.

C. Excrétion

Seule une faible proportion du cadmium absorbé est excrété. Chez les humains et les mammifères, l'excrétion est très lente et s'effectue essentiellement par voie urinaire (0,2 à 3,1 µg/l/jour) et très faiblement par voie fécale (<1%). Chez l'homme, on note aussi qu'une quantité négligeable de cadmium serait éliminé par les ongles, les cheveux et la sueur.

2.2.2. Modes d'action

Le cadmium, sous sa forme ionique Cd^{2+}, semble entrer principalement par les cellules à chlorure ou *ionocytes* présentes dans l'épithélium branchial des organismes aquatiques (Wicklund, 1994 cité dans Zohouri, 2001). Il passerait à travers la membrane au moyen de canaux membranaires ou de protéines transporteuses (Campbell, 1995). A la surface des branchies antérieures du crabe, le cadmium présent dans le milieu externe rentre en compétition avec le calcium pour des sites à haute affinité pour ce dernier. En effet, comme déjà cité précédemment, ces deux atomes ont des rayons ioniques très proches (0,097 pour le cadmium et 0,100 pour le calcium) ainsi que la même charge et le même nombre d'électron de valence. Ainsi, plusieurs études ont démontré que le cadmium emprunterait certaines voies du calcium telles que les canaux Ca, des Ca^{2+}ATPases ou bien des échangeurs Ca^{2+}/Na^{+} (Verbost et al, 1989 ; Silvestre, 2005).

Nous avions relaté précédemment que la présence de certains ions dans le milieu environnant rendait plus difficile l'absorption du cadmium chez des organismes aquatiques. On remarque ainsi qu'un régime riche en calcium chez des truites arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* exposées à des concentrations importantes en cadmium induit une élévation du calcium plasmatique. Celui-ci va rentrer dans les ionocytes par la membrane basolatérale et induire la fermeture des canaux à calcium présents dans la membrane apicale. En conséquence, l'entrée de cadmium présent dans l'eau sera rendue impossible à ce niveau (Zohouri, 2001).

3 Notion de stress oxydant

Selon Scandalios (2002), nous pouvons définir le stress oxydant comme étant un déséquilibre entre les systèmes antioxydants et prooxydants dû à une réduction des premiers ou une accumulation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou bien des deux, menant à de potentiels dommages cellulaires.

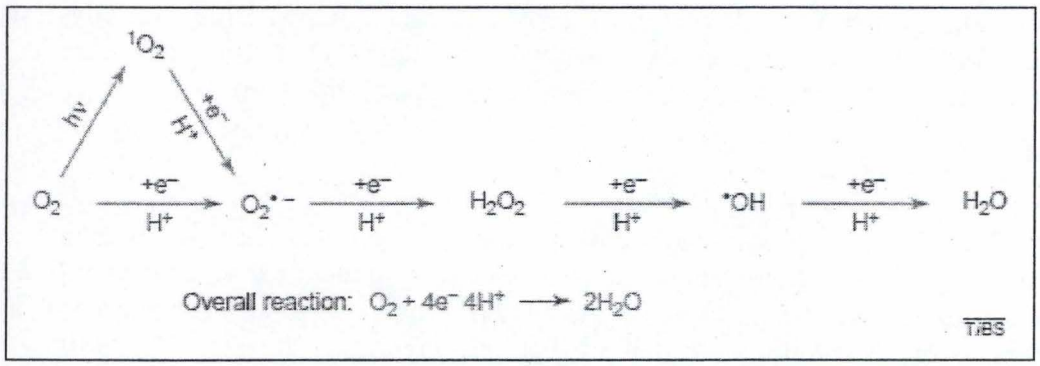


Figure I.7. Réduction de l'oxygène en eau menant à la formation de diverses espèces réactives de l'oxygène (ROS). (Scandalios, 2002)

Tableau I.3. Principales espèces réactives de l'oxygène (Nordberg, 2001)

ROS molecule	Main sources	Enzymatic defense systems	Product(s)
Superoxide ($O_2^{\bullet -}$)	'Leakage' of electrons from the electron transport chain Activated phagocytes Xanthine oxidase Flavoenzymes	Superoxide dismutase (SOD) Superoxide reductase (in some bacteria)	$H_2O_2 + O_2$ H_2O_2
Hydrogen peroxide (H_2O_2)	From $O_2^{\bullet -}$ via superoxide dismutase (SOD) NADPH-oxidase (neutrophils) Glucose oxidase Xanthine oxidase	Glutathione peroxidase Catalases Peroxiredoxins (Prx)	H_2O + GSSG $H_2O + O_2$ H_2O
Hydroxyl radical (•OH)	From $O_2^{\bullet -}$ and H_2O_2 via transition metals (Fe or Cu)		
Nitric oxide (NO)	Nitric oxide synthases	Glutathione/TrxR	GSNO

3.1. Espèces réactives de l'oxygène

3.1.1. Espèces réactives de l'oxygène et leurs sources

Le sort normal de l'oxygène moléculaire consommé par les animaux est sa réduction en eau couplée à l'oxydation de nourriture et à la production d'énergie. Une réduction partielle mènera, par contre, à la formation de ce qu'on appelle communément une « espèce dérivée de l'oxygène » (Livingstone, 2001) telles que le radical superoxyde ($O_2^{\cdot}$) et le radical hydroxyl ($OH^{\cdot}$) (Scandalios, 2002) (Figure I.7). Le tableau I.3.expose les différentes ROS et leurs principales sources au sein des cellules ainsi que les systèmes de défense cellulaires nécessaires pour contrer les effets délétères des espèces réactives.

Ainsi, les formes plus ou moins réactives de l'oxygène sont entre autres:

- Le **peroxyde d'hydrogène H_2O_2**
  L'H_2O_2 est formé par dismutation de l'anion superoxyde et par addition d'un second électron sur l'anion superoxyde en donnant l'ion peroxyde O_2^{2-} . Il possède une habilité particulière à pénétrer les membranes biologiques.

- Le **radical hydroxyle OH°**
  Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène lors d'une réaction catalysée par des ions métalliques (Fe^{2+} ou Cu^{2+}). Le radical hydroxyle est sans doute la ROS la plus réactive. Il réagit fortement avec les molécules causant ainsi des dommages importants au niveau des systèmes biologiques. Il est à l'origine de la peroxydation des lipides.

- **L'oxygène moléculaire O_2**
  L'oxygène moléculaire est un biradical avec deux électrons non appariés sur ses orbitales externes. Cette molécule est plus stable et moins réactive que les deux premières car ses électrons célibataires à spin parallèles ont un nombre quantique de spin identique.

- L'**anion superoxyde O_2^-**
  Il résulte de la capture d'un électron par la molécule d'O_2 lors de réactions endergoniques ainsi que lors de réactions enzymatiques ou spontanées. L'O_2^- n'est pas hautement réactif. Il est peu diffusible et reste donc essentiellement sur le lieu de sa formation, c'est-à-dire au niveau de la membrane interne des mitochondries associée à la chaîne respiratoire.

- Les **hydroperoxy radicaux**
  Ils sont produits lors de la lipoperoxydation. Une fois formés, ils pourront eux-mêmes arracher l'hydrogène à d'autres molécules lipidiques, qui, radicalisées à leur tour, réagiront de proche en proche et propageront le processus de la lipoperoxydation.

3.1.2. Dommages cellulaires des ROS

Ces radicaux libres sont extrêmement réactifs suite à la présence d'un ou plusieurs électrons célibataires qui sont facteurs d'instabilité. En effet, l'espèce radicalaire aura tendance soit à capter un électron d'une autre molécule afin d'apparier son électron célibataire, soit à céder ce dernier. Les radicaux libres peuvent causer des dommages moléculaires et attaquer les constituants cellulaires (protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques) menant à la sénescence et à la mort de la cellule (Figure I.8). Il est intéressant de noter que la diffusibilité

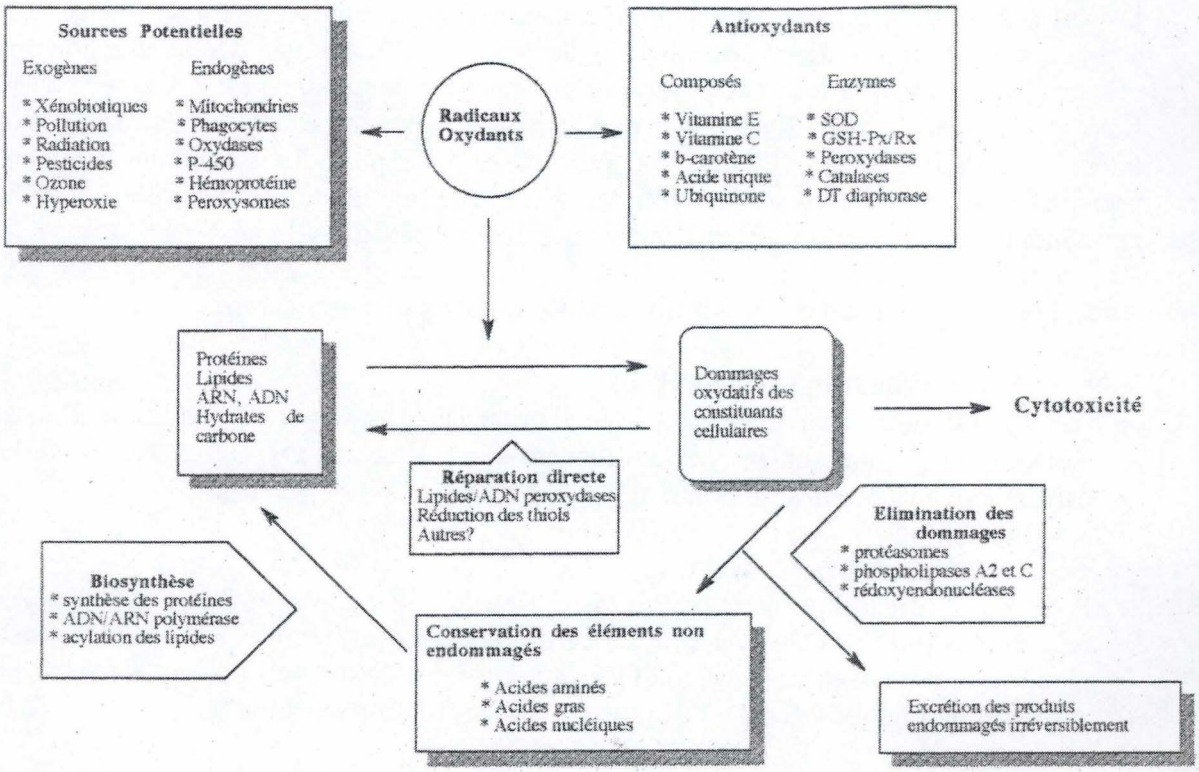


Figure I.8. Principaux effets biologiques des espèces réactives et systèmes de défense antioxydants

d'une espèce réactive est une notion importante ; une espèce extrêmement instable aura des effets qui seront localisés aux sites mêmes de sa formation. Une espèce moins réactive aura un rayon de diffusion plus étendu (Lagadic et al, 1997).
Cependant, l'intervention d'espèces réactives de l'oxygène ne s'accompagne pas toujours de phénomènes de toxicité. Ainsi, l'$O_2^{\cdot}$ et l'H_2O_2 agissent comme des signaux intracellulaires dans des processus physiologiques normaux (Scandalios, 2002). Ainsi, chez les procaryotes, l'H_2O_2 peut induire la transcription d'un certain nombre de gènes à travers le facteur de transcription OxyR.
D'autres études concernant le rôle des ROS chez les plantes ont pu mettre en évidence leur participation dans la structure de la paroi cellulaire et la programmation de la mort de la cellule ainsi que leur rôle dans la défense contre les microbes (Scandalios, 2002).
Chez les levures et les cellules animales, les ROS peuvent arrêter la division cellulaire (Scandalios, 1997).

Parmi les dommages cellulaires que les ROS peuvent causer, nous pouvons citer la peroxydation des lipides gras insaturés (LPO) (Storey, 1996 cité dans Monteiro et al, 2006). Celle-ci traduit l'inefficacité des systèmes antioxydants à enrayer une agression toxique. Elle peut avoir lieu même en présence d'activités antioxydantes augmentées, l'induction pouvant être insuffisante pour faire face au stress. Les acides gras polyinsaturés sont très sensibles aux radicaux hydroxyles suite à la proximité des doubles liaisons carbone qui facilitent l'extraction des atomes d'hydrogène du groupement méthyle.
Le processus de peroxydation lipidique influence la fluidité des membranes en agissant sur l'intégrité des biomolécules associées à celle-ci telles que le cholestérol (Almroth et al, 2005).

3.1.3. Oxydation des protéines

A. Introduction

Comme déjà énoncé précédemment, il a été démontré que plusieurs types de ROS induisent des modifications au niveau des protéines menant à l'oxydation de celles-ci (Rajindar, 2002). Il est cependant nécessaire de souligner que toutes les protéines ne sont pas sensibles de la même façon au dommage oxydant. Ainsi, des protéines possédant des résidus particulièrement exposés aux ROS peuvent être plus susceptible de subir une oxydation (Conrad et al, 2000).

Ces modifications incluent la perte de groupements sulfhydryles (-SH), la formation de groupements carbonyles, de ponts disulfures, de méthionine sulfoxyde, de nitrotyrosine et de glyoxydation. La perte des groupements sulfhydryles est une des réponses immédiates de la protéine suite à une élévation du niveau de stress oxydant (Berlett, 1997). Celle-ci va mener au déploiement de la protéine, à l'inactivation du site catalytique et à la perte de certaines fonctions spécifiques. Plusieurs études ont démontré la relation entre la sénescence et la perte de ces groupements dans des homogénats de cerveau, de muscles et de reins de rongeurs (Agarwal et Sohal, 1994 cité dans Rajindar, 2002). On évalue ainsi que les protéines oxydées s'accumulant avec l'âge représentent 30 à 50% des protéines totales au sein des cellules en fin de vie (Stadtman, 1988 cité dans Conrad et al, 2000).

B. Modifications réversibles et irréversibles

En réalité, de hauts niveaux de ROS et/ou une diminution des systèmes enzymatiques antioxydants peuvent être responsables de plusieurs modifications chimiques au sein des

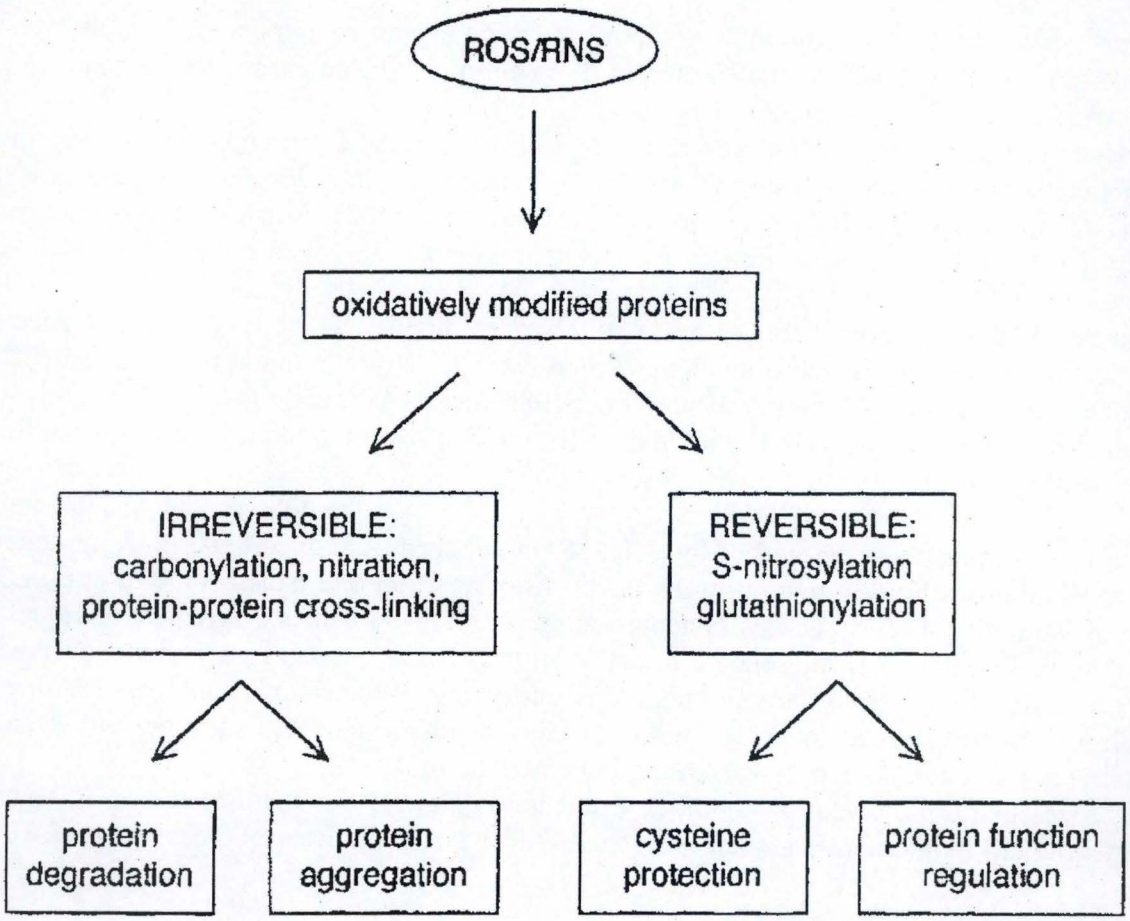


Figure I.9. Conséquences possibles au niveau des fonctions de la protéine suite à un stress oxydant (d'après Ghezzi et Bonetto, 2003).

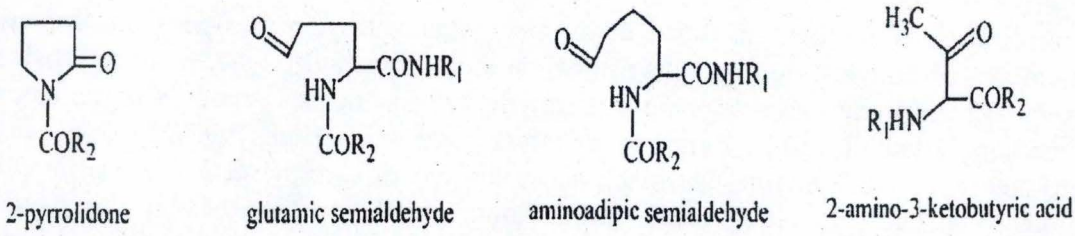


Figure I.10. Structure de dérivés carbonyles produits par oxydation directe de chaînes d'acides aminés (Dalle-Donne et al, 2002).

protéines. On distingue ainsi les transformations irréversibles et réversibles. La figure I.1. (Figure I.9) nous montre que la carbonylation ou la nitration mènent généralement à une perte permanente des fonctions de la protéine suite à une dégradation ou à une agrégation de celle-ci. On observe ainsi que les protéines sont moins thermostables et exposent les acides aminés hydrophobes à leur surface (Friguet, 2006). D'un autre coté, certaines modifications sont réversibles telles que la glutathionylation et peuvent avoir un rôle important dans la régulation du potentiel redox (Ghezzi et Bonetto, 2003).

- Carbonylation

La carbonylation des protéines peut s'opérer via une oxydation directe de l'ossature de la protéine telle l'oxydation de chaînes d'acides aminés comme l'histidine, l'arginine et la lysine en des dérivés cétones ou aldéhydes. Ceci mène à la formation de fragments protéiniques possédant des amino acides α-ketoacyl N-terminal (Figure I.10).

Une des conséquences de la carbonylation est l'apparition de la résistance des protéines oxydées à la protéolyse par le protéasome 20S (Friguet et al, 1997). Ce complexe protéolytique multienzymatique de haut poids moléculaire est présent dans le cytosol et possède de quatre à sept sous-unités. Il a pour rôle de dégrader les protéines oxydées présentes dans le compartiment cellulaire.

La formation de ces groupements carbonyles joue un rôle important dans grand nombre de maladies humaines telles que la maladie d'Alzheimer, le diabète, l'arthrite rhumatoïde, les défaillances rénales chroniques et le syndrome de détresse respiratoire (Almroth et al, 2005 ; Boyd-Kimball et al, 2005). Renke (Renke et al, 2000 cité dans Dalle-Donne et al, 2003) nous rapporte que la teneur en groupements carbonyles dans des protéines plasmiques chez des enfants atteints d'arthrite chronique était significativement plus élevée par rapport au groupe témoin (1,36 ± 0,68 contre 0,807 ± 0,16 nmol carbonyles/mg de protéines).

- Glutathionylation

Comme décrit précédemment, certains changements dans le processus d'oxydation peuvent être réversibles suite à l'intervention de systèmes enzymatiques spécifiques. Ainsi, la réaction de glutathionylation peut être inversée par la glutarédoxine/glutathion/glutathion réductase (Friguet, 2006). La glutathionylation résulte de la formation de ponts disulfures entre des groupements GSH et cystéine-SH au sein des protéines.
Cependant, plusieurs protéines peuvent être glutathionylées sous des conditions basales. Ainsi, des études récentes ont démontré que la teneur en ponts disulfures entre des groupements GSH s'élevait à 20-30 nmol/g de tissu humide (Brigelius et al, 1983 cité dans Ghezzi et Bonetto, 2003). Cette réaction présenterait donc un rôle de régulation.

C. Identification des groupements carbonyles

Les groupements carbonyles sont d'excellents marqueurs témoignant de l'oxydation des protéines et leur mesure est un bon indicateur de l'étendue des dommages au sein de ces dernières suite à un stress oxydant. Ainsi, McDonagh (McDonagh et al, 2005) a observé l'induction de la carbonylation des protéines au sein de la glande digestive de la moule commune *Mytilus edulis* suite à une exposition au cuivre engendrant un stress oxydant. Il a été également établi que le DDE génère des ROS en quantités suffisantes pour induire la carbonylation des protéines chez le bivalve *Ruditapes decussatus* (Dowling et al, 2006).

Ces biomarqueurs sont également utilisés dans des travaux étudiant la sénescence et des désordres physiologiques tels que des maladies neurodégénératives citées précédemment.

La détection des groupements carbonyles implique la dérivatization de ceux-ci avec du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) menant à la formation d'un composé stable : le 2,4-dinitrophényl hydrazone (DNP).

La détection des groupements carbonyles au sein des protéines suite à une exposition aux ROS est donc une mesure puissante et convaincante s'ajoutant à la batterie des biomarqueurs nous renseignant un stress oxydant chez les organismes. Elle apporte certains avantages en comparaison avec la mesure des produits de peroxydation lipidique car la carbonylation est un phénomène commun lors de l'oxydation des protéines. De plus, la réaction s'opère relativement rapidement et présente une stabilité respectable au sein des protéines oxydées (Dalle-Donne et al, 2003).

3.2. Systèmes de défense

Afin de minimiser les effets délétères voire létaux des ROS formées de manière excessive, les organismes aérobiques ont développés des systèmes de défense. Ceux-ci peuvent être divisés en deux groupes principaux : les systèmes enzymatiques et non enzymatiques.

3.2.1. Systèmes enzymatiques

Trois types d'enzymes antioxydantes majeures sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène : les superoxydes dismutases (SOD), les peroxydases et les catalases. Dans les cellules animales, ces enzymes agissent de manière coordonnée selon les réactions suivantes :

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad \text{(superoxyde dismutase)}$$

$$H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + 2H_2O \qquad \text{(catalase)}$$

$$ROOH + 2GSH \longrightarrow ROH + H_2O + GSSG \qquad \text{(glutathion peroxydase)}$$

(avec R = H ou une chaine carbonée d'acides gras)

- **Superoxyde dismutase (SOD) :**
  Ces métalloenzymes catalysent la dismutation du radical superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène. Elles existent sous plusieurs isoformes caractérisées par leur métal de transition au niveau du site actif. La Mn-SOD semble être localisée uniquement dans la matrice soluble des mitochondries alors que la Cu-SOD et la Zn-SOD se situent essentiellement dans le cytosol. La plupart des organismes possèdent seulement un type de chaque isoforme de SOD dans les divers compartiments cellulaires. Par contre, contrairement aux animaux, les plantes détiennent de multiples types de chaque isoformes encodées par plus d'un gène. Ceci indique que ces dernières ont des systèmes de défense antioxydants beaucoup plus complexes que les autres organismes.
  Leur présence a été détectée dans le compartiment cytosolique et plus précisément dans les peroxysomes, les lysosomes et le noyau des cellules eucaryotes. Elles ont été trouvées également chez les plantes au niveau chloroplastique et cytosolique.

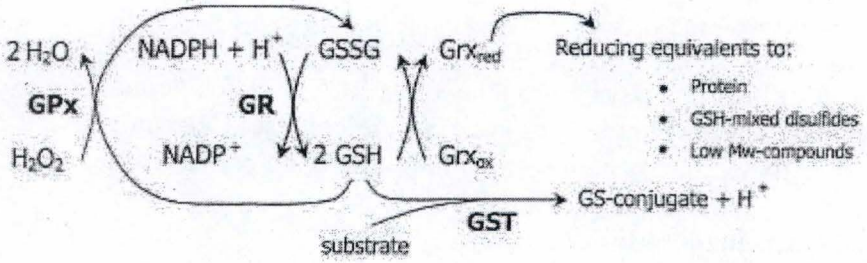


Figure I.11. Résumé schématique des principaux systèmes antioxydants associés au glutathion (Nordberg, 2001)

- **Catalase :**

La catalase dégrade le peroxyde d'hydrogène en oxygène moléculaire et en eau. Elle a une action complémentaire à la GPx contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène ainsi qu'une fonction de détoxification de divers substrats comme par exemple les phénols et les alcools. Cette enzyme est largement présente dans les peroxysomes et est absente dans les chloroplastes des cellules végétales.

- **Glutathion peroxydase (GPx) :**

Le glutathion peroxydase catalyse la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes, allant du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques (figure I.11). Tout comme la SOD, elle présente plusieurs isotypes. Cette enzyme est localisée dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale mais est absente dans les chloroplastes. Un des inhibiteurs les plus connus de l'activité enzymatique de la GPx est le cadmium (Lagadic et al, 1997). La GPx joue un rôle important dans la protection des membranes contre les dommages dus à la peroxydation des lipides (Oost et al, 2003 cité dans Monteiro et al, 2006).

Il est important de citer également l'intervention des **glutathion S-transférases (GST)** comme facteur de protection contre les ROS. Cette famille d'isoenzymes intracellulaires catalyse la conjugaison du tripeptide GSH avec une variété de composés endogènes ayant des groupes fonctionnels électrophiles. Le niveau de l'expression de GST est considéré comme un facteur important de protection des organes contre les effets délétères des polluants (Casalino et al, 2004). En plus de leur rôle antioxydant, les GST participent à la séquestration et au transport de composés hydrophobes endogènes tels que les hormones, les stéroïdes et la bilirubine (Salinas et Wong, 1999 cité dans Adewale, 2005).

Une enzyme antioxydante également très importante et impliquée dans le métabolisme du glutathion est la **glutathion réductase**. Celle-ci catalyse la réduction du GSSG en GSH au détriment du NADPH, qui est recyclé dans le cycle des pentoses phosphates. Cette enzyme est localisée dans le cytoplasme et les chloroplastes des cellules végétales (Monnet et al, 2006).

3.2.2. Systèmes non enzymatiques

Des antioxydants non enzymatiques, agissant comme réducteurs ou capteurs de radicaux, viennent renforcer l'action des enzymes énoncées précédemment :

- Le **glutathion** : il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) et une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydant. Ses actions sont diverses et variées. Il peut désactiver les espèces réactives de l'oxygène tel que le OH° en donnant des électrons ainsi que de servir de substrat pour les glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes chez les animaux. Certains métaux comme le zinc et le cadmium peuvent former des complexes très stables avec le glutathion ce qui perturbe la conversion de la forme oxydée en forme réduite.
- L'**acide lipoïque** est un réducteur puissant. Il est capable de réduire les radicaux peroxyles et de désactiver l'oxygène singulet.
- Des composés tels que la **vitamine C** et **E**, les **ubiquinones** ainsi que le **B-carotène**. Les vitamines servent principalement à prévenir la formation d'hydroperoxyde dans les lipoprotéines plasmiques. Les plantes produisent aussi une large variété d'antioxydants non enzymatiques comme les **flavonoïdes** et les **alkaloïdes**.

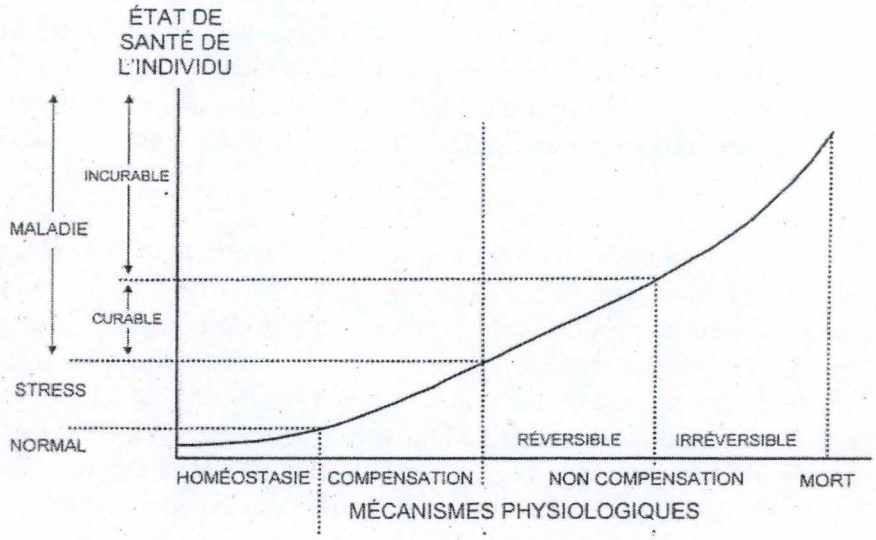


Figure I.12. Représentation schématique des mécanismes physiologiques mis en œuvre chez un individu suite à une exposition à un agent stressant (d'après Depledge, 1994)

- L'**urée**, la **thiourée**, le **mannitol** et le **DMSO** sont des capteurs de radicaux fréquemment utilisés lors d'expérimentation in vitro (Lagadic et al., 1997).

3.3. Biomarqueurs en écotoxicologie

Nous pouvons définir le terme de biomarqueur par une structure ou un processus biologique dont les variations, induites par les xénobiotiques, sont observables et/ou mesurables au niveau de l'individu (Lagadic et al, 1997). En effet, certaines molécules biologiques ont la particularité de réagir à la présence de toxique dans le milieu, l'amplitude de la réponse étant parfois proportionnelle à la quantité de xénobiotiques. Contrairement à la simple mesure de l'accumulation de contaminants dans les tissus, les biomarqueurs présentent des informations plus complètes et biologiquement plus pertinentes sur l'impact potentiel des toxiques sur la santé des organismes (Van der Oost, 1996 cité dans Damiens et al, 2004).

3.3.1. Types de biomarqueurs

Nous pouvons distinguer trois types de biomarqueurs en écotoxicologie (Lagadic et al, 1997) :

- Les ***biomarqueurs d'exposition*** à un xénobiotique : ils indiquent que le polluant présent dans l'environnement a pénétré dans l'organisme. Ce type de biomarqueur est généralement le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans les tissus ou les liquides corporels.

- Les ***biomarqueurs d'effet*** : ils permettent de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et qu'il a exercé un effet toxique ou non sur une cible critique.

3.3.2. Rôles des biomarqueurs

Un biomarqueur demeure une réponse d'une structure ou fonction biochimique ou physiologique à la présence d'un xénobiotique dans un individu. Ainsi, tout composant biochimique ou physiologique « normal » devient un biomarqueur à partir du moment où l'exposition se produit.

Nous pouvons expliquer le rôle des biomarqueurs par la figure I.12. En dessous d'une certaine dose individuelle de polluant toxique et/ou d'une certaine durée d'exposition, les biomarqueurs vont contribuer essentiellement au maintien de l'homéostasie de l'organisme. Par la suite, lorsque la dose interne et/ou la durée augmentent, certains biomarqueurs vont intervenir pour compenser l'action des contaminants alors que d'autres vont la subir. On se trouve alors à un stade de compensation. Celui-ci sera dépassé si la dose et/ou la durée est encore plus importante car l'intervention des biomarqueurs de compensation n'est plus suffisante pour limiter l'action des polluants toxiques. A ce niveau, l'état de santé des individus contaminés évolue vers une dégradation irréversible menant à la mort à plus ou mois long même si l'exposition au polluant a cessé.

3.3.3. Biomarqueurs du stress oxydant chez les animaux aquatiques

A. Activités antioxydantes chez les animaux aquatiques

Les animaux aquatiques semblent être dotés de systèmes antioxydants similaires à ceux décrits chez les mammifères. Il existe néanmoins quelques différences liées à des spécificités

Tableau I.4. Modifications d'activité ou de concentration des enzymes antioxydants et de la lipoperoxydation chez des animaux aquatiques exposés à des polluants lors d'expérimentations en laboratoire et in situ.

Espèce	Substance étudiée	Concentration	Durée d'exposition	LPO	GSH	GPx	GST	CAT	SOD	Auteurs
Truite Sud américaine *Brycon cephalus*	Méthylparathion	2 mg/l	96 h	++ (M,B) = (F)		-- (M,B) = (F)	++ (T)	++ (T)	++ (T)	Monteiro et al, 2006
Huitre creuse *Crassostrea gigas*	Malathion	100 et 300 µg/l	24 h					++ (T)		Damiens et al, 2004
Moule commune *Mytilus edulis*	Mixture de polluants	Non spécifié	Prélèvements in situ				++ (B)		++ (B)	Manduzio et al, 2004
Poisson-chat *Wallago attu*	Mixture de polluants	Non spécifié	Prélèvements in situ	++ (T)	++ (T)	++ (B,R)		-- (F) -- (R) = (B)	++ (T)	Pandey et al, 2002

Suite **tableau I.4.**

Espèce	Substance étudiée	Concentration	Durée d'exposition	LPO	GSH	GPx	GST	CAT	SOD	Auteurs
Tubifex tubifex	Cuivre	0,05 ; 0,1 ; 0,2 mg/l	7 jours				-- (T)	++ (T)		Mosleh et al, 2006
Anguilla anguilla L	Chrome	100 µM et 1 mM	24 h	++ (B,R)	-- (B)	++ (B)		-- (B)		Ahmad et al, 2006
Anguilla anguilla L	Cuivre	0; 1; 2,5 µM	24 h	++ (F)	++ (F)					Gravato et al, 2006
Oreochromis niloticus	Argent Cadmium et zinc Chrome	0,5 mg/l 1 mg/l 0,1 mg/l 1,5 mg/l	96 h in vivo					-- (F) ++ (B) ++ (F) = (R, B) -- (R) -- (B)		Atli et al, 2006

B= Branchies
F= Foie ou hépatopancréas
M= Muscles
R= Rein
T= Tissus en général

= : pas de différence par rapport aux individus contrôles
++ : augmentation par rapport aux individus contrôles
-- : diminution par rapport aux individus contrôles

physiologiques (Lagadic et al, 1997). Dans l'ensemble, les activités antioxydantes chez les espèces aquatiques sont inférieures à celles mesurées chez les mammifères. Chez les poissons, les enzymes antioxydantes telles que la SOD et la catalase sont prédominantes au niveau sanguin et hépatique. Chez les mollusques bivalves, les activités au niveau de la glande digestive sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans le foie des poissons. La lipoperoxydation semble également agir par des mécanismes similaires à ceux des mammifères. Cependant, les poissons seraient mieux protégés de celle-ci bien qu'ils présentent un taux nettement plus élevé en lipides comparé aux mammifères.

B. Réponse des animaux aquatiques au stress oxydant dû aux contaminants de l'environnement

La réponse des systèmes antioxydants des organismes aquatiques aux polluants a été étudiée expérimentalement et in situ. Il ressort de ces différentes études que les activités antioxydantes sont en général augmentées en présence du toxique et que leur importance relative est variable selon les espèces et les polluants.

Le tableau I.4.reprend quelques études concernant l'effet du cadmium et d'autres polluants sur l'intervention et les niveaux d'enzymes antioxydantes chez les animaux aquatiques. Ces différentes études nous indiquent que les réponses des enzymes SOD et CAT présentent souvent des profils parallèles malgré quelques exceptions (Atli et al, 2006 ; Monteiro et al, 2006). Nous pouvons également remarquer que l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes n'est pas un phénomène constant ; en effet, les niveaux de SOD et de CAT ont tendance à diminuer dans les branchies et le rein de *Oreochromis niloticus* suite à une exposition au chrome pendant 96 heures (Atli et al, 2006).
L'activité de la GPx est au contraire augmentée lorsque celle de la CAT diminue chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla L.*(Ahmad et al, 2006) ce qui pourrait être expliqué par une production importante de H_2O_2 capable de stimuler les glutathion peroxydases mais aussi d'inhiber les catalases. L'étude de Monteiro et al (2006) vient compléter celle de Livingstone (Livingstone, 1993 cité dans Lagadic et al, 1997) qui avait observé que dans certains cas les activités SOD, CAT et GPx étaient activées simultanément chez des limandes *Limanda limanda* exposées à des sédiments fortement contaminés en polychlorobiphényles et en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).
L'étude de Gravato et al (2006) nous rapporte que la diminution des teneurs en glutathion réduit est associée à des effets de lipoperoxydation importants dans le foie chez l'anguille *Anguilla anguilla L.* exposée au cuivre. La peroxydation des lipides serait donc trop élevée et provoquerait la diminution du glutathion réduit. Il est cependant nécessaire d'ajouter que ce dernier sert également de substrat pour d'autres réactions antioxydantes. En général, si l'on observe une diminution en GSH, on observe également des dommages au niveau de l'ADN (Gravato et al, 2006).
Une réduction de l'activité de la GST est généralement présente lorsque les défenses cellulaires sont très faibles (Mosleh et al, 2005).

C. Réponses des crustacés brachyoures à divers contaminants de l'environnement

Les quelques études relatant les niveaux d'activité des diverses enzymes antioxydantes chez les crustacés brachyoures nous indiquent que, tout comme chez les autres animaux aquatiques, celles-ci sont en général augmentées en présence de polluants que ce soit au niveau hépatique ou branchial (tableau I.5). Bianchini et Monserrat (2006) observe une

Tableau I.5. Modifications d'activité ou de concentration des enzymes antioxydantes et de la lipoperoxydation chez différentes espèces de crabes exposés à des polluants lors d'expérimentations en laboratoire.

Substance/espèce étudiée	Espèce	Concentration	Durée d'exposition	LPO	GSH	GPx	GST	CAT	SOD	Auteurs
Méthylparathion	*Chasmagnatus granulatus*	0,05 mg/kg/jour	72 h	++ (F)			++ (F)	++ (F)		Bianchini et Monserrat, 2006
Microcystine	*Chasmagnatus granulatus*	34 à 860 µg/kg	6, 12, 72 h	++ (F)			++ (F)			Dewes et al, 2005
Microcystine	*Chasmagnatus granulatus*	39,2 µg/l	48 h	= (B)			++ (B)			Vinagre et al, 2003
Cuivre	*Callinectes sapidus*	Non spécifié	Exposition à long terme	++(T)	= (T)	++ (T)		= (T)	++ (T)	Brouwer et Brouwer, 2002

B= Branchies
F= Foie ou hépatopancréas
T= Tissus en général

= : pas de différence par rapport aux individus contrôles
++ : augmentation par rapport aux individus contrôles
-- : diminution par rapport aux individus contrôles

augmentation de la peroxydation des lipides au niveau hépatique chez des crabes *Chasmagnatus granulatus* exposés pendant 72 heures à du méthylpararthion. Cette élévation mènerait à l'augmentation de l'activité de la GST et de la CAT. Ces mêmes effets sont également constatés lorsque ces crabes sont contaminés avec des microcystines (Dewes et al, 2005). Brouwer et Brouwer (1998) n'ont pas noté d'augmentation significative du glutathion réduit chez le crabe *Callinectes sapidus* exposé à du cuivre alors qu'une élévation significative de l'activité de la GPx a été détectée. Le métabolisme du glutathion ne semble pas, dès lors, être affecté par l'exposition au cuivre chez cette espèce.

3.4. Induction d'un stress oxydant suite à une exposition au cadmium

L'idée que le cadmium exerce sa toxicité, du moins en partie, à travers l'induction de ROS ayant pour résultat la peroxydation des lipides, des dommages au niveau du matériel génétique et la S-glutathionylation des protéines est généralement acceptée (Basha et Rani, 2003). Néanmoins, à l'inverse du cuivre, du fer ou du chrome, le cadmium ne génère pas directement de radicaux libres. Ses propriétés prooxydantes pourraient être due (1) au déplacement du cation Fe^{2+} qui induirait les ROS via la réaction de Fenton ; (2) à l'inhibition des activités antioxydantes comme la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion réductase (Atli et al, 2006) ; (3) à la réduction du glutathion réduit.

Dans cette optique, les travaux de Silvestre et al (2006), relatifs aux profils d'expression des protéines dans les branchies antérieures de crabes chinois *Eriocheir sinensis* suite à une acclimatation au cadmium, ont permis de mettre en évidence l'induction d'une isoforme de la thioredoxine peroxydase (TPx) après une exposition chronique. Cette enzyme est connue pour exercer un rôle antioxydant à travers son activité de peroxydase au moyen de laquelle l'H_2O_2 est réduit et détoxifié (Nordberg, 2001).
Cette étude a également permis de mettre en évidence la sur-expression d'une isoforme de la GST lors de cette même contamination. Cette induction devrait aider les branchies du crabe à contrer le stress oxydant induit par le cadmium (Silvestre et al, 2006).
Il semble que le cadmium induise un stress oxydant au niveau du foie de rat exposé à 2,5 mg $CdCl_2$/kg de poids corporel (Casalino et al, 2004). Ces auteurs ont en effet observés une augmentation de l'activité de la GST de plus de 36% après 24 heures.

4 Acclimatation suite à un stress provoqué par un xénobiotique

4.1. Exposition chronique et aigue

Les xénobiotiques relargués dans l'environnement sont responsables d'effets néfastes chez l'homme et les animaux vivant dans le milieu pollué. Ces polluants sont souvent présents à très faible concentration mais sont en contact continuel pendant des jours, des semaines voire des mois avec les organismes. On parle alors de contamination *chronique*. On peut citer par exemple le cas des ouvriers travaillant dans les usines et les fabriques des batteries au nickel-cadmium et des pigments à base de métaux lourds. Ceux-ci ont un contact journalier avec ces xénobiotiques et présentent souvent, suite à cela, des dommages au niveau des reins. Le cas du mercure (Hg) provenant des décharges industrielles pouvant être converti en méthylmercure par les microorganismes indique lui aussi une contamination chronique chez ces animaux.

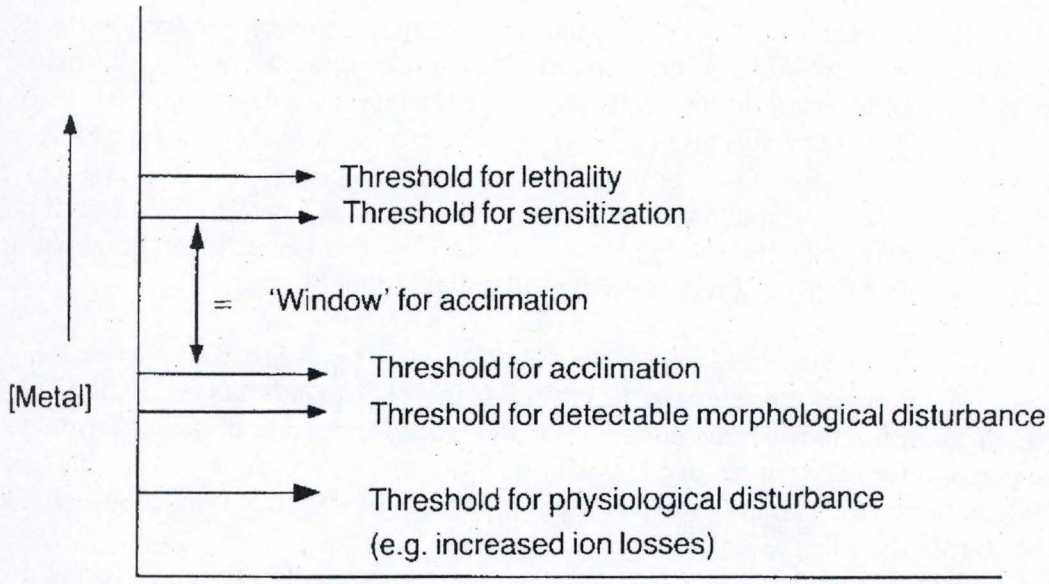


Figure I.13. Modèle général de l'acclimatation à un métal (d'après McDonald et Wood, 1993)

Une exposition chronique peut aussi être réalisée en laboratoire. En général, les organismes sont exposés pendant une période minimale de 3 jours pouvant aller jusqu'à des années.

Les hommes et animaux peuvent également subir une exposition dite *aigue* lorsqu'ils sont en contact brièvement avec un xénobiotique présent à très forte dose. Le cas peut se présenter par exemple lorsqu'un pétrolier déverse accidentellement son chargement en mer et contamine à cette occasion la faune et la flore de l'environnement proche ainsi que plus éloigné si les vents et les courants interviennent. L'exemple d'une intoxication au monoxyde de carbone mortelle après 1 heure chez l'humain lors d'une exposition de moins de 0,1% est également un cas d'exposition aigue.
Lorsque l'on souhaite exposer les organismes en laboratoire à une contamination aigue, une période de 24 à 72 heures est généralement utilisée ; bien que ce temps varie en fonction de l'espèce, du contaminant et de la dose administrée.

4.2. Processus d'acclimatation

Nous savons qu'une exposition chronique à un xénobiotique produit des effets néfastes chez les organismes exposés. Cependant, il se peut aussi que ce contact induise une série de processus comportementaux, morphologiques, physiologiques, biochimiques ou moléculaires qui contribuent à garder les mécanismes d'homéostasie de l'espèce touchée dans les limites autorisées pour sa propre survie (Silvestre, 2005). Ce processus est appelé *l'acclimatation.* McDonald (McDonald et Wood, 1993) le définit comme étant une phase pendant laquelle l'organisme met en place les mécanismes nécessaires afin de trouver un nouvel état d'équilibre compatible avec sa survie.
Il est possible de dresser un modèle général de l'acclimatation qui explique les différents seuils atteints lorsqu'un organisme est en contact avec un polluant pendant une période prolongée. La figure I.13 nous montre qu'à partir d'une certaine concentration en métaux, l'animal va subir rapidement des altérations qui seront au départ physiologiques puis morphologiques lorsque la dose et/ou la durée augmentent. Il s'ensuit alors une phase de recouvrement pendant laquelle les dommages diminuent graduellement alors que l'agent stressant est toujours présent. Par la suite, la dose du contaminant sera trop importante pour que des mécanismes compensatoires interviennent au sein de l'individu et celui-ci atteindra rapidement le seuil de mortalité si il continue d'être en contact avec le xénobiotique. L'acclimatation est la fenêtre entre le seuil d'acclimatation et de sensibilisation. Il semble que chaque métal soit caractérisé par une fenêtre différente qui est elle-même influencée par les variables chimiques de l'eau affectant la toxicité du métal telles que le pH, la présence de certains ions comme le Ca^{2+} ou l'alcalinité.

Cependant, une définition plus restrictive de l'acclimatation est souvent utilisée dans les études toxicologiques. Ainsi, l'acclimatation serait une tolérance accrue à une concentration élevée, souvent létale, d'une substance toxique, suite à une exposition chronique à une concentration sublétale de cette même substance (McDonald et Wood, 1993). Ce processus n'est pas à confondre avec celui de l'*adaptation* qui traduit une tolérance à un xénobiotique inscrite dans le patrimoine génétique des individus suite à une exposition chronique de celui-ci pendant plusieurs générations.
Les critères permettant d'identifier le processus d'acclimatation sont généralement des paramètres physiologiques tels que le taux de croissance, l'osmolalité sanguine ou la consommation en oxygène. Ceux-ci sont comparés avec ceux d'une population contrôle n'ayant pas subi une exposition chronique au polluant. D'autres paramètres évaluant la toxicité aigue sont également étudiés. Ainsi, le TL50 (temps d'exposition au polluant

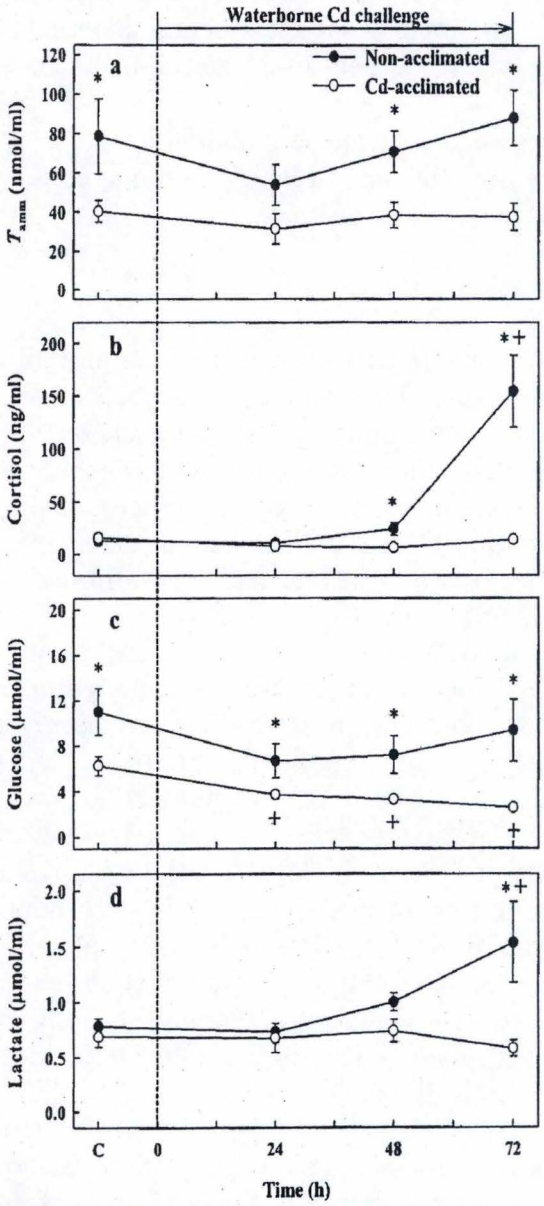


Figure I.14. Indices de stress dans le sang artériel de truites arc-en-ciel Oncorhynchus mykiss avant et après une exposition aigue au cadmium (10µg/l) (Chowdhury et al, 2004).

induisant la mort de 50% des individus exposés) et la CL50 (concentration en polluant induisant la mort de 50% des individus exposés) augmentent lors du processus d'acclimatation.

4.2.1. Acclimatation et cadmium

Les exemples d'acclimatation au cadmium ne manquent pas dans la littérature scientifique et sont réalisés sur un grand nombre d'organismes différents, principalement en milieu aquatique. Chowdhury et al (2004) a étudié les paramètres de stress, la respiration, la balance acide-base ainsi que des facteurs d'ionorégulation et hématologiques chez des truites *Oncorhynchus mykiss* acclimatées au cadmium pendant 45 jours et ayant subi une contamination aigue à ce même métal pendant 72 heures. Il observe que les poissons non exposés préalablement à un régime au cadmium montrent une élévation des paramètres de stress contrairement aux individus acclimatés (Figure I.14). D'autres études sur des daphnies *Daphnia magna* indiquent que, suite à une exposition chronique au cadmium sur 2 à 3 générations, les individus présentaient une augmentation (par un facteur de 7,2) de l'EC 50 après 48 heures en contamination aigue (Muyssen et Janssen, 2004). Silvestre et al (2005b) a observé que des crabes chinois *Eriocheir sinensis* ayant subi une exposition chronique au cadmium (50 µg Cd/l pendant 30 jours) suivie d'une contamination aigue (500 µg Cd/l pendant 3 jours) exhibaient des concentrations ioniques (276 ± 32Mm Na^+) et une osmolalité de l'hémolymphe (508 ± 67mOsm) à des niveaux plus élevés, et proches des individus contrôles, que des crabes directement soumis à la contamination aigue (423 ± 41 mOsm et 201 ± 22 mM Na^+).

Il semble néanmoins que tous les xénobiotiques n'aient pas la capacité d'induire une acclimatation suite à une exposition chronique. Il apparaît même que certaines substances pourraient avoir l'effet inverse, c'est-à-dire de sensibiliser les individus à une exposition aigue ultérieure.

Un autre point intéressant est celui constaté par Klerks (1999) dans une étude portant sur les effets d'une acclimatation à plusieurs polluants chez *Palaemonetes pugio*. Il remarque que lorsque du zinc et du naphtalène sont administrés conjointement, les crustacés ne présentent pas de résistance contrairement à une administration individuelle. Silvestre (2005) propose une explication à ce phénomène en postulant le fait qu'un des xénobiotiques pourrait inhiber les mécanismes de détoxification d'un autre contaminant. Le coût énergétique nécessaire pour détoxifier un des xénobiotiques pouvant rentrer en compétition avec le coût énergétique nécessaire à une autre substance serait une autre explication.

4.2.2. Mécanismes conférant une résistance accrue à des xénobiotiques

Malgré les différentes études relatives à la compréhension des mécanismes intervenant dans le processus d'acclimatation, ce phénomène est loin d'être complètement élucidé. Cependant, nous savons déjà que certaines protéines, appelées *métallothionéines* (MTs), jouent un rôle important dans le cas d'une exposition à des métaux lourds. Ces MTs sont caractérisées par un faible poids moléculaire (de 6000 à 7000 Da) et présentent une grande affinité pour certains métaux lourds tels que le cadmium, le zinc, le cuivre et le mercure (Pérez-Coll et al, 1999). Chez les animaux, elles sont surtout abondantes dans les organes comme le foie, le rein, le pancréas et l'intestin. Au niveau cellulaire, elles se retrouvent généralement au niveau du cytoplasme mais également dans le lysosomes et le noyau. Ces protéines possèdent une composition en acides aminés riches en cystéine s'organisant en clusters (Pérez-Coll et al,

1999). Ceux-ci vont capturer 7 atomes métalliques divalents (Cd^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+},...). Les MTs peuvent donc séquestrer les métaux et permettre ainsi à l'organisme de stocker des quantités importantes de ceux-ci qui ne seront alors plus toxiques. On observe ainsi une corrélation positive entre la présence de cadmium soluble et l'induction de métallothionéines dans la glande digestive d'huîtres *Crassostrea gigas* prélevées en Gironde (Geret et Cosson, 1999). Nous pourrions avancer que leur ubiquité dans le règne animal, ainsi que leur induction par les métaux lourds, en feraient des biomarqueurs potentiels de la contamination de l'environnement. Il est tout de même nécessaire de souligner que la mesure d'autres paramètres est indispensable car la toxicité des métaux dépend en grande partie de ceux-ci.

Cependant, plusieurs études laissent penser que l'induction de MTs ne serait pas le seul mécanisme intervenant dans l'acclimatation. Ainsi, Silvestre et al (2005a) ont observé que seulement 5,5% du cadmium pouvait être séquestré par ces protéines dans les branchies antérieures de crabes *Eriocheir sinensis* acclimaté à ce métal. En réalité, il existe des mécanismes compensatoires impliqués dans la résistance accrue à des xénobiotiques. Parmi ceux-ci, l'activité de la Na^+/K^+-ATPase serait augmentée au niveau des branchies de truites exposées de façon chronique à du cuivre (McGeer et al, 2000).

D'autres mécanismes peuvent également intervenir dans l'acclimatation tel qu'une diminution de la prise de l'agent toxique par un changement de la perméabilité membranaire à ce métal. Ceci conduit à une diminution de son entrée dans les cellules (McDonald et Wood, 1993 ; Hollis et al, 1999). La sécrétion plus importante de mucus par les cellules muqueuses chez les poissons permettrait également à l'organisme une meilleure exclusion du polluant (McDonald et Wood, 1993).

Au niveau cellulaire, il est probable que des mécanismes permettant de réduire les effets d'une exposition à des xénobiotiques sont activés pendant la phase d'acclimatation; toutefois, il reste encore les à découvrir (Silvestre, 2005).

4.2.3. Coûts d'une résistance à des xénobiotiques

Le coût réel de la résistance à des xénobiotiques est toujours en débat puisque les avis et les données divergent à ce sujet. Certains supposent que le coût d'une acclimatation doit être élevé car tous les mécanismes de résistance sont susceptibles d'augmenter la demande énergétique (Calow, 1991). Plusieurs études vont dans ce sens. Ainsi, Baillieul et Blust (1998) ont observés que des daphnies *Daphnia magna*, exposées à du cadmium pendant dix jours, présentaient une diminution de la croissance, de la vitesse de nage et de la consommation en nourriture ainsi que de son assimilation. Muyssen et Jansen (2001) montraient qu'une tolérance chronique au zinc diminuait la survie et la reproduction aussi bien que les réserves énergétiques et la taille du corps chez des daphnies.

Cependant, d'autres auteurs prônent des avis différents au vu de leurs résultats. Ainsi, Hollis et al (1998) ont constaté que l'acclimatation n'induit pas de différence dans la vitesse de nage, la croissance et le métabolisme chez des truites acclimatées au cadmium pendant 30 jours. Des daphnies exposées de façon chronique au mercure présentent une durée de vie plus courte mais pas d'altérations au niveau de la reproduction et de la croissance (Guan et Wang, 2006).

Des changements dans la biologie de reproduction des organismes résistants ont été également observés. Des clones de *Daphnia magna*, exposés de façon chronique au cadmium, donnent naissance à une progéniture plus importante mais où les individus sont de plus petite

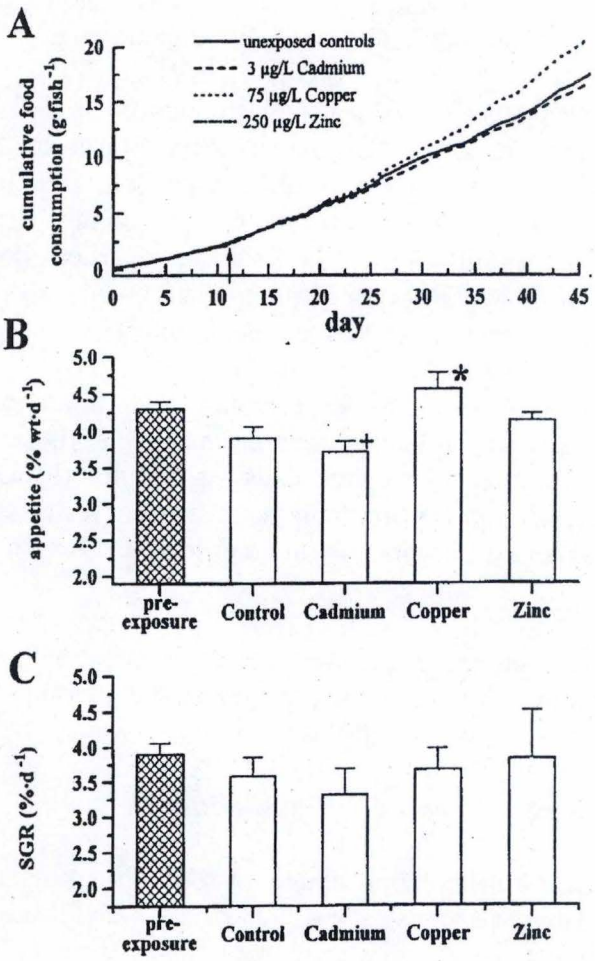


Figure I.15. Effets du cadmium, cuivre et zinc sur l'appétit et la croissance de truites arc-en-ciel Oncorhynchus mykiss exposées de façon chronique à ces différents métaux.
(A) Consommation totale de nourriture ; (B) Consommation journalière de nourriture ; (C) Taux spécifique de croissance (SGR) avant et après l'exposition au cadmium, cuivre et zinc. Exposition chronique pendant 35 jours excepté pour le zinc où la durée d'exposition était de 13 jours. La durée de pré-exposition était de 11 jours (McGeer et al, 1999).

taille. On note également un changement dans l'âge de la première reproduction chez ces mêmes individus (Muyssen et Janssen, 2004).
D'autres auteurs constatent que les coûts d'une acclimatation diffèrent en fonction du contaminant. McGeer et al (2000) observe ainsi que l'appétit de truites *Oncorhynchus mykiss*, exposées chroniquement à des métaux, augmente et diminue lors d'une exposition au cuivre et au cadmium respectivement. La croissance n'est affectée, quant à elle, par aucun des deux métaux lourds (Figure I.15). Il suppose alors que la réponse des truites à une contamination chronique au cuivre implique des coûts métaboliques plus élevés en comparaison à une acclimatation au cadmium pour une même durée d'exposition.

5 Objectifs

De par la littérature scientifique, nous savons qu'une contamination au cadmium a pour conséquence de nombreux dommages physiques, physiologiques mais aussi cellulaires chez les organismes exposés. Dans ce contexte, notre premier objectif sera d'étudier l'effet de ce métal sur la survie et l'osmolalité de l'hémolymphe de crabes chinois *Eriocheir sinensis* exposés à ce métal lourd.

Nous savons également que le cadmium peut être responsable de l'induction d'espèces réactives de l'oxygène et par là, d'un stress oxydant. Nous rappelons que ce dernier est défini comme un déséquilibre entre les systèmes antioxydants et prooxydants dû à une réduction des premiers ou une accumulation excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ou bien des deux, menant à de potentiels dommages cellulaires (Scandalios, 2002). Suite à l'apparition de ce stress particulier, les organismes possèdent, au niveau cellulaire, des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques afin de contrer les effets néfastes du métal.
Silvestre et al (2005a) ont mis en évidence la mise en place d'un processus d'acclimatation chez des crabes chinois exposés une concentration chronique en cadmium. Ce processus permet d'augmenter la tolérance des individus exposés à une concentration élevée, voire létale d'un polluant suite à une exposition chronique de cette même substance (McDonagh et Wood, 1993). Lors d'une étude ultérieure, Silvestre et al (2005b) ont pu montrer la sous ou la sur-expression de protéines, telles que certaines enzymes impliquées dans la défense antioxydante, lors du processus d'acclimatation.
Dans ce contexte, notre second objectif sera premièrement de caractériser l'état de stress oxydant par la réalisation de tests TBARS (*thiobarbituric acid reactive substance*) des crabes exposés au cadmium. Deuxièmement, nous étudierons le rôle des enzymes antioxydantes dans le processus d'acclimatation au cadmium chez ce crustacé. Pour ce faire, nous contaminerons dans un premier temps nos crabes chinois de façon chronique pour ensuite les exposer à une concentration aiguë à ce même métal.

Un troisième objectif, original, sera d'étudier la carbonylation des protéines suite aux différentes expositions au cadmium. Nous savons en effet que les métaux sont susceptibles d'induire des ROS qui sont eux-mêmes responsables de dommages cellulaires tel que l'oxydation des protéines. Nous étudierons ces modifications lors d'une approche protéomique intégrant les techniques des gels en 2D et du Western-Blot. L'originalité de notre travail vient du fait, qu'à notre connaissance, aucune équipe n'a encore étudié ces effets chez le crabe chinois acclimaté au cadmium.

Deuxième partie :
MATERIEL ET METHODES

Figure II.1. Crabe chinois *Eriocheir sinensis*

Figure II.2. Bacs de contamination des crabes chinois au sein de l'URBO

Matériel et méthodes

1) Choix du modèle d'étude

Notre modèle d'étude est le crabe chinois *Eriocheir sinensis* (H. Milne-Edwards, 1854) (crustacé décapode) (Figure II.1). Le choix de cet organisme comme modèle expérimental se justifie amplement. Premièrement, nous voulions travailler sur un organisme pris dans son entièreté et non sur un modèle cellulaire même si ceux-ci ont l'avantage de simplifier les réponses biologiques observables. De plus, le niveau organismique reflète davantage une des préoccupations de notre laboratoire: l'écotoxicologie. Deuxièmement, nous voulions nous focaliser sur un animal présent dans nos rivières. Contrairement aux salmonidés ou aux amphibiens largement étudiés en laboratoire, le crabe chinois est peu utilisé mais présente un atout car est au cœur des préoccupations des gestionnaires en sa qualité d'espèces invasive. Troisièmement, les conditions d'élevage demandent peu de soins particuliers mis à part une eau claire et une bonne oxygénation. Cet animal présente également de grandes facultés d'euryhalinité et ses mécanismes d'osmorégulation sont bien connus. Cela fait de celui-ci un modèle expérimental de premier choix afin d'étudier les effets des xénobiotiques sur l'osmorégulation des crustacés.

2) Capture et acclimatation

La capture des crabes chinois, mâles et femelles confondus, se fit dans un lac d'eau douce près de Emben en Allemagne en octobre 2005. Ils furent ensuite rapatriés aux Facultés universitaires Notre Dame de la Paix à Namur au sein de l'unité de biologie des organismes (URBO) et acclimatés pendant deux semaines (du 20/10 au 5/11) dans des bacs d'environ 60 litres remplis d'eau de ville. Pendant toute la durée de l'expérience, les crabes ont subi un régime de 10 heures de lumière et de 14 heures d'obscurité. L'eau était changée tous les deux jours et les animaux étaient nourris au même intervalle avec des bâtons de surimi préalablement décongelés provenant du supermarché. La nourriture en excès ainsi que les animaux morts étaient retirés et comptabilisés lors du changement d'eau et lavage des bassins. La température et la mesure de l'oxygène dissous furent pris avant chaque changement d'eau. Le pH, NO_2, NO_3 et NH_4 furent mesurés tous les début de semaine.

3) Contamination

L'ensemble des crabes capturés fut séparé en trois groupes de 40 individus, mâles et femelles confondus, et placés dans des bacs de 80 litres remplis d'eau de ville (figure II.2). Nous avons tout d'abord pratiqué une *contamination chronique* au cadmium pendant 30 jours (du 5/11 au 5/12) à deux groupes de crabes. Le premier fut exposé à une concentration nominale de 10 µg Cd/l (C10), le deuxième à 50 µg Cd/l (C50). La solution stock de $CdCl_2$ (Sigma- Aldrich, USA) est de 10 mg/ml (89 mM) soit 1,6 g dans 100 ml d'eau. Le troisième groupe ne fut pas exposé au cadmium pendant la première partie de l'expérience et fut donc utilisé comme groupe contrôle (C0).

Au vu de la mortalité élevée pendant cette première partie d'expérience, l'eau fut changée tous les jours mais nous continuâmes à nourrir les crabes tous les 2 jours. Une semaine avant

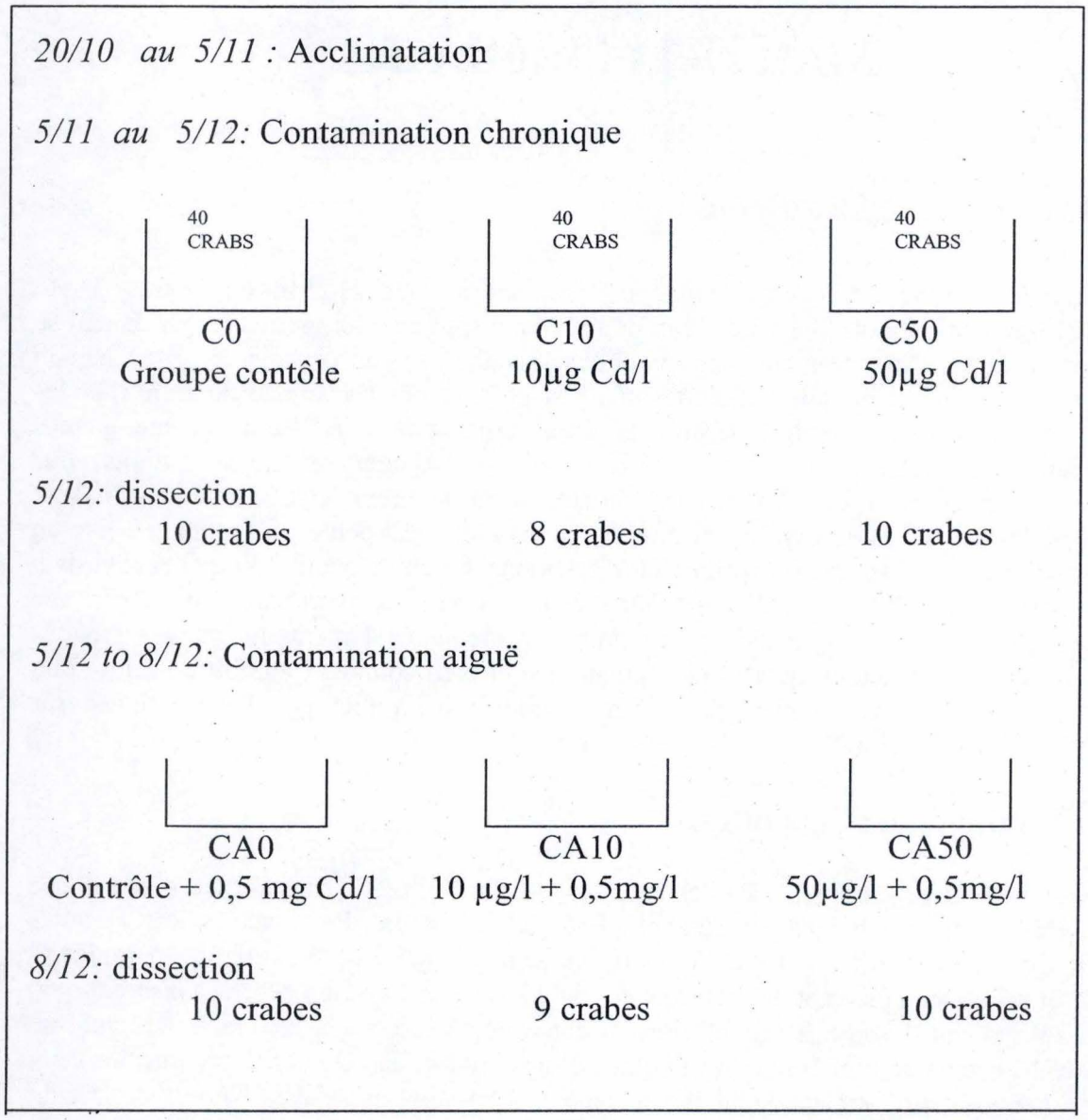


Figure II.3. Schéma expérimental des différentes contaminations au cadmium administrées aux crabes chinois.

la fin de la contamination chronique, les animaux ne furent plus nourris mais l'eau continua d'être changée.
Après 30 jours d'exposition chronique, la moitié des organismes de chaque groupe fut sacrifiée et disséquée.

L'autre moitié des individus fut exposée à une *contamination aiguë* au cadmium pendant 3 jours (du 5/12 au 8/12). On administra à chaque bassin du $CdCl_2$ à raison de 500 µg/l. Ces sous-échantillons furent appelés CA10, CA50, CA0 respectivement. Le 8/12, les individus restants furent sacrifiés et disséqués. Le nombre final de réplicats était de 10 (C0), 8 (C10), 10 (C50), 10 (CA0), 9 (CA10) et 10 (CA50) (figure II.3).
Nous avons défini des conditions expérimentales à la fois les plus réalistes possibles en comparaison avec les conditions naturelles, et à la fois réalisables d'un point de vue pratique. Pour les concentrations dites « aiguës », nous avons choisi une durée de 3 jours à une concentration de 500µg/l sachant que ce choix était arbitraire. Concernant les concentrations dites « chroniques », nous sommes partis de la concentration aiguë pour laquelle nous avons réduit de 10 fois la concentration en cadmium, mais augmenté de 10 fois la durée d'exposition ; ce qui nous a amené à une exposition à 50µg/l pendant 30 jours (C50). L'exposition chronique à 10µg/l pendant 30 jours (C10) était une concentration intermédiaire entre C50 et le groupe contrôle.
Il est vrai que ces concentrations peuvent paraître élevées par rapport aux concentrations retrouvées dans les eaux douces naturelles. Cependant, utiliser des concentrations plus faibles sur une durée d'exposition plus longue allait engendrer des problèmes de captivité chez les animaux ce qui aurait augmenté le risque de résultats biaisés. Il ne faut également pas oublier que des concentrations de 50µg/l ne sont pas tout à fait irréalistes. Elles sont du même ordre de grandeur que ce qui peut être rencontré dans des cours d'eau très fortement pollués.

4) Dissection

Lors des dissections, nous prélevâmes l'hémolymphe des crabes vivants (à la base des pattes et à l'aide d'une seringue) à raison d'environ 5 ml par individu et répartie dans trois épendorfs différents contenant de l'héparine pour empêcher la coagulation, à l'exception d'un seul nécessaire au dosage de l'osmolalité. Ensuite, chaque crabe fut sacrifié aux ciseaux et les organes furent de suite prélevés. Nous prîmes soin de noter pour chaque individu le sexe, le poids, la taille et les remarques éventuelles concernant l'état de santé de l'animal. Trois branchies postérieures et trois branchies antérieures de chaque côté furent prélevées ; une partie servant au dosage des biomarqueurs et l'autre à l'analyse protéomique. L'hépatopancréas et les muscles des pattes furent également échantillonnés (figure II.4). Tous les épendorfs d'un individu furent fixés à l'azote liquide pendant trente secondes après sa dissection et ensuite entreposés à -80°C pour éviter tout risque de détérioration thermique des tissus.

5) Dosage de l'osmolalité

L'osmolalité représente le nombre d'osmoles de soluté par kg de solution. C'est en mesurant le point de congélation que l'osmomètre va déterminer la concentration de la solution. Le principe de la manipulation est le suivant : l'osmomètre va refroidir l'échantillon à quelques degrés en dessous de son point de congélation et va ensuite induire mécaniquement la congélation de celui-ci.

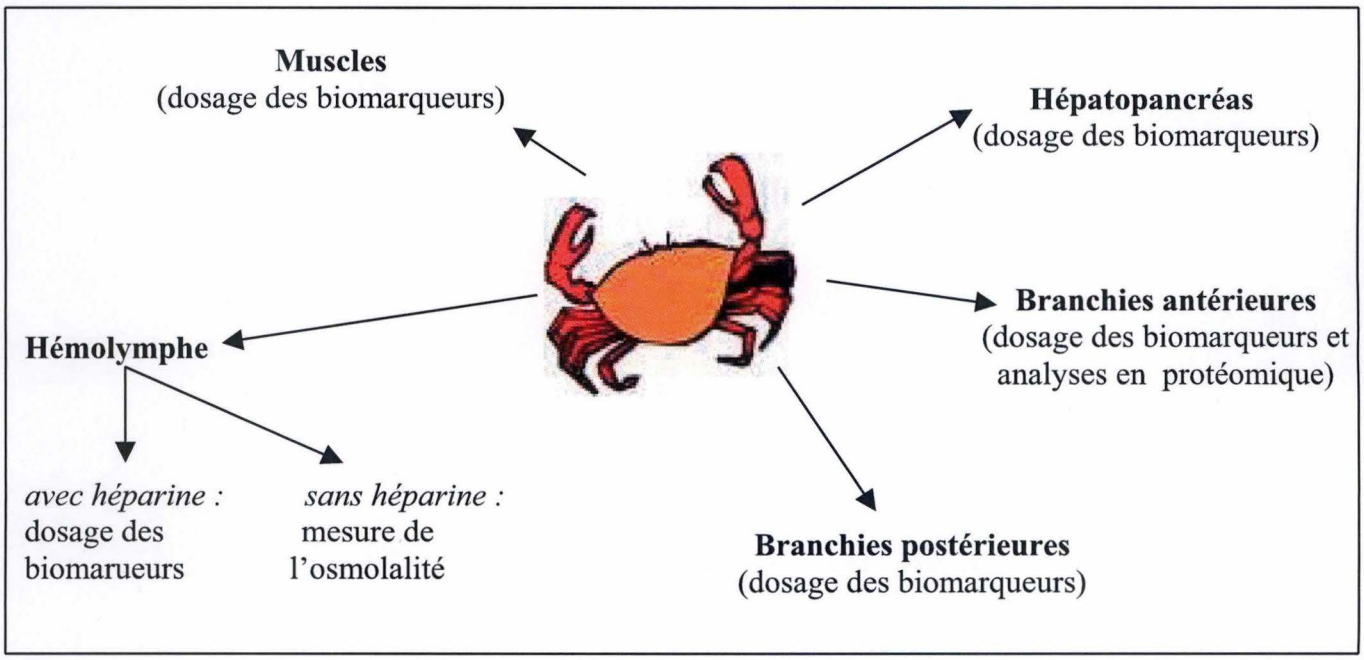


Figure II.4. Schéma résumant les organes prélevés lors des dissections des crabes chinois et leurs utilisations futures lors des manipulations.

Lors du dosage, nous avons donc placé 10µl d'hémolymphe de crabe sans anticoagulant dans une cupule elle-même installée sous l'électrode de l'osmomètre (Fiske, type one-ten). Celle-ci va refroidir l'échantillon et mesurer l'osmolalité.

6) Dosage des biomarqueurs de stress oxydant

Nous allons caractériser l'état des stress oxydant de l'organisme par la mesure des taux de TBARS et par les niveaux d'activité de différentes enzymes antioxydantes. Ainsi, nous doserons le glutathion total (GSH), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR), la glutathion S-transférase (GST), la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) sur l'hépatopancréas, les branchies antérieures et postérieures des crabes soumis aux différentes conditions de contamination.

6.1. Préparation des échantillons et homogénéisation

Afin de doser les biomarqueurs de stress oxydant, une préparation des échantillons et une homogénéisation de ceux-ci sont nécessaires. L'hépatopancréas ou les branchies sont sortis du -80°C et gardés dans la glace pendant la durée du travail. Chaque échantillon est bien épongé à l'aide d'un papier filtre et pesé sur une balance de précision. Il doit atteindre un poids minimal de 0,5 g pour l'hépatopancréas et de 0,11 g pour les branchies afin de disposer de matériel en suffisance pour le dosage des différents biomarqueurs et des protéines. L'échantillon est ensuite homogénéisé dans du tampon d'homogénéisation (KH2PO4 50Mm pH 7,8) préalablement mixé avec des inhibiteurs de protéases (Sigma P2714) dont les concentrations finales sont 1 :10. La dilution de l'échantillon dépend du tissu : nous ajoutons 2,5 ml de tampon pour 0,5 g d'hépatopancréas afin d'obtenir une dilution finale 1 :5 (poids : volume) et 1,1 ml pour 0,11 g de branchies donnant ainsi une dilution 1 :10. Le mélange est ensuite homogénéisé à l'aide d'un potter électrique pendant 2X20 secondes avec un arrêt de 10 secondes pendant lequel l'échantillon est maintenu sur glace. L'homogénat est pesé et le potter rincé avec le volume restant de tampon d'homogénéisation. Ceci a pour but d'éviter toute perte de tissu.

Nous répartissons ensuite l'homogénat dans les différents épendorfs préparés pour les dosages du stress oxydant. Nous prélevons 1 ml (en général) pour la LPO et 500µl pour la GSH, auquel nous ajoutons 500µl de SSA 5%, le reste étant destiné aux autres biomarqueurs. L'ensemble des aliquots est centrifugé à 10 000g pendant 10 minutes à température ambiante (à l'exception de l'homogénat destiné au dosage de la LPO). Les surnageants sont ensuite récoltés (fraction post-mitochondriale) et congelés à -80°C en attendant de réaliser les différents dosages.

6.2. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides, qui est associée au stress oxydant, contribue à la formation de processus pathologiques sévères pour l'organisme étudié. L'oxydation des lipides polyinsaturés implique la soustraction des hydrogènes alléliques, l'insertion d'oxygène moléculaire et a pour résultat la soustraction d'hydrogène par les radicaux hydroperoxyles pour former des lipides hydroperoxydes (LOOHs). Ceux-ci vont générer du malondialdéhyde (MDA) et du 4-hydroxyalkénal sous décomposition.

Principe : Une des techniques les plus employées consiste en l'ajout de *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS) à l'échantillon. Le TBARS réagit avec le MDA et le produit est

lu à 535 nm (Fatima et al, 2000). Une droite de calibration indiquant l'augmentation du MDA permet de calculer la peroxydation des lipides. Celle-ci est exprimée en nmol de MDA/g de tissu.

La procédure expérimentale est détaillée en annexe 1.

6.3. Dosage du glutathion total (GSH)

Le glutathion (gamma-glutamylcysteinylglycine ou GSH) est un tripeptide naturel dont les propriétés de réduction jouent un rôle central dans les voies métaboliques aussi bien que dans les systèmes antioxydants de la plupart des cellules aérobies. La GSH a un rôle critique en tant que coenzyme d'une variété d'enzymes incluant la glutathion peroxydase ; la glutathion S-transférase et les thiol-transférases. Il intervient également dans bon nombre de processus vitaux tel que le maintien du potentiel redox des cellules.

Principe : Afin de doser la concentration en GSH total dans les tissus du crabe, nous utilisons la réaction du GSH réduit avec du DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) qui peut être lue à 412 nm au spectrophotomètre. La forme oxydée du glutathion (GSSG) peut être réduite en GSH par la glutathion-reductase (GR) en présence de NADPH.

La procédure expérimentale est détaillée en annexe 2.

6.4. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

La fonction de la glutathion peroxydase est de détoxifier les peroxydes présents dans les cellules. La décomposition des peroxydes donnant des radicaux extrêmement réactifs, la GPx joue un rôle critique dans la protection de la cellule contre les dommages dus à ces radicaux libres. La GPx catalyse la réduction de l'H_2O_2 en eau et les peroxydes organiques (ROOH) en alcool stable (ROH) utilisant le glutathion comme source de réducteur.

$$ROOH + 2GSH \xrightarrow{GPx} ROH + GSSG + H_2O$$

La technique utilisée ici a été décrite par Flohé et Günzler (1984) et modifiée par Mohandas et al. (1984).

Principe : Le GSSG formé lors de la réaction catalysée par la GPx est instantanément et continuellement réduit par un excès de l'activité de la glutathion réductase qui fournit ainsi un niveau constant de GSH. L'oxydation concomitante du NADPH est mesurée photométriquement à 340 nm. L'activité spécifique est exprimée en nmol de NADPH oxydée par minute et par mg de protéine.

La procédure expérimentale est détaillée en annexe 3.

6.5. Dosage de la glutathion réductase (GR)

La glutathion réductase catalyse la réaction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Il est essentiel pour le cycle rédox du glutathion de maintenir des taux adéquats en GSH. En effet, celui-ci sert d'antioxydant et réagit avec les radicaux libres et les peroxydes

organiques. Il sert également de substrat pour la GPx et la GST dans la détoxification des peroxydes organiques et dans le métabolisme des xénobiotiques respectivement.

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{GR} 2GSH + NADP^+$$

La technique testée a été décrite par Carlberg et Mannervik (1975) et modifiée par Mohandas et al. (1984).

Principe : Le dosage est basé sur l'oxydation du NADPH en $NADP^+$, réaction catalysée par une concentration en GR limitée. La diminution de l'absorption est mesurée à 340 nm pendant 5 minutes. L'activité est exprimée en nmol de NADPH oxydé par minute par mg de protéine.

La procédure expérimentale est détaillée en annexe 4.

6.6. Dosage de la glutathion S-transférase (GST)

La GST réfère à un large groupe de protéines ubiquistes qui catalysent l'attaque nucléophile du GSH sur différentes espèces de composés toxiques. Il s'agit d'une partie des mécanismes des systèmes de défense de l'organisme contre les effets délétères des xénobiotiques. La GST est une enzyme-clé dans l'évaluation du stress oxydant au sein de l'organisme.

$$X + GSH \xrightarrow{GST} GS\text{-}X + H^+$$

La technique testée a été décrite par Habig et al. (1974).

Principe : Le dosage est basé sur la conjugaison du GSH avec le 1-chloro-2,-dinitrobenzène (CDNB) via l'activité de la GST. La réaction est lue à 340 nm pendant 3 minutes à température ambiante. L'activité est exprimée en nmol de CDNB conjugué par minute par mg de protéine en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 9,6 $X10^3$/M cm.

La procédure expérimentale est détaillée en annexe 5.

6.7. Dosage de la catalase (CAT)

La catalase est une des enzymes du système de défense de l'organisme contre l'H_2O_2, un oxydant sévère capable de causer des dommages intracellulaires. Chaque unité de catalase décompose 1 µmol de H_2O_2 par minute à température ambiante et à pH 7.

$$H_2O_2 \xrightarrow{CAT} H_2O + \tfrac{1}{2} O_2$$

Principe : La méthode couramment utilisée pour la détermination de l'activité de la CAT implique la mesure du changement dans l'absorbance à 420 nm. Les critiques de cette méthode incluent l'interférence des UV non spécifiques absorbant les matériaux et qui nécessitent des cuvettes en quartz. Suite à cela, nous avons testé la méthode colorimétrique. L'oxysulfate de titane ($TiOSO_4$) réagit avec l'H_2O_2 qui n'est pas réduit par la catalase après 6 minutes (Baudhuin et al, 1964).

La procédure expérimentale est détaillée en annexe 6.

6.8. Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

La superoxyde dismutase est une famille de métalloprotéines. Ces enzymes catalysent la décomposition du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

La SOD constitue une défense primaire contre les effets toxiques des superoxydes dans les organismes aérobies. Différentes isoformes existent. La plupart ont un atome de cuivre et de zinc au niveau de leur site catalytique alors que d'autres, moins fréquentes, possèdent un atome de manganèse.

Principe : La technique de détermination de l'activité totale de la SOD dans les tissus du crabe à été adaptée de Mockett et al. (2002). Elle utilise la xanthine-xanthine oxydase pour générer de l'O_2^- et la réduction du nitroblue tétrazolium (NBT) en formazan bleu servant d'indicateur de la réaction qui est lue à 560 nm. La SOD transforme l'O_2^- en H_2O_2 ce qui a pour résultat de produire moins de NBT qui réagit avec l'ion superoxyde et donc la solution devient moins bleue. L'unité d'activité SOD est définie comme la quantité d'enzyme qui inhibe la réduction du NBT de moitié.

La procédure expérimentale est détaillée en annexe 7.

6.9. Dosage des protéines par la méthode de Lowry

Le dosage des protéines par la méthode de Lowry nécessaire au calcul de l'activité spécifique de chaque enzyme se déroule comme suit : 10µl de chaque échantillon décongelé à température ambiante est mixé avec 490µl d'eau bidistillée. A cette solution, nous ajoutons 0,5 ml d'hydroxyde de sodium (NaOH), qui a pour but de dénaturer les protéines, et nous laissons agir de 30 minutes à 2 heures à température ambiante. Après ce temps d'incubation, nous ajoutons 5 ml d'un mélange de carbonate de sodium (Na2CO3) 2% , de sulfate de cuivre (CuSO4) et de tartrate dans un rapport 100 :1 :1. On attend environ 15 minutes après avoir vortexé. La dernière étape de la manipulation consiste en l'ajout de 0,5 ml de folin dilué 2X dans de l'eau bidistillée. Après 30 minutes, l'échantillon est prêt à être lu 660 nm au spectrophotomètre.
Le calcul de la quantité de protéine par ml de surnageant est réalisé à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Les étalons contiennent des quantités croissantes de sérum albumine bovine (SAB) à une concentration de 10mg/ml et suivent les mêmes étapes que les échantillons.

7) Analyse protéomique

L'objectif général de notre étude en protéomique était de mettre en évidence d'éventuelles protéines oxydées ainsi qu'une hypothétique acclimatation suite à une exposition au cadmium chronique et aiguë dans des branchies antérieures de crabes chinois *Eriocheir sinensis*.

Pour ce faire, la technique des gels en deux dimensions a été utilisée. Celle-ci permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (p*I*) lors de l'IEF dans un premier temps puis selon leur poids moléculaire à l'aide de gels de polyacrylamide dans un deuxième temps. Nous avons également recouru au marquage de ces protéines carbonylées, appelée

Tableau II. 1. Composition du tampon DLA

	Concentration finale
Urée	7M
Thiourée	2M
CHAPS	4%
Tris	30mM
pH	8,5

Tableau II. 2. Composition du tampon de réhydratation

	Concentration finale
Urée	7M
Thiourée	2M
CHAPS	2%
Bleu de bromophénol	1%
IPG 4-7	0,5%
DTT	0,28%

Tableau II. 3. Composition du tampon de réduction

	Concentration finale
Urée	7M
Thiourée	2M
CHAPS	2%
IPG 4-7	2%
DTT	2%

Tableau II. 4. Programme suivi par l'IPGphor pour des gels de 11cm à pH 4-7

Etape 1 - Step and hold	1h à 500V
Etape 2 - Gradient	1h à 1000V
Etape 3 - Gradient	2h30 à 6000V
Etape 4 – Step and hold	6000V pour 3000Vh (30 min)

dérivatization, puis à leur transfert sur des membranes de nitrocellulose lors du Western-Blot et pour terminer nous avons couplé ces protéines à des anticorps suivi d'une révélation pour rendre visible les spots (Figure II.5). Les différentes étapes se déroulent comme ci-dessous :

7.1. Préparation des échantillons et homogénéisation

Nous avons choisi de travailler avec 3 conditions : la condition contrôle (C0), la condition aiguë (500µg/l) sans exposition chronique préalable (CA0) et la condition aiguë (500µg/l) précédée d'une exposition chronique de 50µg/l (CA50) et cela en triplicat.
Les échantillons destinés à l'analyse protéomique ont été décongelés sur glaçe, bien épongés à l'aide d'un papier filtre et pesés à l'aide d'une balance de précision. Ils furent ensuite mixés individuellement avec du tampon de lyse DLA (Voir tableau II.1. pour la composition) à raison de 10 X le volume d'échantillon. Nous avons ensuite homogénéisé la solution à l'aide d'un potter verre-verre pendant 2X 25 secondes en maintenant l'échantillon sur glace pendant l'intervalle afin d'éviter un réchauffement. L'homogénat fut ensuite transvasé dans un épendorf et puis passé au sonicateur pendant 1X15 secondes.

Les homogénats ont été centrifugés 15 minutes à 12000 g (13000 RPM). Cette manipulation a pour but d'ôter un maximum de parasites tels que les acides nucléiques.

Après la centrifugation, les surnageants ont été récupérés et les protéines dosées en triplicat par la méthode de Bradford (voir point 7.9).

7.2. Electrophorèse en IEF

La première dimension des échantillons débute par une réhydratation des *'strips'* pendant 10 à 20 heures avant l'IEF (*iso-electric focusing*) proprement dite. Elle consiste en l'ajout de 200 µl de tampon de réhydratation (tableau II.2. pour la composition) dans le nombre de rangées voulues du *'Reswelling Tray'* (Amersham Biosciences) pour des *'strips'* de 11 cm. Le gel est ensuite placé face vers le bas dans ce tampon et recouvert par 3 ml de *'cover fluid'* pour éviter tout contact avec l'air.
Après environ 12 heures de réhydratation, nous décongelons les échantillons et prélevons un volume correspondant à 50 µg de protéines. Après plusieurs essais infructueux avec cette quantité, nous avons opté pour l'ajout de 150 µg de protéines. Le même volume de tampon de réduction (tableau II.3 pour la composition) est mixé à l'échantillon et laissé 15 min à température ambiante. Le mélange est ensuite centrifugé à 12000g (13000RPM) pendant 10 minutes. Les gels réhydratés sont placés dans le *'manifold'* (Amersham Biosciences) lui-même posé sur l'IPGphor (Amersham Biosciences). L'étape suivante est le chargement des échantillons dans les cupules appropriées fixées sur les gels. Le programme (tableau II.4.) est lancé pour une durée de 5 heures. La première dimension va donc permettre aux protéines de migrer en fonction de leur pH. Elles s'arrêteront au pH correspondant à leur point iso-électrique.

7.3. Marquage au DNPH (dérivatization)

Le principe de la manipulation consiste au marquage des groupements carbonyles des protéines par du 2,4-dinitrophénylhydrazine (DNPH) menant à la formation d'un composé stable : le 2,4-dinitrophényl hydrazone (DNP). Celui-ci sera reconnu par des anticorps lors de manipulations ultérieures (voir point 7.6).

Tableau II. 5. Composition du tampon d'équilibration

	Concentration finale
Tris HCl 1,5M pH 8,8	0,05 M
Urée	6M
Glycérol 87%	30%
SDS	2%

Tableau II. 6. Composition des gels d'acrylamide de 11cm

	Concentration finale (pour 2 gels)
Acryl./bis 30%-0,8%	12,5 %
Tris 1,5M pH 8,8	0,375 M
SDS 10%	0,1%
APS 10%	0,1%
Temed pur	0,0139%

Tableau II. 7. Composition du tampon d'électrophorèse

	Concentration finale
Tris	25mM
Glycine	192mM
SDS	0,1 %

Tableau II. 8. Composition du tampon de transfert Towbin

	Concentration finale
Tris	25mM
Glycine	192mM
SDS	0,1%
Méthanol	20%

Tableau II. 9. Procédure expérimentale de la coloration Fast Stain

Solution d'incubation de la membrane	Durée d'incubation
Tampon de transfert	5min
Fixateur dilué10X	2-3min
Développeur dilué 7X	1min à température ambiante 30min à 4°C dans le noir
Eau bidistillée froide (4°C)	2min
Scanner la membrane	
Eau bidistillée à 40-45°C	10min
Eau bidistillée à T° ambiante	2X10min

Pour réaliser ce marquage, nous plaçons les strips, préalablement rincés à l'eau pour enlever un maximum d'huile, dans une solution de HCl 2N/DNPH 10 mM pendant maximum 20 minutes. Ils sont ensuite rincés à l'eau bidistillée et neutralisés dans une solution de Tris-base 2M/glycérol 30% pendant 15 minutes.

7.4. Equilibration et 2D

L'équilibration est réalisée dans un tampon d'équilibration (tableau II.5. pour la composition) auquel nous avons ajouté du DTT (PlusOne Amersham Biosciences) à raison de 100mg/10 ml. Les *'strips'* sont placés dans cette solution pendant 15 minutes. Ils sont ensuite placés 15 minutes dans un deuxième tampon d'équilibration, de même composition mais contenant cette fois-ci de l'iodoacétamyde à raison de 250mg/10ml. Le DTT va casser les ponts disulfures au sein des protéines tandis que l'iodoacétamyde va maintenir cette conformation.

Après l'équilibration s'ensuit le chargement des *'strips'* sur les gels d'acrylamide. Ceux-ci ont été coulés la veille au soir à température ambiante (20 à 25°C). La composition des gels se trouve tableau II.6. La préparation d'acrylamide 12,5% doit être réalisée le plus rapidement possible. Le temed est ajouté quelques minutes avant l'utilisation et l'APS est mélangée en dernier. La solution est directement coulée entre des plaques séparées par un *'spacer'* de 1.5mm. Pour terminer, nous ajoutons de l'iso-butanol saturé en eau par-dessus le gel afin d'éviter un contact avec l'oxygène et permettre la polymérisation et nous recouvrons le tout d'un film plastique pour empêcher l'évaporation.
Nous rinçons les strips dans du tampon d'électrophorèse (tableau II.7 pour la composition) et les plaçons sur les gels 2D en veillant à ne pas laisser de bulles d'air entre les deux. Nous scellons le tout avec de l'agarose bien chaude (1,25g/250mg de tampon d'électrophorèse) et nous laissons sécher avant de les placer dans la cuve d'électrophorèse contenant le tampon d'électrophorèse. La migration s'effectue idéalement entre 4 et 5 heures. Nous réglons le programme à 45 mA par gel de 11 cm.

7.5. Western-Blot

Lorsque le front de migration est au bout du gel, nous arrêtons l'électrophorèse et démoulons les gels. Ils sont ensuite équilibrés pendant 5 minutes dans du tampon de transfert (tableau II.8 pour la composition) ainsi que la membrane de nitrocellulose préalablement coupée aux dimensions du gel et trempée dans de l'eau bidistillée. Six papiers blot sont également saturés dans cette même solution. Nous disposons l'ensemble sur l'anode selon la figure II.6. Nous refermons ensuite le couvercle constituant la cathode du western-blot et réglons l'ampérage à 0,8Ma/cm2 pendant 1h30.
Lorsque le programme est terminé, nous retirons délicatement les gels et les membranes et procédons aux étapes suivantes. Lors des mises au point, nous avions opté pour une coloration Fast Stain (tableau II.9 pour la procédure expérimentale) de la membrane permettant de colorer toutes les protéines, carbonylées ou non, présentes sur celle-ci mais les essais furent infructueux ; les spots étant très peu visibles. Les gels étaient, quant à eux, colorés au bleu de Coomassie (R250)(0.05%) mélangé à de l'eau bidistillé, du méthanol et de l'acide acétique en proportion 55 :35 :10. Ils étaient ensuite décolorés dans une solution de même composition en proportion 65 :30 :5 changée plusieurs fois afin d'enlever au maximum le bruit de fond. Cette manipulation avait pour but de visualiser les protéines qui n'avaient pas été transférés sur la membrane de nitrocellulose lors du western blot.
Nous n'avons donc plus réalisé la coloration Fast Stain pour la membrane et à la place, nous l'avons placé dans une solution de blocage à base TBST et de lait en poudre (5%) (tableau

Tableau II. 10. Composition du TBS

	Concentration finale
Trizma	10mM
NaCl	150mM
pH	7,5

Tableau II. 11. Composition du TBST

	Concentration finale
Tween	0,05%
TBS	Voir tableau II.10

Tableau II. 12. Composition de la solution de fixation

	Concentration finale
Ethanol	40%
Acide acétique	10%

Tableau II. 13. Composition de la solution d'incubation

	Concentration finale
Ethanol	33,3%
Na acetate.$3H_2O$	0,5M
$Na_2S_2O_3.5H_2O$	0,008M
Glutaraldéhyde 50%	0,13%

Tableau II. 14. Composition de la solution à l'argent

	Concentration finale
Nitrate d'argent	0,005M
Formaldéhyde 37%	0.012%

Tableau II. 15. Composition de la solution de developing

	Concentration finale
Na_2CO_3	0,23M
Formaldéhyde 37%	0.007%

II.10 et 11 pour la composition) pour la nuit. La coloration des gels au bleu n'était effectuée que si des problèmes se présentaient lors des étapes ultérieures.

7.6. Marquage aux anticorps anti-DNP/HRP

Cette étape va permettre la fixation des anticorps anti-DNP/HRP à la partie DNP de l'hydrazone formée lors de la réaction du DNPH et des groupements carbonyles des protéines. Après avoir lavé la membrane 3X10 minutes dans du TBST, nous ajoutons une solution de TBST contenant 2% de lait de lait en poudre et des anticorps anti-DNP/HRP rabbit (DakoCytomation) dilué 750X (33µl dans 25ml). Nous veillons également à ce que la membrane soit toujours recouverte de solution. Après 1h d'incubation, nous effectuons plusieurs lavages à savoir : 2X dans du TBST (rinçage), 1X15 minutes et 4X5 minutes dans du TBST et pour terminer 1X5 minutes dans du TBS.

7.7. Révélation

Après plusieurs essais infructueux de révélation en chémiluminescence (ECL), nous avons décidé de révéler par une coloration Opti 4CN (BioRad). Cette méthode consiste à mixer de l'eau bidistillée avec le *'diluent'* et le *'substrate'* en proportion 9 :1 :0,2 et à l'appliquer sur la membrane pendant 30 minutes maximum. On veille ensuite à ce que la membrane soit rincée à l'eau claire pendant 15 minutes. C'est après cette manipulation que les spots sont visibles et que la membrane est prête à être scannée.
Le scan des membranes s'effectue à l'aide d'un scanner (Amersham Pharmacia Biotechnology) et du programme Labscan version 5.0 (Amersham Biosciences).

7.8. Coloration du gel à l'argent

Cette manipulation a pour but de rendre visible un maximum de protéines présentes dans l'échantillon chargé dans le puits lors de la première dimension et ayant également subi la deuxième dimension. Cette coloration est beaucoup plus sensible qu'une coloration au bleu (de 0,5 à 1,2 ng contre 36 à 47 ng). Nous avons donc réalisé la coloration d'un gel à l'argent à partir d'un échantillon pris au hasard et ayant été utilisé auparavant. Nous comparerons les spots obtenus sur ce gel avec les spots présents sur chaque membrane de nitrocellulose afin de localiser les protéines carbonylées ce qui devrait permettre une identification ultérieure de ces protéines grâce à la spectrométrie de masse.
Après la 2D, nous fixons le gel obtenu dans un mélange éthanol, acide acétique et eau bidistillée (tableau II.12 pour les concentrations) pendant 30 minutes sous hotte. Ensuite, le gel est mis à incuber toute la nuit à 4°C dans un mélange contenant de la glutaraldéhyde (tableau II.13 pour la composition).
L'étape suivante est précédée d'un rinçage du gel à l'eau claire pendant 3X10 minutes afin d'enlever le bruit de fond. La coloration du gel à l'argent s'effectue à l'abri de la lumière (idéalement en chambre noire) dans une solution contenant du formaldéhyde et du nitrate d'argent (tableau II.14 pour la composition) pendant 30 minutes. Après cette manipulation, il est indispensable de rincer les gels dans de l'eau ultra pure pendant 2X1 minute. Le developing se fait à vue (pendant environ 4 minutes dans notre cas) dans une solution contenant du formaldéhyde (tableau II.15 pour la composition). C'est à ce moment que les spots deviennent visibles. Il est important de ne pas laisser le gel trop longtemps dans la solution afin d'éviter un bruit de fond trop important qui occulterait les spots intéressants. La dernière étape de la coloration consiste à passer le gel dans une solution STOP contenant de *l'éthylenediaminetétraacetic acid disodium salt dihydraté* (EDTA) (tableau II.16 pour les

Tableau II. 15. Composition de la solution STOP

	Concentration finale
EDTA	0,039M

Tableau II. 16. Liste des produits utilisés en protéomique

Produit	Firme
Glycine	Amersham Plus One
Urée	Amersham Plus One
SDS	Amersham Plus One
CHAPS	Amersham Plus One
APS	BioRad
TEMED	BioRad
Tris	Fluka
DTT pour électrophorèse	Sigma
Glycérol 87 %	Merck
Acryl/bis 30 %- 0,8 %	BioRad
$AgNO_3$	Merck
Thiourée	Sigma
Inhibiteurs de protéase	Sigma
IPG buffer 4-7	Amersham
Iodoacétamide	Acros
Agarose	Amersham Biosciences
Isobutanol	Merck
Na acetate.$3H_2O$	Merck
Acide Acétique	Merck
Ethanol	Merck
$Na_2S_2O_3$.$5H_2O$	Merck
Na_2CO_3	Merck
Glutaraldéhyde	Fluka
Formaldéhyde	Sigma
EDTA	Merck
Opti 4 CN	BioRad
Coloration Fast Stain	BioRad
Cover Fluid	Amersham Biosciences

concentrations) et le rinçage dans de l'eau bidistillé pendant 3X5 minutes. Nous conservons le gel dans une solution comprenant du glycérol (10%) le temps de scanner le gel.

La liste des produits utilisés en protéomique se trouve tableau II.17

7.9. Dosage des protéines par la méthode Bradford

Le dosage des protéines par la méthode de Bradford consiste à lire à 595 nm au spectrophotomètre des cuvettes contenant 1 ml de solution Biorad diluée 5X et 10µl de tampon de lyse DLA utilisé lors de l'homogénéisation des échantillons. La même manipulation est réalisée avec 1µl de tampon DLA ; ces échantillons servant de blancs. On réalise également la lecture de 1 ml de solution Biorad (5X) avec 10µl de BSA (10 mg/ml H_2O). Chaque échantillon est mélangé avec 1ml de solution Biorad (5X) et dosé en triplicat. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon est calculée par une simple règle de trois.

8) Traitement statistique des données

Les données brutes obtenues lors des différents dosages sont encodées et traitées dans le logiciel Excel (Microsoft). L'analyse statistique est faite à l'aide du logiciel Statistica. Un test paramétrique est effectué par la méthode de l'analyse de la variance à un critère (ANOVA I). Un seuil de probabilité de 5% est utilisé. Nous avons au préalable vérifié l'homogénéité des variances par le test de Hartley-Bartlett et la normalité de la distribution des points par le test de Kolmogorov-Smirnov. Quand celles-ci ne sont pas homogènes, nous procédons à une transformation logarithmique des valeurs. Si cette dernière ne permet toujours pas d'obtenir l'homogénéité des variances, un test non paramétrique de type Kruskal-Wallis est alors effectué. Lorsque le test de l'ANOVA nous renseigne une différence significative entre des conditions, nous employons le test LSD afin de savoir quel(s) traitement(s) diffère(nt) des autres.
Nous avons également voulu tester si le sexe intervenait dans nos résultats. Pour ce faire, une analyse en ANOVA I intégrant le sexe comme covariable a été effectuée (ANCOVA).

Troisième partie :
RESULTATS

Résultats

Nous rappelons que l'objectif de notre travail était d'évaluer un stress oxydant, par le dosage de biomarqueurs et de manipulations en protéomique, dans des tissus de crabes chinois *Eriocheir sinensis*, suite à une exposition chronique et aiguë au cadmium.

1) Température de l'eau et mesure de l'oxygène dissous lors des contaminations chroniques et aiguës.

1.1. Rappel du protocole expérimental

Après une période d'acclimatation de 15 jours, 120 crabes chinois *Eriocheir sinensis*, séparés en 3 groupes de 40 individus, ont été exposés pendant 30 jours à une concentration de 10µg Cd/l pour le premier groupe (C10) et à 50µg Cd/l pour le deuxième (C50). Le troisième groupe comprenait les individus « contrôles » (C0). Après cette *contamination chronique*, 10 crabes de chaque bac ont été sacrifiés et l'hépatopancréas, l'hémolymphe, les branchies antérieures ainsi que les branchies postérieures ont été prélevés afin de réaliser les différents dosages. Le reste des crabes vivants ont été exposés pendant 3 jours à 500µg Cd/l, représentant ici la *contamination aiguë* (C10+A), (C50+A) et (C0+A). Dix crabes de chaque groupe furent de nouveau sacrifiés et les organes prélevés.

1.2. Température de l'eau

La température a été prise tous les deux jours dés le début des contaminations et ce, pendant toute la durée de l'expérience. A partir du 11/11, elle a été notée tous les jours car, au vu de la mortalité élevée, nous avons choisi de nettoyer et laver les bacs quotidiennement. Les températures représentées dans la figure III.1 sont des données obtenues **avant** le nettoyage de chaque bac. Nous pouvons observer que les températures varient plus ou moins de la même manière dans chaque bac indiquant ainsi que tous les groupes ont subi les mêmes conditions de température en dépit de leur contamination.

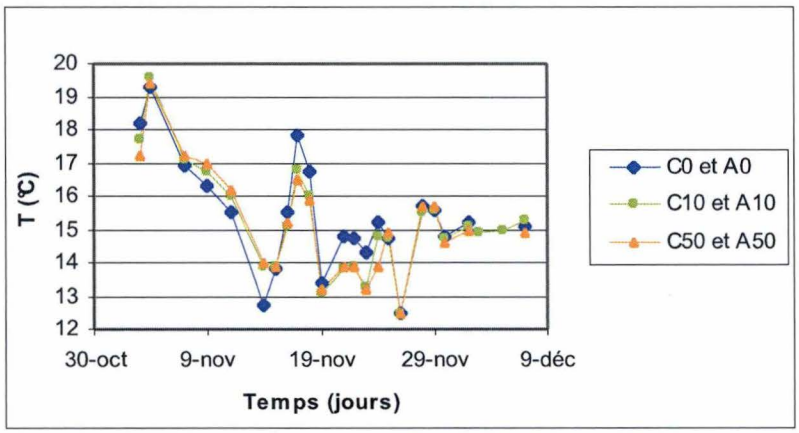


Figure III.1. Températures de l'eau de chaque bac lors des contaminations chroniques et aiguës au cadmium.

1.3. Oxygène dissous

La mesure de l'oxygène dissous à l'aide d'un oxymètre a, comme la température, été prise tous les jours dès le début de l'expérience pour ensuite être notée tous les jours à partir du 11/11 lors du nettoyage quotidien des bacs. Les mesures d'oxygène dissous suivent celles de la température dans les sens où elles varient peu entre les différents bacs. Cela nous montrent également que l'ensemble des crabes contaminés a subi les mêmes conditions environnementales pendant la durée de l'expérience. La figure III.2.retrace les mesures de l'oxygène dissous du 3/11 au 7/12.

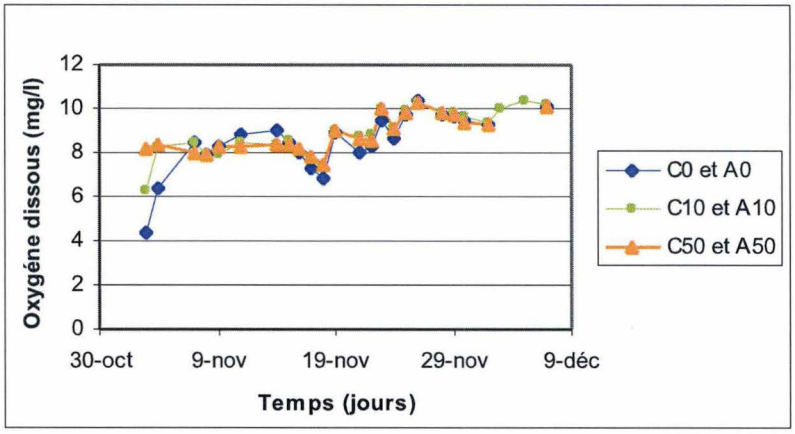


Figure III.2. Oxygène dissous mesuré dans chaque bac lors des contaminations chroniques et aiguës au cadmium.

2) Effet d'une contamination chronique et aiguë au cadmium sur l'osmolalité et le taux de survie des crabes

2.1. Osmolalité

A partir de l'hémolymphe de chaque crabe, nous avons mesuré l'osmolalité. Par un calcul des moyennes et des écarts-types, nous pouvons la représenter sous la forme du graphe suivant (figure III.3) :

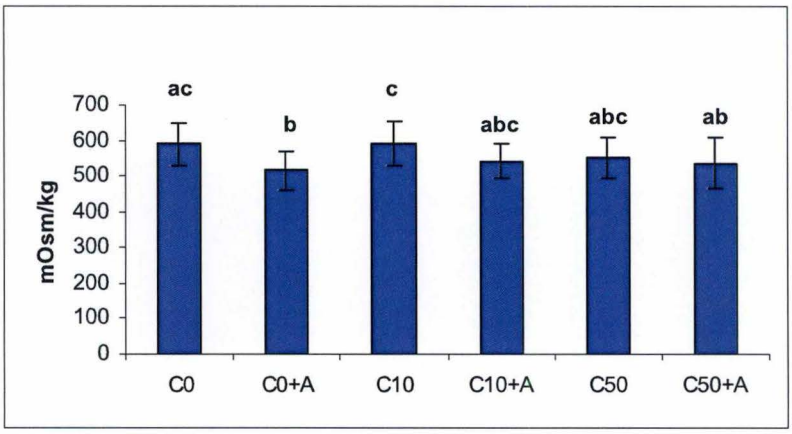


Figure III.3. Osmolalité moyenne de l'hémolymphe de crabes dans chaque condition. Les traitements qui partagent au moins une lettre (a, b ou c) ne sont pas significativement différents (n=10 sauf pour C10 où n=8 et C10+A où n=9).

Nous observons une osmolalité plus ou moins constante dans la plupart des groupes à l'exception de C0+A où celle-ci a tendance à être plus faible en comparaison avec le groupe contrôle et celui exposé à 10 µg Cd/l. En effet, l'osmolalité de C0 est de 590,4 ± 60,3 mOsm/kg et de 591,5 ± 60,6 mOsm/kg pour C10 tandis le groupe C0+A ne montre qu'une valeur de 516,4 ± 54,7 mOsm/kg. Les tests statistiques nous révèlent une différence significative entre ces groupes confirmant la tendance (p=0,04).

2.2. Taux de survie

La figure III.4 illustre le taux de survie des crabes chinois exposés aux différentes concentrations en cadmium. Nous pouvons remarquer que la mortalité est quasi nulle lors des contaminations aiguës contrairement au nombre de morts élevé lors des expositions chroniques ainsi qu'au sein du groupe contrôle. Nous observons en effet qu'approximativement la moitié des individus disparaissent pendant la première moitié de l'expérience. Nous avons également observé l'évolution de la mortalité en fonction du temps (graphe non montré) afin de voir si nous ne pouvions pas établir une corrélation entre cette évolution et les paramètres environnementaux (température et oxygène dissous). Malheureusement, cette tentative ne porta pas ses fruits.

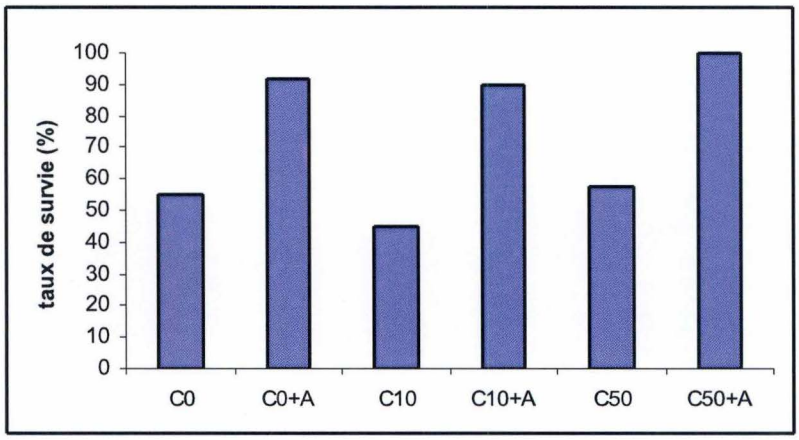


Figure III.4. Taux de survie des crabes chinois pour chacune des différentes conditions. Les valeurs sont exprimées en pourcentage.

3) Dosage des biomarqueurs de stress oxydant

Pour rappel, l'hépatopancréas, les branchies antérieures ainsi que les branchies postérieures de crabes chinois prélevés lors des dissections ont été homogénéisés et centrifugés (à l'exception des échantillons destinés au dosage de la LPO). Les dosages de différents biomarqueurs (GSH, GPx, GR, GST, CAT et SOD) sur les surnageants vont permettre d'évaluer un éventuel stress oxydant dans ces tissus suite à la contamination au cadmium.

3.1. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides a été évaluée par la mesure de la concentration en MDA (malondialdéhyde) dans l'hépatopancréas, les branchies antérieures et postérieures de crabes en fonction des conditions de contaminations. Au niveau de l'hépatopancréas (figure III.5),

les analyses statistiques n'ont pas décelé de différence significative entre les différentes conditions (p=0,188). Nous pouvons tout de même observer une tendance à l'augmentation lorsque la quantité de cadmium administrée augmente. Nous observons également que les conditions chroniques (C0, C10 et C50) montrent des concentrations en MDA similaires. Il en est de même lorsque l'on compare les conditions dites aiguës (C0+A, C10+A et C50+A).

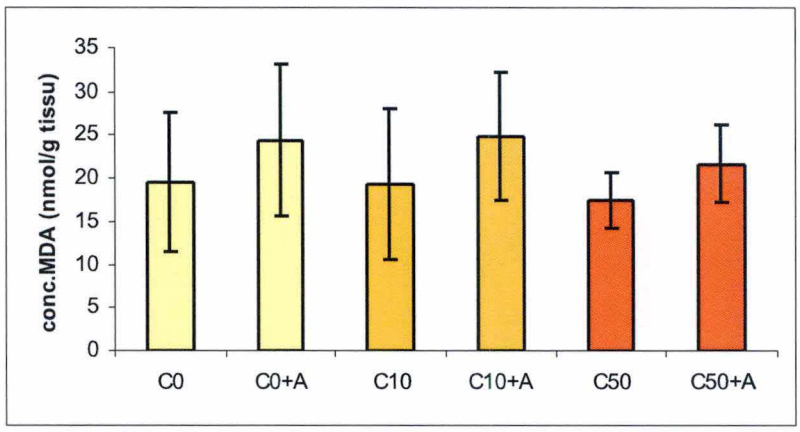


Figure III.5. Peroxydation lipidique exprimée en nmol de MDA/g de tissu en fonction des différentes conditions de contamination (chroniques et aigues) dans l'hépatopancréas de crabes chinois.

Au niveau des branchies antérieures, les concentrations en MDA tendent par contre à diminuer lorsque la dose de cadmium dans l'eau augmente (figure III.6a). Les analyses statistiques nous révèlent des différences significatives entre les conditions (p>0,05). Le test LSD indique que cette différence se marque en faveur du groupe contrôle par rapport aux 5 autres traitements. Cet état de peroxydation lipidique plus important au sein de ce groupe nous a quelque peu interpellé et nous a fait réfléchir sur un éventuel effet du sexe sur les concentrations en MDA en fonction des différentes conditions (figure III.6b). Les valeurs des mâles sont, en effet, plus élevées que celles des femelles en C0. On note ainsi une moyenne de 92,3 ± 36,6 nmol de MDA/g de tissu pour les mâles et de 23,6 ± 8,2 nmol de MDA/g de tissu pour les femelles. Les analyses statistiques confirment cette tendance.
(**C0** $n_M = 6$ $n_F = 4$; **C0+A** $n_M = 5$ $n_F = 5$; **C10** $n_M = 4$ $n_F = 4$; **C10+A** $n_M = 3$ $n_F = 6$; **C50** $n_M = 7$ $n_F = 3$; **C50+A** $n_M = 6$ $n_F = 4$)

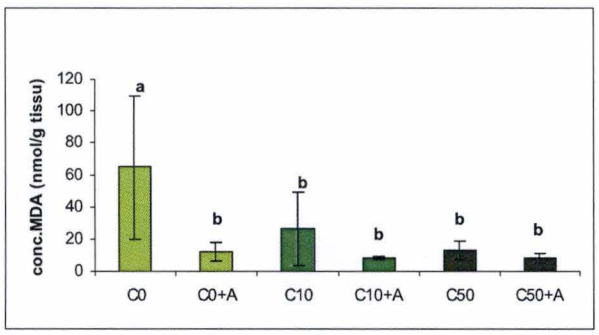


Figure III.6a. Peroxydation lipidique exprimée en nmol de MDA/g de tissu en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies antérieures de crabes chinois.

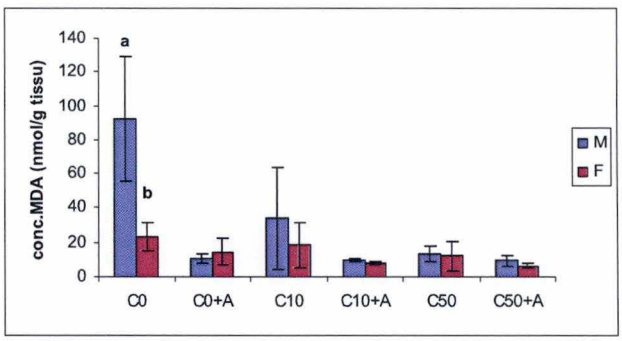


Figure III.6b. Effet du sexe sur la concentration en MDA/g tissu dans les branchies antérieures de crabes chinois en fonction des différentes conditions de contaminations.

Les concentrations en MDA dans les branchies postérieures sont similaires à celles mesurées dans l'hépatopancréas tant au niveau de l'ordre de grandeur qu'au niveau des profils d'activité

des différentes conditions (figure III.7). Nous observons ainsi une augmentation de la concentration, même si celle-ci est moins marquée, lorsque la quantité de cadmium augmente. L'analyse statistique ne révèle pas non plus de différence significative ni entre les conditions (p=0,39), ni entre les sexes (p=0,52).

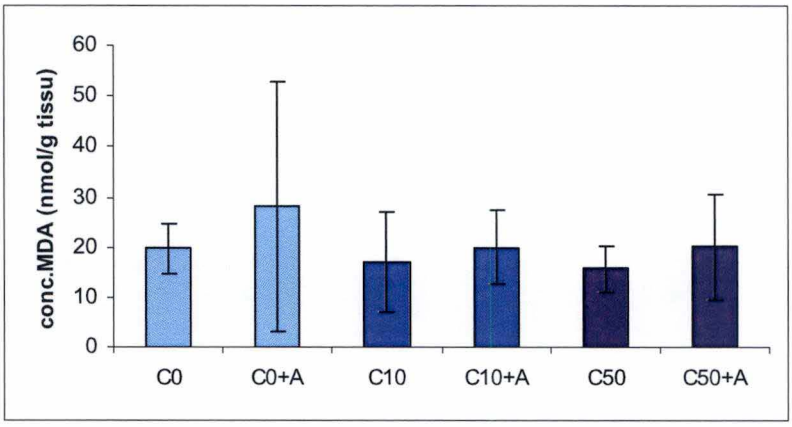


Figure III.7. Peroxydation lipidique exprimée en nmol de MDA/g de tissu en fonction des différentes conditions de contamination (chroniques et aigues) dans les branchies postérieures de crabes chinois.

3.2. Dosage du glutathion total (GSH)

Les résultats du glutathion total nous montrent une tendance similaire dans les trois types de tissus (figures III.8. III.9 et III.10.). Seules les analyses statistiques réalisées pour l'hépatopancréas n'ont pas pu mettre en évidence une différence significative entre les différentes conditions. Si l'on compare les figures III.8.et III.10., nous observons que les concentrations en GSH sont 3 fois plus élevées dans les branchies postérieures par rapport à celles mesurées dans l'hépatopancréas. Respectivement, les valeurs sont de 41,6 ± 27,3 nmol GSH/g tissu contre 136,1 ± 127,6nmol GSH/g tissu.

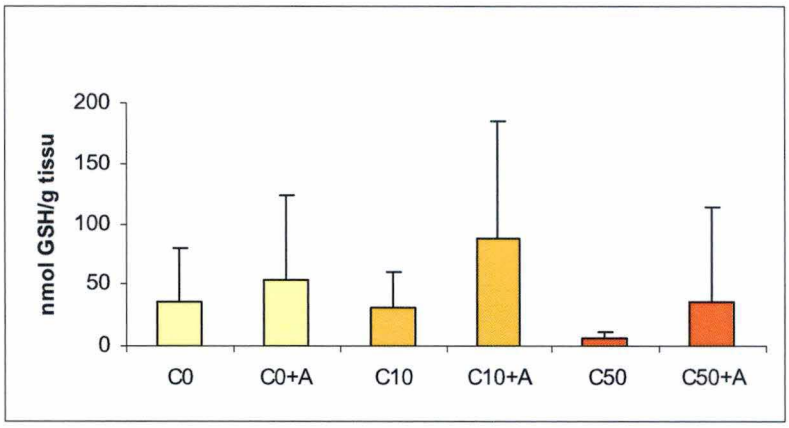


Figure III.8. Mesure du glutathion total exprimée nmol de GSH/g de tissu en fonction des différentes conditions de contamination (chroniques et aigues) dans l'hépatopancréas de crabes chinois.

Les concentrations en glutathion total dans les branchies antérieures sont également très élevées par rapport à celles mesurées dans l'hépatopancréas. Elles sont de 45,1 ± 72,0 pour C0 et peuvent atteindre 855 ± 643,1 nmol de GSH/G de tissu pour C50. Nous observons une très forte augmentation en C50 par rapport aux deux autres conditions chroniques. Par contre,

ce groupe ne présente pas d'élévation significative de l'activité comparé à C50+A (p=0,33) contrairement à C0/C0+A et à C10/C10+A. Certaines valeurs nous semblaient quelque peu particulières ce qui nous a fait réfléchir sur un éventuel effet du sexe sur les concentrations en GSH (figure III.9b). En effet, les femelles du groupe contrôle (C0) présentaient des valeurs de l'ordre de 100 nmol de GSH/g de tissu alors que celles des mâles ne dépassaient pas 3,6 nmol de GSH/g de tissu. Ce résultat peut être comparé avec celui obtenu lors du dosage de la peroxydation des lipides dans les branchies antérieures où contrairement à notre situation, les mâles du groupe contrôle présentaient des valeurs plus élevées que les femelles (figure III.6b). Les analyses statistiques ne révèlent qu'une seule différence significative entre les mâles et les femelles et ce, dans le groupe précité.

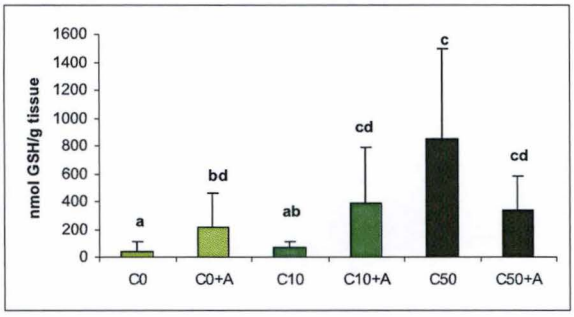


Figure III.9a. Mesure du glutathion total en nmol de GSH/g de tissu en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies antérieures de crabes chinois.

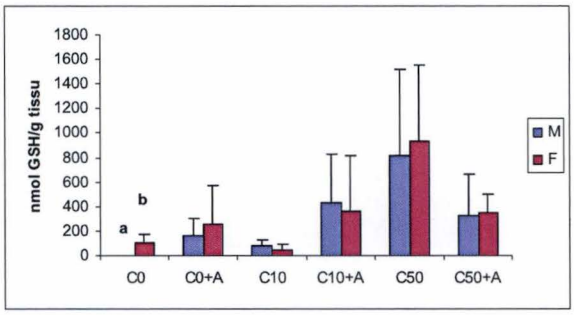


Figure III.9b. Effet du sexe sur les concentrations en GSH dans des branchies antérieures de crabes chinois en fonctions des différentes conditions de contamination.

Les analyses statistiques réalisées afin de voir si un éventuel effet du sexe sur les concentrations en GSH dans les branchies postérieures de crabes chinois était présent, n'ont pas permis de mettre en évidence de différences significatives entre les mâles et les femelles d'une même condition ni même de ceux-ci entre les différents traitements.

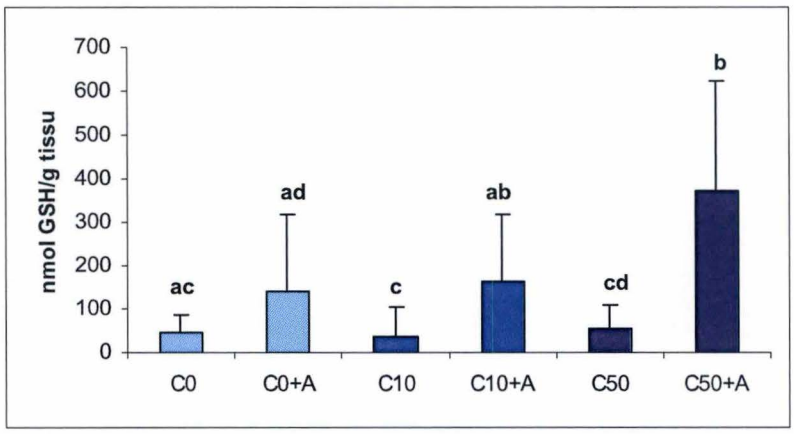


Figure III.10. Mesure du glutathion total exprimée nmol de GSH/g de tissu en fonction des différentes conditions de contamination (chroniques et aigues) dans les branchies postérieures de crabes chinois.

3.3. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

A première vue, l'activité de cette enzyme dans l'hépatopancréas (figure III.11.) ne semble pas beaucoup varier entre les différentes conditions ni même présenter de tendance particulière. Les analyses statistiques ne décèlent pas non plus de différences significatives (p=0,52).

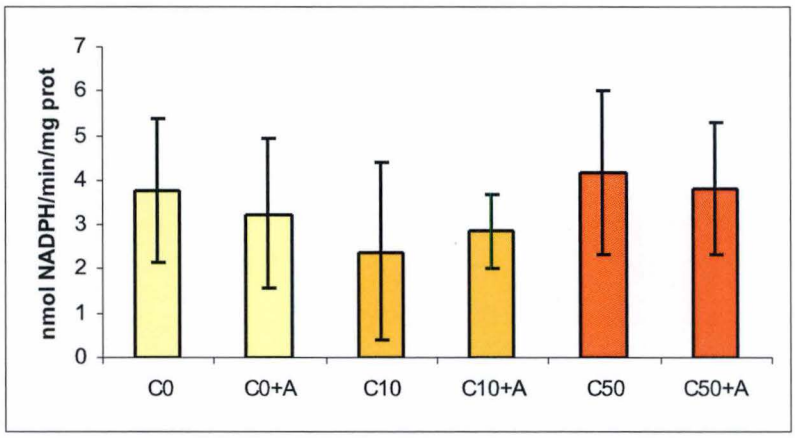


Figure III.11. Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans l'hépatopancréas de crabes chinois.

Contrairement à ce que l'on observe dans le premier tissu, l'activité de la GPx semble augmenter en fonction de la concentration en cadmium dans les branchies antérieures et postérieures (figure III.12 et III.13). Les activités sont du même ordre de grandeur dans les trois types de tissus, aux environs de 4 à 5 nmol de NADPH/min/mg de protéine. Par contre, les analyses statistiques ont pu mettre en évidence des différences significatives entre les différents traitements. Ainsi, au niveau des branchies antérieures, les conditions de contamination aiguë sur les individus contrôles (C0+A) et intermédiaires (C10+A) sont significativement différentes des conditions chroniques (C0 et C10) alors que les individus exposés de façon aiguë et ayant subi une contamination chronique de 50µg/l au préalable (C50+A) ne montrent pas de différence significative. Celles-ci sont en effet de 2,5 ± 0,6 nmol NADPH/min/mg prot en C50 et de 3.6 ± 1,5 nmol NADPH/min/mg prot en C50+A.

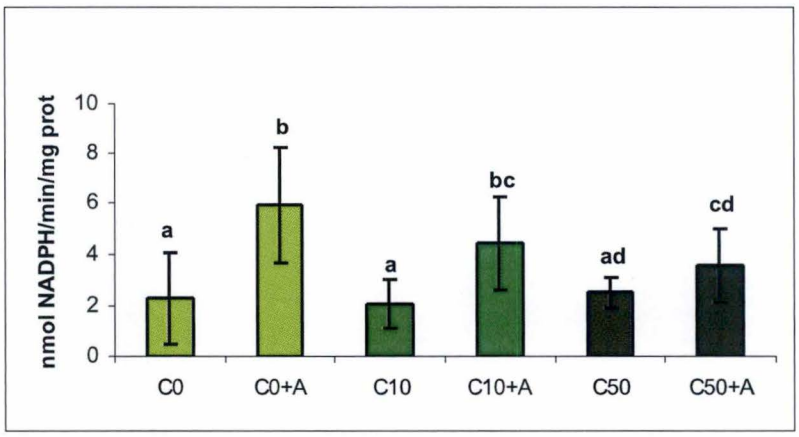


Figure III.12. Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies antérieures de crabes chinois.

Au vu des résultats statistiques, l'activité de la GPx dans les branchies postérieures de crabes semble être relativement constante en fonction des différentes conditions. Seules les situations de contamination aiguë sans exposition chronique au préalable (C0+A) et avec cette exposition (C50+A) présentent des activités significativement différentes de C0 et C50, respectivement.

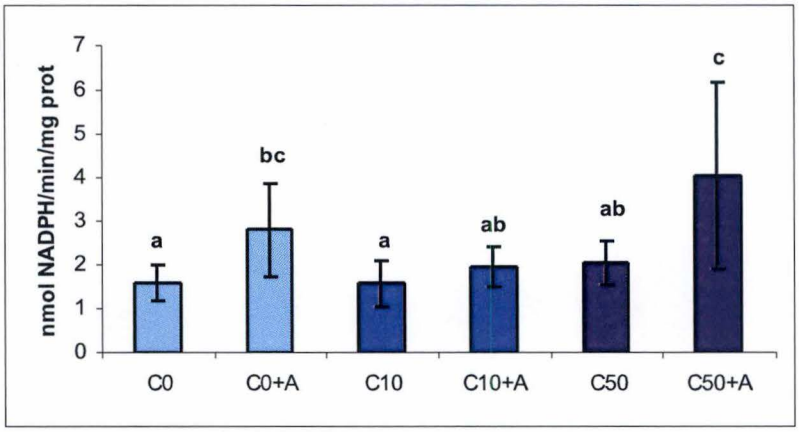


Figure III.13. Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies postérieures de crabes chinois.

3.4. Dosage de la glutathion réductase (GR)

Les figures III.14., III.15.et III.16.nous montrent les résultats obtenus concernant l'activité de la glutathion réductase au sein des trois tissus étudiés. Dans l'ensemble, aucune tendance ne peut être mise en évidence. Les analyses statistiques ne dévoilent pas de différences significatives si ce n'est des valeurs plus faibles pour C10 et C10+A dans les branchies postérieures (figure III.16). Les activités sont légèrement plus élevées dans les branchies postérieures par rapport aux deux autres tissus, avec des valeurs maximales de 631,2 NADPH/min/mg de protéine en C0. Les branchies antérieures exhibent des concentrations maximales de 415,7 NADPH/min/mg de protéine en C50 alors que ces valeurs ne dépassent pas 345,6 NADPH/min/mg de protéine dans l'hépatopancréas (C10+A).

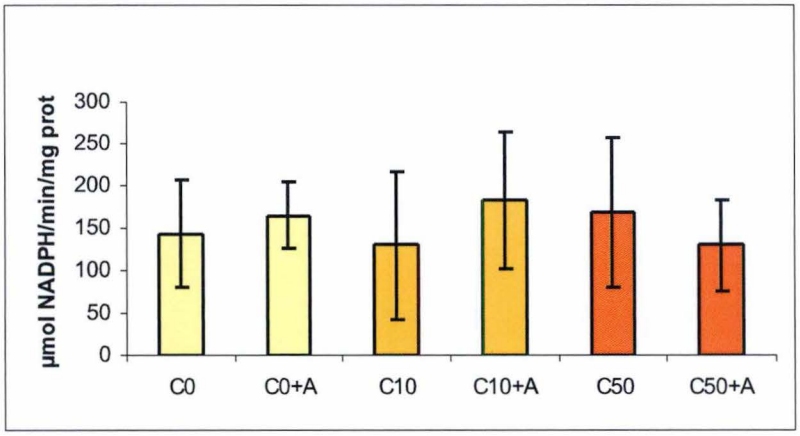


Figure III.14. Activité de la glutathion réductase (µmol NADPH/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans l'hépatopancréas de crabes chinois.

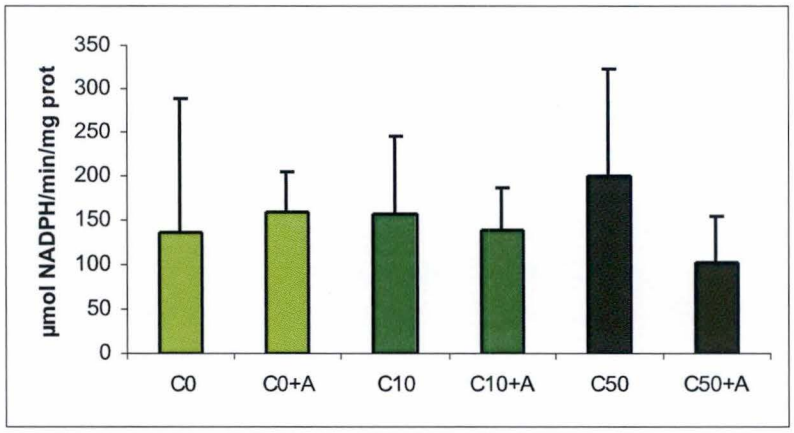


Figure III.15. Activité de la glutathion réductase (µmol NADPH/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies antérieures de crabes chinois (n=10 (C0), n=4 (C10), n=7 (C50), n=5 (C0+A), n=7 (C10+A) et n=8 (C50+A).

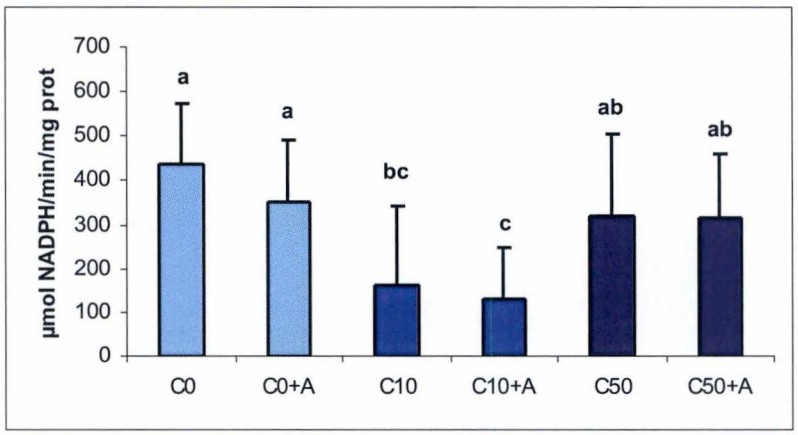


Figure III.16. Activité de la glutathion réductase (µmol NADPH/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies postérieures de crabes chinois.

3.5. Dosage de la glutathion S-transférase (GST)

La figure III.17 illustre l'activité de la glutathion S-transférase dans l'hépatopancréas de crabes chinois exposés à diverses concentrations en cadmium.

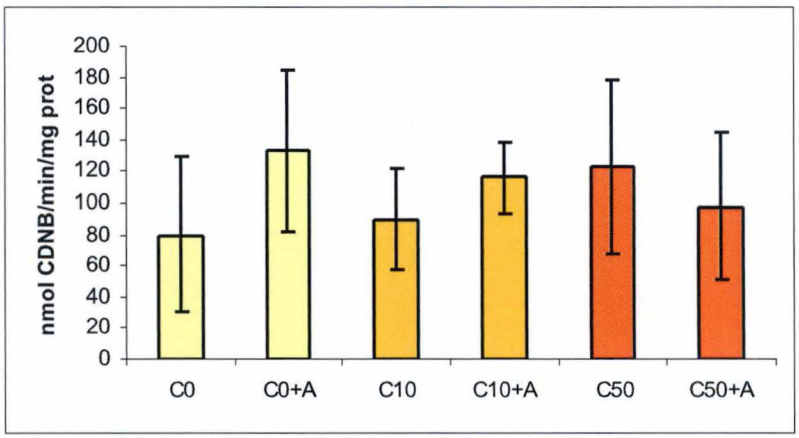


Figure III.16. Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans l'hépatopancréas de crabes chinois.

Lorsqu'on observe l'ensemble des résultats obtenus concernant l'activité de la GST dans les trois tissus étudiés, nous remarquons une tendance similaire à l'augmentation des activités lors des contaminations aiguës. Au niveau de l'hépatopancréas (figure III.17), le test de l'ANOVA n'a pas révélé de différence significative entre les différentes conditions (p=0,1).

Contrairement au premier tissu étudié, les activités dans les branchies antérieures présentent des différences significatives entre les divers traitements au cadmium (figure III.17). Le test LSD nous renseigne sur des différences entre les conditions chroniques et aiguës pour les individus contrôles (C0<C0+A) et pour les doses intermédiaires (C10<C10+A). Par contre, nous n'observons pas de différences dans l'activité enzymatique entre les individus exposés chroniquement au cadmium (C50) et ceux exposés de façon aiguë à ce même polluant mais ayant subi une contamination chronique précédemment (C50+A) (p= 0,08). Ces valeurs sont de 103,7 ± 35,9 nmol CDNB/min/mg prot pour la condition C50 et de 123,1 ± 26,2 nmol CDNB/min/mg prot pour la condition C50+A.

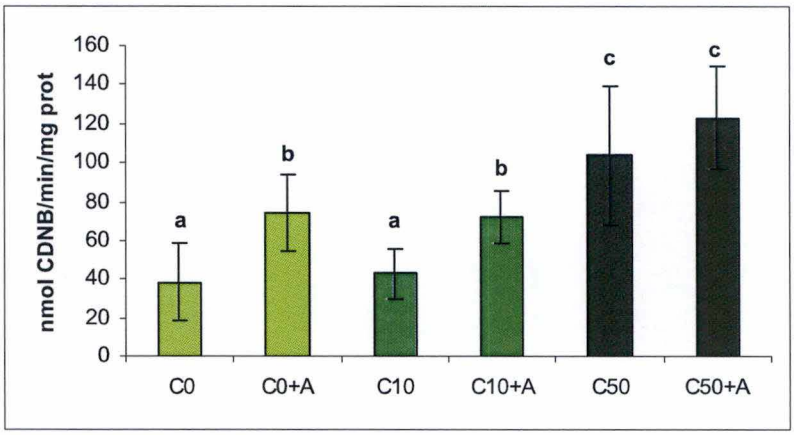


Figure III.17. Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies antérieures de crabes chinois.

La figure III.18.illustre l'activité de la GST au niveau des branchies postérieures. Les activités sont légèrement inférieures à celles observées dans l'hépatopancréas et les branchies antérieures. En effet, la valeur maximale s'élève à seulement 81,7 nmol CDNB/min/mg prot en C50+A dans ce tissu alors qu'elle est de 153,5 nmol CDNB/min/mg prot en C50+A dans les branchies antérieures et de 182,5 nmol CDNB/min/mg prot en C0+A dans l'hépatopancréas. Le test LSD permet de mettre en évidence des différences significatives entre les conditions chroniques et aiguës sauf entre les individus contrôles et leurs condisciples ayant reçu 500µg Cd/l (C0 et C0+A) (p=0,064).

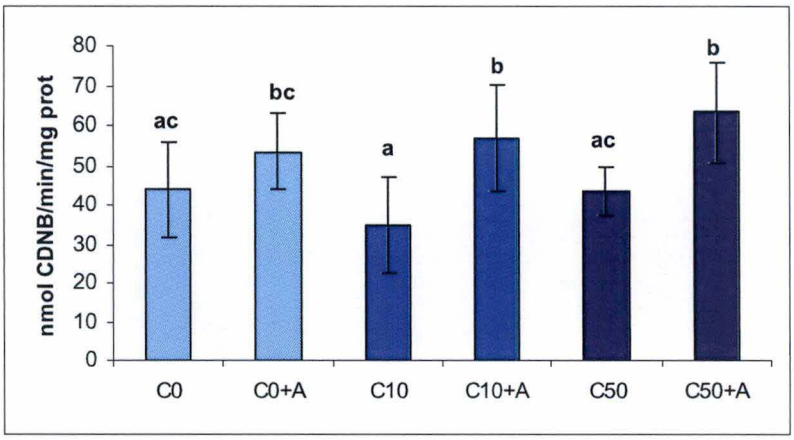


Figure III.18. Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies postérieures de crabes chinois.

3.6. Dosage de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase dans l'hépatopancréas, tout comme dans les branchies antérieures, ne présente pas de tendance particulière. Elle est extrêmement faible, au seuil de la détection pour le premier tissu, avec des valeurs maximales de 0,0009 ± 0,0006 U/mg de protéine pour le groupe C0+A (figure III.19). Le test de l'ANOVA ne révèle pas de différence significative entre les traitements.

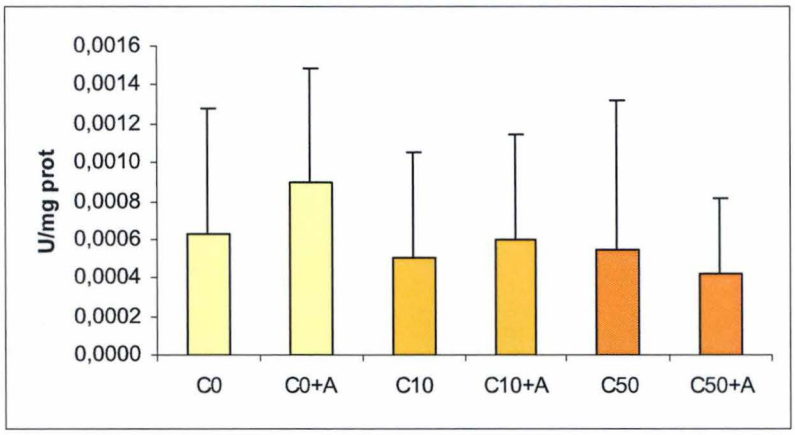


Figure III.19. Activité de la catalase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans l'hépatopancréas de crabes chinois.

La figure III.20.illustre l'activité de la catalase dans les branchies antérieures. Les concentrations sont légèrement supérieures à celles observées dans l'hépatopancréas et dans les branchies postérieures. La valeur maximale est, ici, de 0,02 ± 0.01 U/mg de protéine pour le groupe C50. L'activité enzymatique reste donc constante, observation confirmée par les analyses statistiques qui ne décèlent pas de différences significatives entre les conditions.

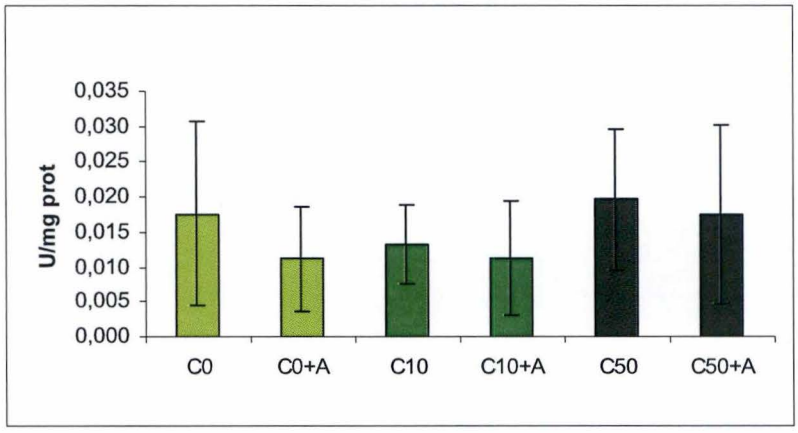


Figure III.20. Activité de la catalase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies antérieures de crabes chinois.

L'activité de la catalase ne semble pas davantage évoluer en fonction des différents traitements au cadmium dans les branchies postérieures (figure III.21). Même si l'on remarque une tendance à l'augmentation en fonction de la quantité de cadmium présent dans l'eau, il faut garder à l'esprit que les valeurs sont extrêmement faibles pour conclure à une véritable élévation de l'activité. Le test de l'ANOVA ne permet pas de mettre en évidence une différence significative entre les conditions (p=0,12).

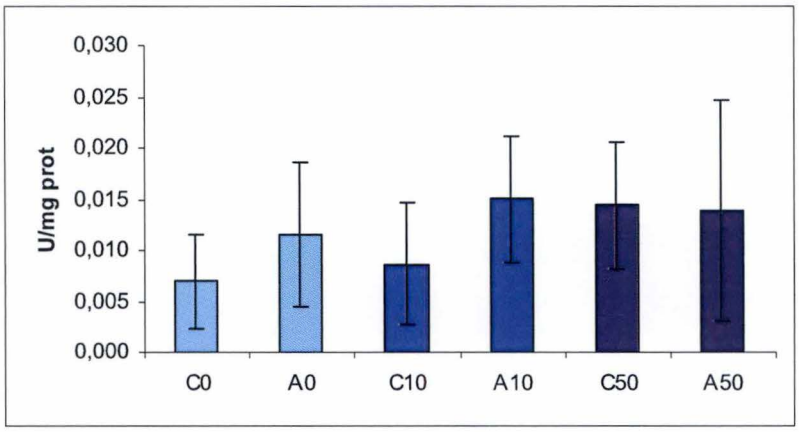


Figure III.21. Activité de la catalase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination dans les branchies postérieures de crabes chinois.

3.7. Dosage de la superoxyde dismutase totale (SOD)

Tout comme pour le dosage de la catalase, les résultats obtenus pour l'activité de la superoxyde dismutase ne sont pas fructueux. Dans l'ensemble, pour les trois types de tissus, nous observons une tendance à l'augmentation de l'activité enzymatique en fonction de la concentration en cadmium présente dans l'eau à l'exception des groupes C50 et C50+A pour lesquels l'activité semble ne pas varier voire même semble diminuer (figure III.22, III.23, III.24). La variabilité au sein des conditions étant très importantes, les tests statistiques ne décèlent pas de différences significatives entre les différentes conditions (p=0,31 pour l'hépatopancréas ; p=0,6 pour les branchies antérieures et p=0,46 pour les branchies postérieures).

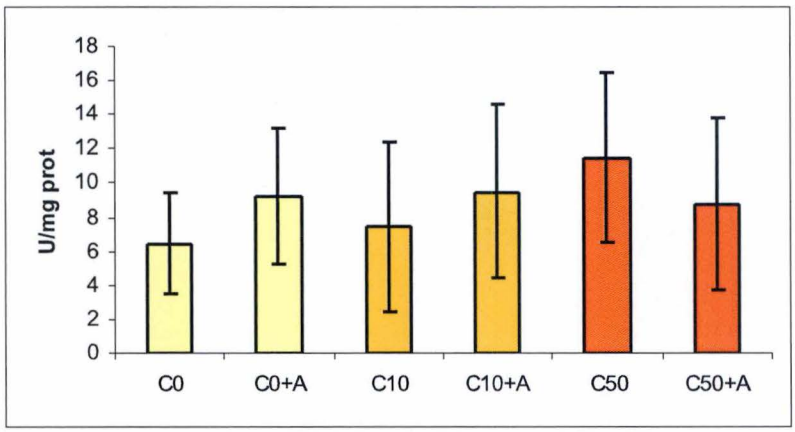


Figure III.22. Activité de la superoxyde dismutase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination au cadmium dans l'hépatopancréas de crabes chinois.

L'activité de la SOD est environ 2 fois plus élevée dans les branchies postérieures en comparaison à celle présente dans les branchies antérieures. En effet, nous obtenons respectivement une moyenne de 40,3 ± 8,26 U/mg de protéine pour l'ensemble des conditions dans le premier tissu et une moyenne de 20,1 ± 2,6 U/mg de protéine pour l'ensemble des conditions dans le deuxième.

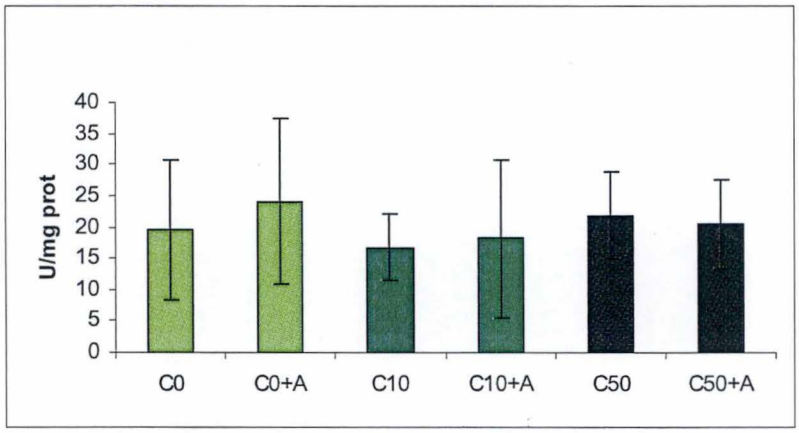


Figure III.24. Activité de la superoxyde dismutase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination au cadmium dans les branchies postérieures de crabes chinois.

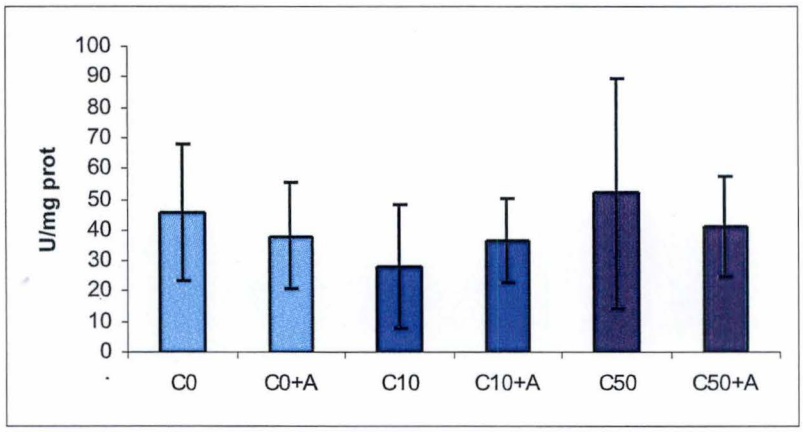


Figure III.23. Activité de la superoxyde dismutase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions de contamination au cadmium dans les branchies antérieures de crabes chinois.

4) Approche protéomique

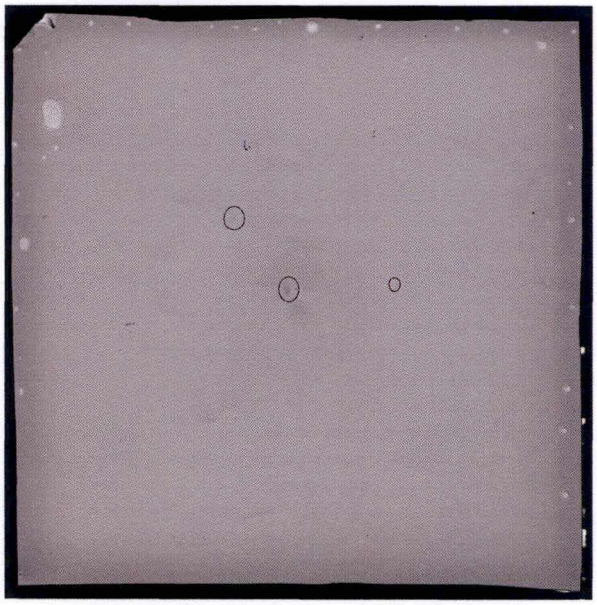
4.1. Rappel du protocole expérimental et objectif de l'analyse

Le but de notre étude en protéomique était de mettre en évidence des protéines carbonylées dans les tissus d'individus exposés à différentes concentrations en cadmium. Pour parvenir à nos objectifs, nous avons utilisé la technique des gels en deux dimensions après avoir homogénéisé les échantillons, ainsi qu'une dérivatization au DNPH permettant de mettre en évidence les protéines carbonylées après un marquage avec des anticorps spécifiques (voir matériel et méthodes point 7).

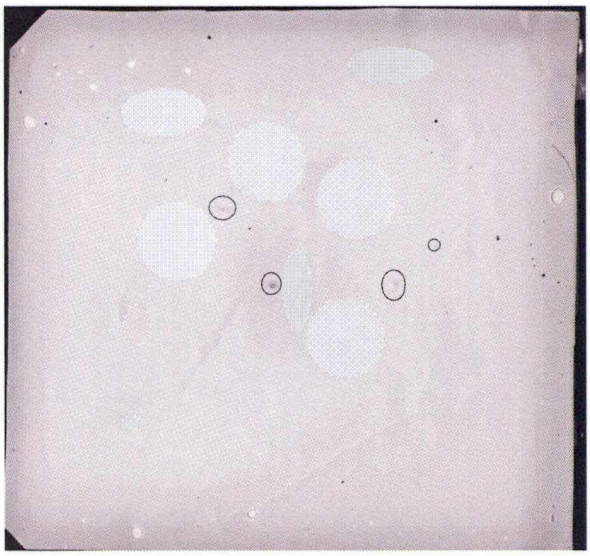
4.2. Carbonylation des protéines

Au vu des résultats obtenus avec les dosages des biomarqueurs de stress oxydant, nous avons décidé de travailler avec des échantillons de branchies antérieures. C'est en effet ce type de tissu qui présente les meilleurs résultats avec l'ensemble des biomarqueurs. Nous avons également convenu d'étudier les conditions « contrôle » (C0), de contamination aiguë directe

a)



b)



c)

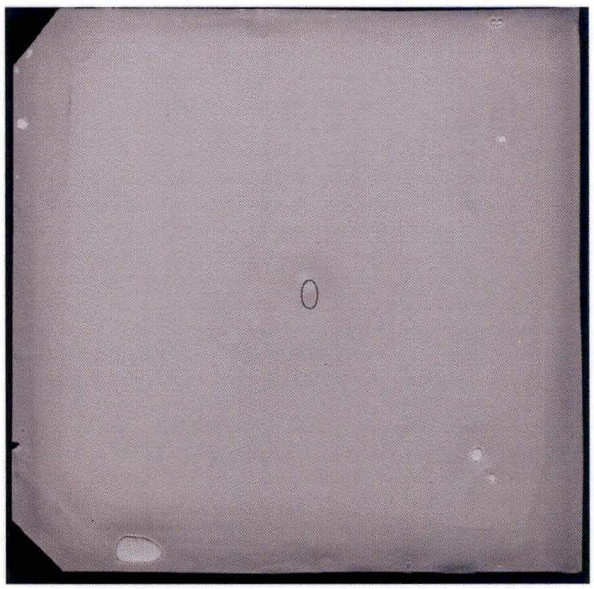


Figure III.25. Mise en évidence de protéines carbonylées sur les membranes de nitrocellulose après révélation par Opti 4CN pour les 3 réplicats de C0 (a, b et c) dans les branchies antérieures de crabes chinois.

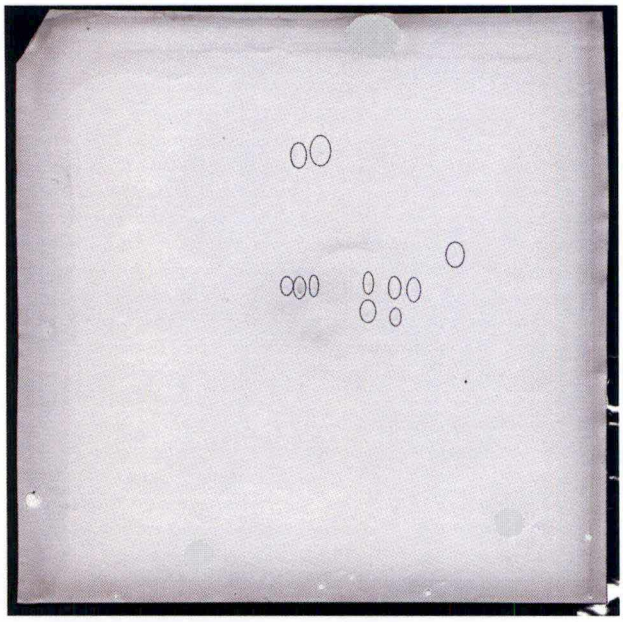
(C0+A) et de contamination aiguë avec exposition chronique au préalable (C50+A). Ce choix va permettre d'observer chacune des conditions par rapport à la situation contrôle et voir si une acclimatation pourrait induire ou réprimer une éventuelle carbonylation des protéines, en comparant C0+A à C50+A. Pour chaque condition, nous avons travaillé en triplicat.

Nous avons tout d'abord réalisé quelques mises au point de la technique adaptée de McDonagh et al, 2005. Ces techniques nous ont permis de mettre au point la quantité de protéines à charger lors de la première dimension, de trouver la meilleure durée de transfert du gel sur la membrane de nitrocellulose pendant le Western-Blot ainsi que de repérer la technique de révélation des membranes optimale. Les précédentes études réalisées en protéomique (Silvestre et al, 2005) nous ont permis de connaître la zone de pH où se concentrait un maximum de protéines. Nous avons ainsi travaillé avec des IPG à pH 4-7.

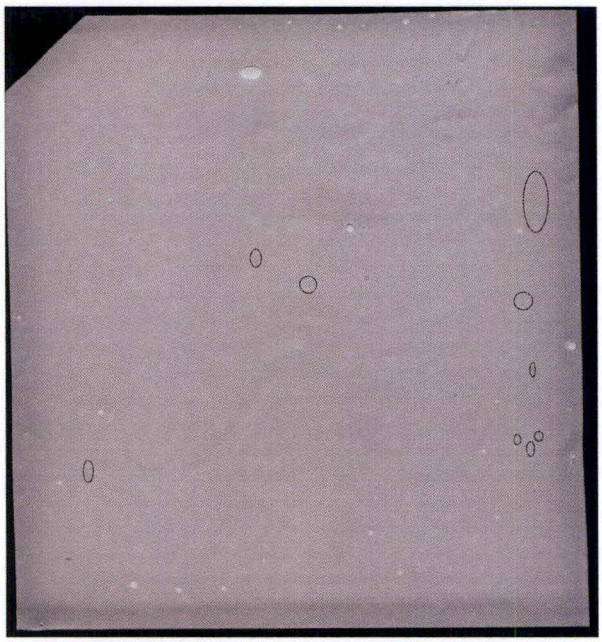
Une fois terminé les manipulations et le *'scan'* des gels et des membranes, nous nous sommes concentrés sur l'analyse des spots obtenus. Celle-ci s'est tout d'abord déroulée en travaillant condition par condition. Les 3 membranes de nitrocellulose par condition ont été comparées l'une avec l'autre afin de réaliser un gel « moyen » regroupant les spots présents sur au moins deux des trois membranes (figure III.25 a, b et c ; figure III.26 a, b et c ; figure III.27 a, b et c). Nous avons ainsi observé un nombre de 3 spots pour la condition C0 (figure III.28), un nombre de 9 spots pour la condition C0+A (figure III. 29) et un nombre de 38 spots pour la condition C50+A (figure III.30). En examinant les membranes individuelles, nous pouvons observer que certaines présentent peu de spots contrairement aux autres de la même condition. On pourrait se poser la question concernant la fiabilité des résultats obtenus, il est vrai que 3 réplicats par traitement est un nombre limite pour effectuer une analyse statistique mais nous pouvons également ajouter que plus l'échantillon présente une quantité importante de protéines, plus l'intensité de carbonylation augmente (McDonagh et al, 2005).

Les gels moyens ont ensuite été comparés entre eux afin de retrouver le maximum de spots présents sur les trois gels à la fois. La réalisation d'un gel à l'argent nous a permis de retrouver les protéines carbonylées dans nos différentes conditions parmi l'ensemble des protéines présentes dans notre échantillon (figure III.31). Malgré un bruit de fond important, nous avons pu discerner les protéines qui nous intéressaient. Les spots entourés en jaune sont ceux qui se retrouvent dans les trois conditions, ils sont au nombre de trois étant donné que la condition contrôle présentait cette quantité. Nous avons ensuite entouré en vert les spots se retrouvant dans la condition C0+A et C50+A, ils sont au nombre de 6. Les spots entourés en rouge sont ceux qui se retrouvent uniquement dans la situation C50+A, c'est-à-dire dans les branchies d'individus exposés de façon aiguë au cadmium et ayant subi une contamination chronique à ce même métal au préalable. Nous remarquons qu'aucun spot n'est présent dans la condition C0+A sans être présent également dans la condition C50+A. Il en est de même pour les spots de la condition contrôle par rapport à ceux des deux autres traitements.
Lorsqu'on analyse l'ensemble des spots, entourés sur le gel à l'argent (figure III.31), représentant les protéines carbonylées lors d'une contamination au cadmium selon différents traitements, nous remarquons que celles-ci sont, pour la plupart, de haut poids moléculaire puisque se concentrent dans la première partie du gel (sur la hauteur). Elles ont également un pH intermédiaire entre 4 et 7 puisque nous observons la majeure partie des spots, au milieu, entre le pôle positif (basique) et le pôle négatif (acide).

a)



b)



c)

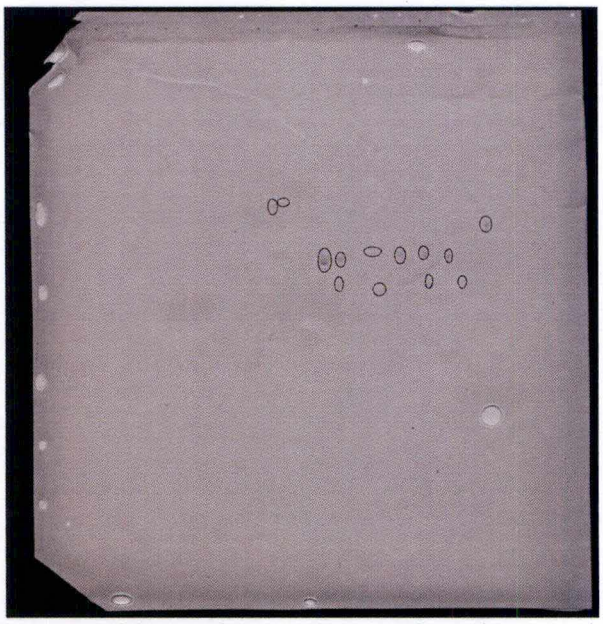
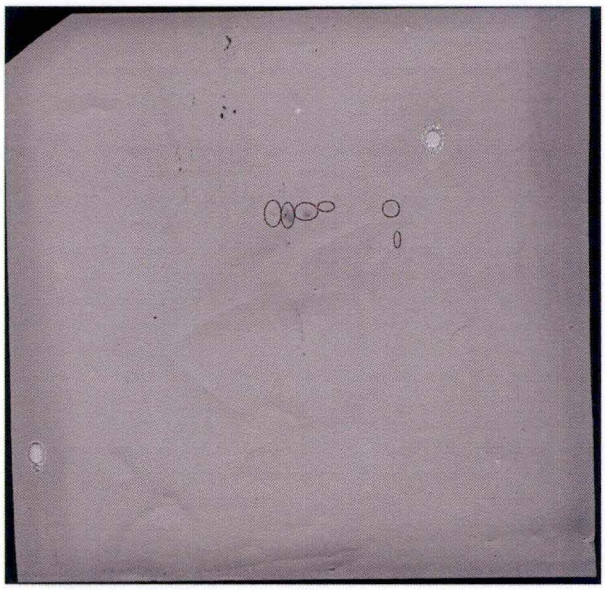
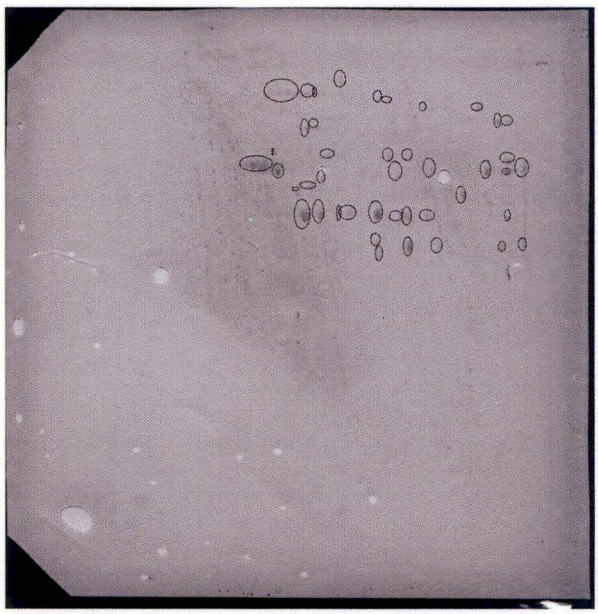


Figure III.26. Mise en évidence de protéines carbonylées sur les membranes de nitrocellulose après révélation par Opti 4CN pour les 3 réplicats de C0+A (a, b et c) dans les branchies antérieures de crabes chinois.

a)



b)



c)

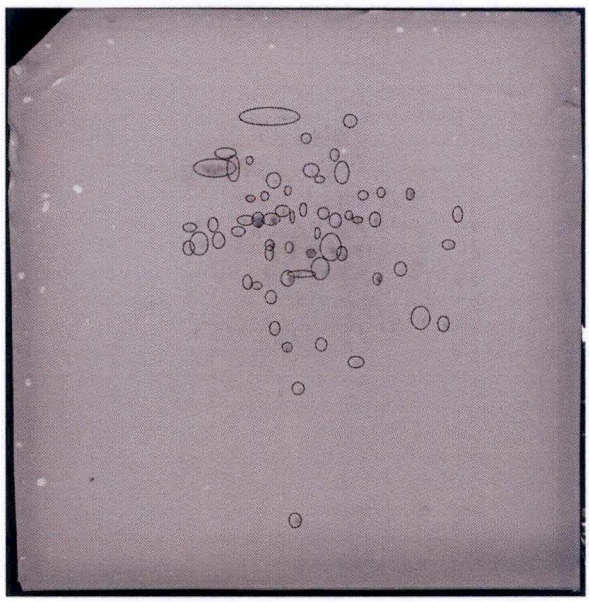


Figure III.27. Mise en évidence de protéines carbonylées sur les membranes de nitrocellulose après révélation par Opti 4CN pour les 3 réplicats de C50+A (a, b et c) dans les branchies antérieures de crabes chinois.

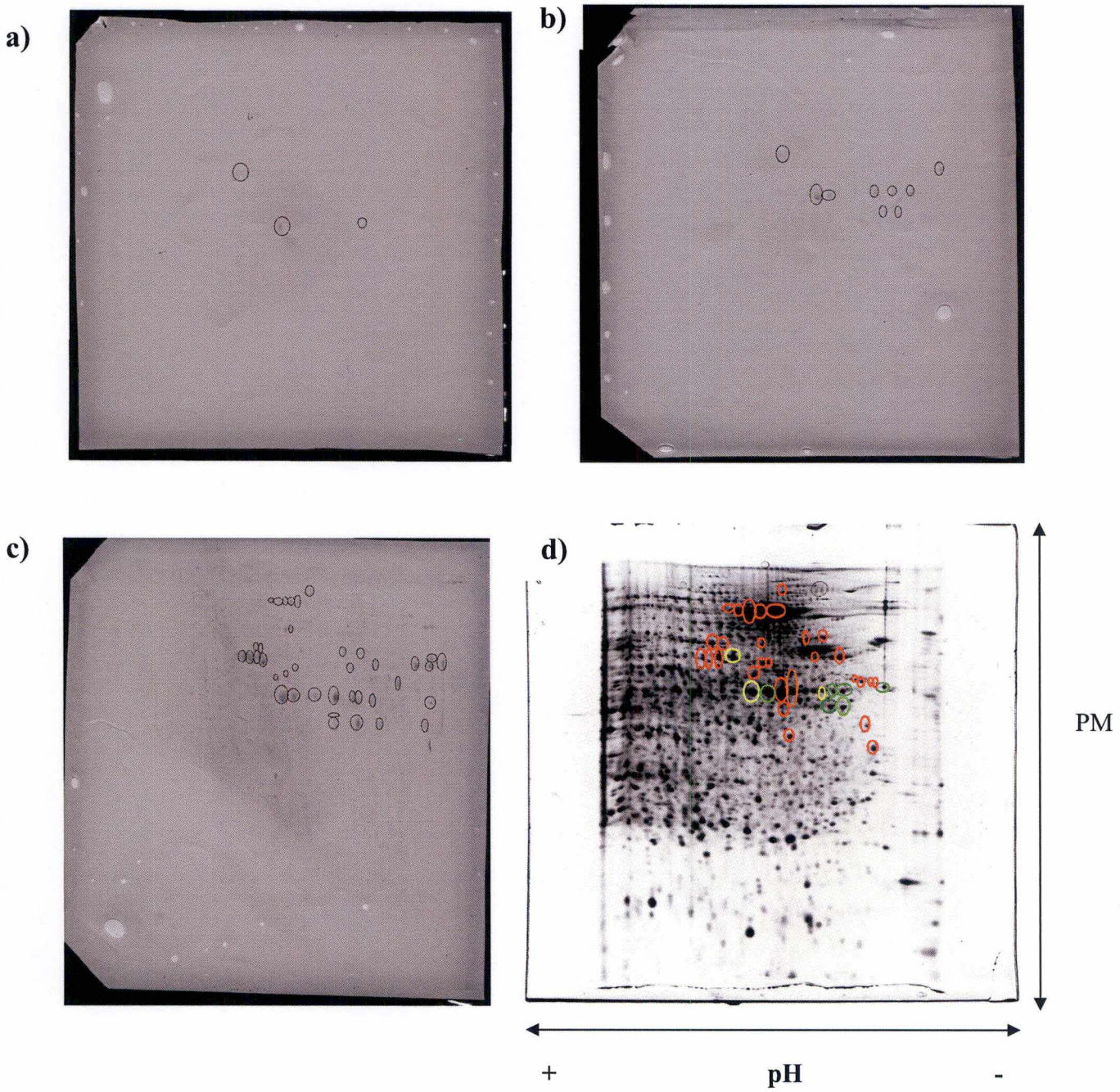


Figure III.28. Mise en évidence de protéines carbonylées sur les membranes de nitrocellulose « moyennes » des conditions C0 **(a)**, C0+A **(b)** et C50+A **(c)** des branchies antérieures de crabes chinois. **(d)** Gel à l'argent regroupant les différents spots présents dans toutes les conditions. Protéines carbonylées présentes dans la condition C0 en **JAUNE**; protéines carbonylées présentes dans la condition C0+A en **VERT** et **JAUNE**; protéines carbonylées présentes dans la condition C50+A en **ROUGE**, **VERT** et **JAUNE**.

Quatrième partie : DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Discussion

Nous savons, de par la littérature scientifique, qu'une contamination au cadmium engendre, chez les organismes exposés, des dommages cellulaires et physiologiques. Dans ce contexte, notre premier objectif était d'étudier l'effet de ce métal sur la survie et l'osmolalité de l'hémolymphe des crabes chinois exposés à différentes concentrations en cadmium.

1. Le cadmium engendre des modifications de l'osmolalité

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent que l'osmolalité de l'hémolymphe reste constante en fonction des différentes conditions de contamination. Une diminution significative est cependant décelée par les analyses statistiques chez les individus subissant une exposition aiguë (C0+A). Malgré des résultats moins frappants, à savoir une diminution de l'osmolalité de seulement 13% par rapport aux individus contrôles contre 33% dans les travaux de Silvestre et al (2005b), cet effet est en accord avec les observations ressortant de cette étude. Celle-ci montrait une diminution de l'osmolalité de l'hémolymphe de crabes chinois *Eriocheir sinensis* après 3 jours de contamination aiguë au cadmium alors qu'une exposition chronique de 30 jours ne produisait pas d'effet observable à ce niveau.

Les faibles variations de l'osmolalité de l'hémolymphe entre les différentes conditions pourraient être expliquées par le fait que les concentrations en cadmium administrées aux individus étaient trop faibles et/ou la durée d'exposition trop courte pour induire des changements à ce niveau. Lors de leur étude sur les altérations des paramètres biochimiques induites par une exposition au cuivre (40 et 400µg/l) chez des tilapias *Oreochromis niloticus*, Monteiro et al (2006) ont noté que la concentration en Na^+ et en protéines ainsi que l'osmolalité dans le plasma diminuaient proportionnellement au temps d'exposition à la concentration en cuivre la plus élevée, alors qu'à 40 µg/l de cuivre, ces effets n'étaient visibles qu'après 21 jours d'exposition. Ce phénomène suggère une perturbation sévère de l'épithélium branchial ou alternativement une augmentation de la perméabilité vasculaire (Nussey et al, 1995 cité dans Monteiro et al, 2006).

L'étude de Silvestre et al (2005b) avait permis de mettre en évidence la mise en place d'un processus d'acclimatation au niveau des capacités d'osmorégulation du crabe chinois exposé à une concentration chronique en cadmium. En effet, pareillement à nos résultats, les individus exposés consécutivement à une exposition chronique (50 µg Cd/l) et à une exposition aiguë (0,5 mg Cd/l) maintiennent une osmolalité de l'hémolymphe à des niveaux plus élevés que les crabes directement soumis à une contamination aiguë (C0+A).
L'effet du cadmium sur l'osmolalité lors d'une exposition aiguë par rapport à une exposition dite chronique est cependant moins marqué dans notre étude comparée à celle de Silvestre et al (2005b). Ceci pourrait être expliqué par le fait que le crabe est très sensible à la concentration et à la durée d'exposition à la substance polluante. En effet, Silvestre et al (2006b) avaient observé qu'après 1 et 2 jours d'exposition aiguë, les capacités d'hyper-osmorégulation n'étaient pas altérées ; l'osmolalité de l'hémolymphe ne présentant pas de niveaux significativement différents de ceux du groupe contrôle. Par contre, il notait une forte baisse de l'osmolalité le troisième jour. De petites différences dans nos conditions expérimentales pourraient donc expliquer l'absence d'effet significatif entre nos conditions.

Concernant le taux de survie des crabes exposés aux différentes conditions en cadmium, nous ne pouvons pas assurer que ce métal induise des effets néfastes à ce niveau. Nous pourrions même affirmer que, dans notre étude, ce polluant ne soit pas responsable de l'importante mortalité des individus en conditions chroniques. En effet, lors de ces contaminations, les individus présentaient un taux de mortalité très élevé et ce, même au sein du groupe contrôle puisque nous avons noté la survie de seulement 55% des animaux. Vraisemblablement, la mortalité élevée lors de notre étude semblerait être due aux conditions expérimentales. En effet, les nitrates et nitrites dosés dans l'eau des bassins présentaient des valeurs très élevées et l'on sait que ceux-ci sont létaux à fortes concentrations. Un second facteur serait les importantes variations de températures d'un jour à l'autre. La densité pourrait également intervenir ce qui expliquerait pourquoi les crabes exposés aux concentrations aiguës en cadmium présentent une mortalité quasi nulle. En effet, à ce stade de l'expérience, il ne restait environ plus qu'une dizaine d'individus dans chaque bac contrairement au début, où chaque groupe comptait plus de 40 crabes. Il est tout de même nécessaire de garder à l'esprit que les crabes exposés aux concentrations aiguës, sont les individus les plus résistants puisqu'ils ont déjà survécu aux 30 jours d'exposition chronique.

Nos résultats ne semblent donc pas aller dans le sens de la plupart des travaux ayant étudié l'effet du cadmium sur la santé des organismes exposés. Ainsi, Rasmussen et Andersen (2000) ont observé une augmentation de la mortalité chez des arénicoles *Arenicola marina* exposées à 0,1 et 1 ppm de cadmium. Cette augmentation était d'autant plus importante que la concentration en métal était élevée. En effet, la mortalité était de 25% pour le premier groupe et de 50% pour le second. L'étude de la dynamique de l'accumulation de cadmium et des effets chez la carpe commune *Cyprinus carpio* a révélé qu'à la fin de l'expérience, des réponses générales de stress comme une diminution de l'hématocrite et de la croissance ainsi qu'une augmentation de la mortalité ont été observés (Reynders et al, 2006).

2. Les branchies antérieures (BA) sont les organes les plus sensibles au cadmium

Notre second objectif concernait dans un premier temps, la caractérisation de l'état de stress oxydant, par la réalisation de tests TBARS (*thiobarbituric acid reactive substance*), des crabes exposés au cadmium. Ensuite, nous souhaitions mettre en évidence l'intervention et le rôle des enzymes antioxydantes dans le processus d'acclimatation chez ce crustacé. En effet, le cadmium est largement reconnu comme inducteur d'espèces réactives de l'oxygène conduisant à un stress oxydant au sein de l'organisme (Basha et Rani, 2003 ; Lijun et al, 2005). Suite à ce stress particulier, l'organisme met en place des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques pour contrer les effets délétères, tel que l'attaque des constituants cellulaires. Silvestre et al (2005a et b) avaient mis en évidence la mise en place d'un processus d'acclimatation chez le crabe chinois exposé chroniquement au cadmium. Pour rappel, nous définissons ce concept par l'augmentation de la tolérance des individus exposés à une concentration élevée, voire létale, d'un polluant suite à une exposition chronique de cette même substance (McDonagh et Wood, 1993). En effet, les crabes exposés de façon aiguë au cadmium (500µg/l pendant 3 jours) et ayant subi une contamination chronique (50 µg Cd/l pendant 30 jours) présentaient une résistance plus élevée par rapport aux animaux non exposés préalablement. Lors d'une étude ultérieure (Silvestre et al, 2006), les auteurs avaient souhaité caractériser les profils d'expression des protéines induits dans les branchies antérieures de crabes chinois lors du processus d'acclimatation et ainsi mettre en évidence les mécanismes potentiels intervenants dans celui-ci. Ce travail a permis de montrer la sur- et la sous-expression de 2 isoformes de la glutathion S-transférase dans certaines conditions de contamination ainsi que la sur-expression de la thioredoxine peroxydase. Ces

deux protéines se révèlent être, en réalité, des enzymes intervenant dans les systèmes de défense antioxydants au sein des organismes. Le second objectif de notre travail va donc permettre de mieux comprendre le rôle complexe de ces protéines dans le processus d'acclimatation.

Lorsque nous examinons l'activité des enzymes antioxydantes dosées dans les trois types de tissus étudiés, les branchies antérieures se révèlent être les organes les plus sensibles à une exposition au cadmium et pour lesquels nous observons le plus d'effets sur les biomarqueurs sélectionnés. Ces mêmes constatations avaient été clairement observées lors des travaux de Pan et Zhang (2006) et ceux de Silvestre et al (2005b). Ces derniers avaient en effet remarqué que, suite à une exposition aiguë, l'activité de la Na^+/K^+-ATPase, ainsi que celle de la cytochrome c oxydase, pouvaient être fortement diminuées, et que l'ultrastructure de ces branchies était très endommagée. Le fait que ces organes soient les plus sensibles peut être associé à l'accumulation de cadmium à ce niveau. Le dosage de ce métal lourd dans divers tissus de crabes chinois exposés de façon aiguë au cadmium (Silvestre et al, 2005a) a révélé que les niveaux les plus élevés étaient mesurés dans les branchies antérieures avec une concentration de 188 µg Cd/g de tissu frais contre 36 µg Cd/g de tissu frais dans les branchies postérieures.

3. Le cadmium induit un stress oxydant

Nos résultats montrent clairement que le cadmium induit un stress oxydant au niveau des branchies antérieures. Plusieurs études avaient noté des résultats similaires dans les branchies comme dans d'autres organes. Ainsi Pan et Zhang (2006) avaient observé l'induction d'un stress oxydant, par l'induction de GPx, CAT et SOD dans les branchies de crabe *Charybdis japonica* exposé au cadmium pendant 15 jours. L'effet de ce stress oxydant chez le crabe chinois est cependant complexe et intervient à plusieurs niveaux d'organisation. Nous avons en effet remarqué une importante augmentation du nombre de protéines carbonylées au sein des branchies antérieures. Pour rappel, nous savons que les ROS à l'origine de ce stress particulier ont pour effet d'induire des dommages cellulaires, comme l'attaque des acides nucléiques, des lipides mais aussi des protéines menant à leur oxydation (Lagadic et al, 1997). Au sein des branchies antérieures, les spots de protéines carbonylées sont au nombre de 38 lorsque les individus sont exposés de façon chronique au cadmium suivie d'une contamination aiguë contre 9 spots seulement chez les individus directement en contamination aiguë. L'accumulation de cadmium dans ces branchies engendrerait donc la carbonylation des protéines. Des moules communes *Mytilus edulis*, provenant d'un site pollués en Irlande, montraient un niveau plus élevé de carbonylation et de glutathionylation comparé au groupe de référence ; ceci indiquant que les animaux exposés réagissaient en réponse à un stress oxydant (McDonagh et al, 2005). La carbonylation engendre la dénaturation des protéines qui deviennent non-fonctionnelles. Elles peuvent devenir toxiques si elles s'accumulent dans les cellules. Cette carbonylation des protéines pourraient expliquer la mise en évidence de la sur-expression d'une sous-unité du protéasome lors de l'étude de Silvestre et al (2006). Ce complexe est en effet le principal lieu de dégradation des protéines anormales.

Une autre conséquence du stress oxydant est l'apparition de la peroxydation des acides gras polyinsaturés des membranes biologiques menant ainsi à de lourds préjudices cellulaires (Ribera et al, 1991). La LPO est de ce fait largement utilisée comme biomarqueur indiquant un stress oxydant chez des organismes en contact avec des xénobiotiques.
Dans notre étude, le dosage de la LPO par la mesure des taux de MDA ne fournit aucune indication d'un possible stress oxydant au niveau de cet organe. En effet, malgré que nos

résultats nous renseignent des valeurs plus élevées chez les individus du groupe contrôle (visibles uniquement pour les mâles), nous n'observons pas de différences significatives entre les autres conditions et ce, même lorsque les concentrations en cadmium sont les plus importantes.
Ces constatations ne vont pas dans le sens de la plupart des travaux étudiant les niveaux de TBARS dans les tissus des organismes exposés à des substances polluantes. En effet, ils nous renseignent généralement sur des niveaux plus élevés chez les individus exposés par rapport aux groupes contrôles. Ainsi, du malathion administré à des larves d'huîtres à raison de 100 et de 1000 µg/l induisait une augmentation de la peroxydation lipidique chez ces individus et était neutralisée par une importante activité enzymatique de la glutathion S-transférase et de la catalase (Damiens et al, 2004). Néanmoins, la LPO peut avoir lieu même en présence d'activités antioxydantes augmentées, l'induction pouvant être insuffisante pour faire face au stress (Lagadic et al, 1997).
L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette absence de LPO au sein des branchies antérieures des organismes exposés est sans doute que les systèmes de défense antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques sont suffisamment élevés pour contrer cette peroxydation lipidique.

4. Une exposition aiguë au cadmium induit l'augmentation des activités ou des concentrations de GSH, GPx et GST

Le dosage des différents systèmes antioxydants a permis de vérifier l'hypothèse citée précédemment concernant l'absence de LPO au sein des branchies antérieures. Nos résultats révèlent une augmentation significative des activités ou des concentrations de GSH, GPx et GST dans ces organes chez les individus exposés de *façon aiguë* au cadmium.

Les niveaux plus élevés de GSH chez les organismes exposés peuvent protéger ceux-ci du stress oxydant induit par le polluant (Pandey et al, 2003). Néanmoins, nos résultats contredisent plusieurs études nous indiquant des niveaux de GSH plus faibles dans les tissus d'individus subissant un stress oxydant suite à une exposition à un xénobiotique. Zhang et al (2004) avaient même énoncé que dans le cas d'un stress oxydant plus sérieux, les niveaux de glutathion réduit peuvent fortement diminuer suite à l'oxydation de celui-ci en GSSG.
Le GSH est le composé cytosolique majeur impliqué dans la défense contre le stress oxydant. Il protège donc la cellule contre de nombreuses substances toxiques et régule l'équilibre redox de celle-ci. La détoxification des ROS et des hydroperoxydes implique l'oxydation de la GSH en GSSG par la glutathion peroxydase. Ce GSSG est ensuite réduit en GSH par la glutathion réductase au détriment du NADPH, qui est recyclé dans le cycle des pentoses phosphates. Néanmoins, si la génération du GSSG est plus élevée que sa réduction en GSH, ce glutathion oxydé s'accumule et est ensuite transporté à l'extérieur de la cellule, à l'aide de transporteurs spécifiques, afin d'éviter un épuisement du NADPH (Zhang et al, 2004). Le glutathion peut également agir comme source d'acides aminés pour la synthèse des protéines (Mosleh et al, 2006).

La GPx catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et des peroxydes organiques en alcool stable en utilisant le glutathion total comme source de réducteurs (Cheung, 2004). L'activité de cette enzyme sera donc influencée par celle de la GSH qui elle-même le sera par l'activité de la GR. Celle-ci catalyse en effet la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). La GPx est une des trois enzymes majeures du système de défense antioxydant. Cette enzyme joue un rôle important dans la protection de la cellule contre la peroxydation des lipides. Elle a été utilisée à plusieurs reprises comme biomarqueur pour

l'étude de pollutions environnementales car elle était induite en présence de contaminants (Livingstone, 1991).
Au vu des résultats obtenus, toujours au niveau des branchies antérieures, le métal induirait une activité plus élevée de la part de cette enzyme afin de contrer au maximum les effets délétères des ROS. Des différences significatives entre les conditions chroniques et aiguës sont en effet décelées. Ces observations soutiennent de nombreuses études telle que celle de Ahmad et al (2006) qui avaient remarqué que les branchies d'anguilles *Anguilla anguilla* exposées à deux concentrations différentes de chrome pendant 24 heures avec ou sans pré-exposition à la β-naphtoflavone (BNF : dérivé d'hydrocarbure aromatique polycyclique), exhibaient une activité de la glutathion peroxydase croissante en fonction de la dose du métal dans l'eau. Par contre, nos observations contredisent celle de Hansen et al (2006) n'indiquant pas de différence significative dans les niveaux d'ARNm codant la GPx entre les truites *Salmo trutta* exposées à des métaux lourds et le groupe contrôle.

Comme dans l'étude de Ahmad et al (2005) dans laquelle la GST augmente significativement dans les branchies d'anguilles *Anguilla anguilla* exposées à 1µM de cuivre, les branchies antérieures de crabes exposés de façon aiguë au cadmium présentent une augmentation significative dans l'activité de cette enzyme par rapport aux individus en condition chronique. Les valeurs sont généralement 2 fois plus élevées entre ces deux conditions. La plupart des travaux étudiant l'activité de la GST nous renseignent sur le fait que l'induction de cette enzyme peut se produire dans divers organes et après des durées d'exposition au polluant variables, dépendantes du type de tissu étudié et de la nature du polluant. Cependant, Mosleh et al (2006) ont observé que des vers aquatiques *Tubifex tubifex* présentaient une activité de la GST plus faible par rapport au groupe contrôle et ce, après 7 jours d'exposition à 100 et 200 µg/l de cuivre. Cette diminution était par contre contrecarrée par une augmentation significative de la GR. La glutathion S-transférase réfère à un large groupe de protéines ubiquistes qui catalysent l'attaque nucléophile du GSH sur différentes espèces de composés toxiques. Ce sont des protéines dimériques ayant un poids moléculaire compris entre 22 et 28 kDa. L'activité de la GST est impliquée dans le processus métabolique de phase II (Cheung et al, 2004) permettant de rendre les composés toxiques plus hydrophiles et donc plus faciles à éliminer via les reins. Le niveau d'expression de la GST est considéré comme un facteur important de protection des organes contre les effets délétères des polluants (Casalino et al, 2004).

Il est possible que l'activité de la GST ne soit pas uniquement induite par les ROS suite à l'exposition au cadmium. En effet, nous n'avions pas observé d'augmentation significative de la LPO au sein des trois types de tissus. Les valeurs de TBARS sont telles qu'il est possible d'imaginer que les peroxydes ne soient pas les seuls facteurs induisant l'activité de la glutathion S-transférase. Cette hypothèse avait déjà été supportée par Casalino et al (2006) lors de leur étude sur la synthèse de GST chez le rat exposé au Cd. Ils avaient observé une augmentation de l'activité enzymatique et ce, malgré l'administration de vitamine E réduisant le niveau de TBARS au sein du tissu. Suite à cela, ils avaient émis l'hypothèse que l'exposition au cadmium affectait directement la transcription de certaines isoformes de la glutathion S-transférase. Cette hypothèse est d'autant plus convaincante que Silvestre et al (2006) avaient conclu leur étude en énonçant que différentes isoformes de la GST pouvaient réagir différemment en fonction du type d'exposition au métal.
Les résultats concernant la GR, la CAT et la SOD ne montrant pas d'induction significative de l'activité de ces enzymes, la GSH, GST et GPx agiraient donc en première ligne de défense rapide qui permettrait de maintenir des niveaux de LPO faibles mais qui ne serait pas suffisante pour éviter la carbonylation des protéines.

5. Une exposition chronique au cadmium peut induire un processus d'acclimatation, mais quels en sont les mécanismes ?

Tout d'abord, il est nécessaire de redessiner le contexte dans lequel nous nous trouvons. Nous définissons généralement l'acclimatation par la tolérance accrue à une concentration élevée, souvent létale, d'une substance toxique suite à une exposition chronique à une concentration sub-létale de cette même substance (McDonagh et Wood, 1993). La conclusion du travail de Silvestre et al (2005b) nous annonçait qu'une exposition chronique de 50 µg Cd/l chez le crabe chinois induisait ce processus au niveau des capacités d'osmorégulation. En effet, des crabes soumis pendant 30 jours à cette concentration, devenaient plus résistants à une exposition aiguë qui, sans acclimatation préalable, induirait des effets délétères sur l'osmorégulation. Ces mêmes auteurs avaient ensuite souhaité comprendre les mécanismes intervenant dans ce processus et s'étaient donc penchés sur les profils d'expression des protéines dans les branchies antérieures de crabes exposés de façon aiguë et chronique au cadmium. Les protéines dont l'expression bougeaient se révélaient être, entre autres, des enzymes des systèmes intervenant dans la défense contre un stress oxydant.

L'analyse de nos résultats permet d'observer une augmentation des niveaux de GSH et de l'activité de la GST en condition chronique à une concentration de 50µg Cd/l. En effet, si nous comparons, pour ces deux dosages, les valeurs entre les trois conditions chroniques à savoir C0, C10 et C50, nous remarquons que les concentrations de ces deux systèmes antioxydants sont plus élevées lors d'une exposition à 50µg Cd/l par rapport aux deux autres conditions. De plus, lorsqu'on examine les C0+A et C50+A, les valeurs d'activité enzymatique sont plus élevées dans le second groupe malgré la même durée d'exposition aiguë que le premier. Ceci indique qu'il y aurait, dès lors, élévation de l'activité de la GST et du GSH pendant la période d'exposition chronique qui permettrait d'augmenter les chances de résistance des individus au moment d'une contamination aiguë. Une comparaison entre C50 et C50+A dans les deux dosages nous indique des valeurs n'étant pas significativement différentes. Tout porte à croire que la GSH et la GST expliqueraient, en partie, la résistance accrue acquise en stress chronique que Silvestre et al (2005b) avait observé lors de leur étude. Nous remarquons, par contre, qu'une exposition chronique préliminaire de 10µg Cd/l ne modifie pas la réponse à l'exposition aiguë. Par conséquent, nous en déduisons que l'exposition au métal a besoin de dépasser un seuil pour induire le processus d'acclimatation (Silvestre et al, 2005 ; McDonald et Wood, 1993). McDonagh et Wood (1993) avaient ainsi défini l'existence d'une *fenêtre d'acclimatation* pour des expositions à des métaux. Si nous nous resituons dans un contexte environnemental, l'existence de ce seuil implique que le niveau de pollution doit excéder une valeur minimale pour induire des mécanismes de tolérance. Dans le cas du crabe chinois, l'acclimatation au cadmium se fera donc dans des environnements hautement pollués.

Par contre, concernant le dosage de la GPx dans les branchies antérieures, nous n'observons pas d'effet en C50. En effet, les analyses statistiques n'ont pas révélé de différences significatives entre les trois conditions chroniques ; les valeurs étant de 2,3 ± 1,8 nmol NADPH/min/mg prot en C0 ; de 2,1 ± 0,9 nmol NADPH/min/mg prot en C10 et de 2,5 ± 0,6 nmol NADPH/min/mg prot pour le groupe C50. Ces constatations nous permettent d'émettre l'hypothèse que cette enzyme antioxydante n'intervient pas pour augmenter la résistance des crabes exposés au cadmium. Cela signifie aussi qu'en stress chronique, d'autres mécanismes prennent sa place. Nous avions cité précédemment l'intervention de la GSH et de la GST mais plusieurs études ont mis en évidence d'autres systèmes permettant une résistance accrue des organismes exposés à un xénobiotique. Ainsi, l'étude de Silvestre et al (2005a) avait permis

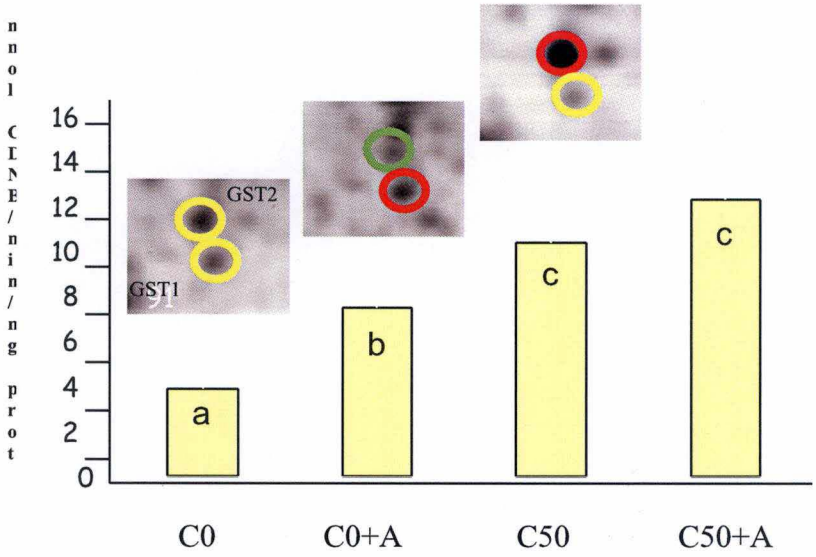


Figure IV.1. Représentation des profils d'expression de 2 possibles isoformes et de l'activité de la GST en fonction des conditions de contamination (C0 : contrôles ; C0+A : individus exposés à 500 µg Cd/l pendant 3 jours; C50 : individus exposés à 50 µg Cd/l pendant 30 jours ; C50+A : individus exposés à 50 µg Cd/l pendant 30 jours puis à 500 µg Cd/l pendant 3 jours). Les traitements qui partagent la même lettre ne sont pas significativement différents (d'après Silvestre et al, 2006).

de montrer que des mécanismes de détoxification du métal intervenaient lors d'une exposition au cadmium. En effet, leurs résultats concernant les niveaux de ce métal dans les branchies antérieures après une exposition aiguë étaient comparables quelle que soit la contamination chronique préalable. Suite à ces résultats, les auteurs avaient émis l'hypothèse qu'il devait exister d'autres mécanismes d'acclimatation que ceux qui auraient pour effet de restreindre l'accumulation du cadmium. Ces mécanismes de détoxification feraient intervenir les métallothionéines (MTs), protéines riches en groupements sulfures qui séquestreraient les ions métalliques et donc protégerait les organes des effets néfastes du métal (Pérez-Coll et al, 1999). Cependant, la présence de ces MTs dans les branchies antérieures ne suffirait pas à prendre entièrement en charge le cadmium accumulé dans ces organes. En effet, Silvestre et al (2005a) avaient calculé que seulement 5,5% du cadmium accumulé à ce niveau pourrait être séquestré par des MTs. Suite à ces observations, il est probable que des mécanismes compensatoires interviennent également dans le processus d'acclimatation. Silvestre et al (2005b) avaient ainsi observé la sur-expression d'une isoforme de la protéine disulfure isomérase (PDI) dans les BA de crabes exposés à 50 µg Cd/l pendant 30 jours. Celle-ci agit entre autre en tant que chaperone moléculaire en se fixant aux autres protéines, protégeant les ponts disulfures et augmentant de la sorte le taux de protéines correctement repliées. Elle permettrait donc une meilleure protection de celles-ci contre une oxydation induite par le cadmium.

Toutefois, il est important de se rendre compte que les branchies ne sont pas devenues complètement insensibles au cadmium malgré la mise en place d'une résistance lors des contaminations chroniques. Silvestre et al (2005b) avaient ainsi observé des dommages au niveau des mitochondries et une diminution de l'activité de la cytochrome c oxydase occasionnés lors de l'exposition au cadmium chez les crabes du groupe C50+A.

De ce qui précède, il apparaît que d'un coté, nous avons la **GSH** ainsi que la **GST** qui interviennent en **première ligne de défense** lors d'une exposition au cadmium chez le crabe chinois, mais également dans la **défense à long terme**. La GSH pourrait donc être liée à la GST. Ceci est logique puisque l'activité de la glutathion S-transférase est de catalyser l'attaque nucléophile du GSH sur différentes espèces de composés toxiques. Ces constatations sont à mettre en parallèle avec les résultats de Silvestre et al (2006) concernant les profils d'expression des protéines dans les branchies antérieures de crabes chinois lors d'expositions au cadmium (Figure IV.1). Lors d'une exposition aiguë (500 µg Cd/l pendant 3 jours), ils avaient noté la **sous**-expression d'une isoforme de la GST (appelons-la GST 1) alors qu'une autre isoforme était significativement **sur**-exprimée (GST 2). Par contre, lorsque les animaux sont exposés chroniquement au cadmium (50 µg/l pendant 30 jours), la GST 1 était **sur**-exprimée et la GST 2 ne montrait pas de modification. Nos résultats vont donc dans le sens de ces observations puisque nous observons l'intervention de la GST dans les deux types de contaminations, et grâce à l'étude de Silvestre et al nous expliquons cela par l'induction de différentes isoformes de cette enzyme en fonction du type d'exposition au métal. Puisque nous disposons toujours des échantillons, il serait intéressant, lors d'études ultérieures, de vérifier les isoformes impliquées dans les deux conditions par l'utilisation des techniques de séparation par chromatographie.
Daggett et al (1998) avaient observé des réponses du GSH et de la GST similaires au niveau des reins de rat exposés au plomb alors qu'aucun marqueur de stress oxydant (LPO et production d'acide nitrique) ne répondait positivement. De plus, les techniques de Northern blot avaient révélé l'induction de différents ARNm de la GST lors de l'exposition à ce métal. Les auteurs concluaient que l'induction de GST n'est pas le résultat d'un stress oxydant mais

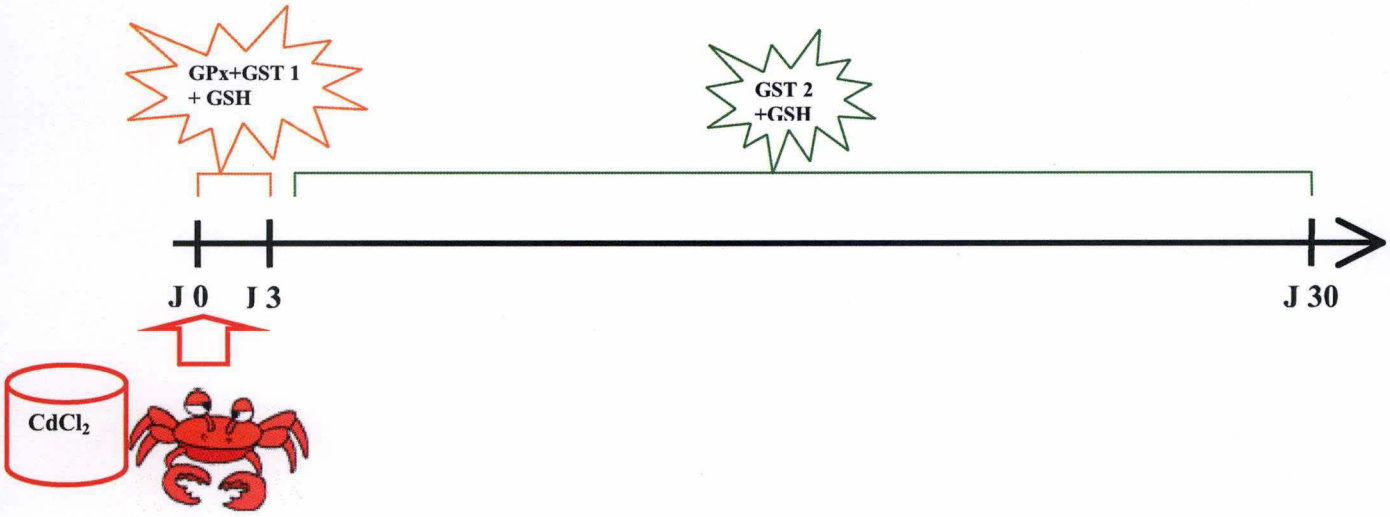


Figure IV.2. Représentation schématique de l'intervention des systèmes antioxydants lors d'une exposition aiguë (3 jours) et chronique (30 jours) au cadmium chez le crabe chinois *Eriocheir sinensis*.

que le plomb agirait directement sur les facteurs de transcription. L'activation d'éléments *cis* ou le déplacement de facteurs *trans* ne sont pas à exclure dans l'augmentation de la transcription des gènes codant pour la GST lors d'une exposition à des métaux (Daggett et al, 1998 ; Oguri et al, 2000). Dans ce contexte, il serait intéressant lors d'études ultérieures d'intégrer le niveau moléculaire dans notre travail et ainsi comprendre au mieux les effets du cadmium sur l'expression génique.

A coté de la GSH et de la GST, nous avons la GPx qui agirait uniquement en **première ligne de défense** contre un stress aigu au cadmium. Cette constatation avait déjà été énoncée par Meyer et al (2003) lors de leur étude sur les réponses antioxydantes chez le poisson *Fundulus heteroclitus* exposé à des sédiments contaminés. Les auteurs avaient ainsi discuté d'une possible intervention de la GPx à court terme lors d'une contamination à des polluants. Une observation similaire avait été notée dans l'étude Pan et Zhang (2006) lors de l'étude de l'activité de la GPx chez le crabe marin *Charybdis japonica* exposé au cadmium. Ils avaient proposé plusieurs hypothèses afin d'expliquer cette induction uniquement à court terme. Ainsi, le cadmium réduirait la disponibilité du précurseur nécessaire à la synthèse de l'enzyme. Le métal pourrait également interagir avec la structure tertiaire ou quaternaire de la GPx. De futures études au niveau génétique et de la structure tridimensionnelle des protéines seraient intéressantes à mener afin de vérifier ces hypothèses.
Suite à ces découvertes, nous pourrions imaginer un schéma (Figure IV.2) représentant l'intervention des systèmes de défense contre les effets d'une exposition au cadmium chez le crabe chinois ainsi que les mécanismes antioxydants participant au processus d'acclimatation de cet animal lors d'une contamination chronique.

6. Le sexe des individus pourrait intervenir sur l'état de stress oxydant dû au cadmium au sein des branchies antérieures

Un autre résultat intéressant dans cette étude est la détection de différences spécifiques entre les sexes dans la réponse au stress oxydant. En effet, certaines valeurs particulières mesurées lors du dosage de la LPO et du GSH nous ont quelque peu interpellés. Ainsi, le groupe C0 présente un taux de MDA significativement plus élevé que les autres conditions. Après analyses statistiques, nous avons ainsi observé une différence significative entre mâles et femelles au sein de ce groupe ; les premiers présentant des concentrations de 92,3 ± 36,6 nmol de MDA/g de tissu alors que celles des femelles n'excédaient pas 23,6 ± 8,2 nmol de MDA/g de tissu. Si nous analysions uniquement les taux de MDA chez les femelles, nous pourrions observer qu'il y absence d'induction de la LPO et ce, dans toutes les conditions étudiées. Une question se présente donc : pourquoi les mâles du groupe contrôle ont-ils des valeurs de LPO aussi importantes en l'absence de cadmium et pourquoi ces valeurs ont tendance à revenir à des niveaux similaires aux femelles alors que les individus sont en contact avec le polluant ? Aucune étude à notre connaissance n'a obtenu ce genre de résultats et les hypothèses sont nombreuses. Remarquons aussi que ces valeurs peuvent être mise en relation avec celles du GSH au sein de ce même groupe. En effet, contrairement à la LPO, ce sont les femelles qui présentent des concentrations en GSH plus élevées que celles mesurées pour les mâles de la même condition. Celles-ci étaient de 100,4 ± 80,4 nmol GSH/g de tissu pour les individus femelles et de seulement 0,9 ± 1,54 nmol GSH/g de tissu pour les mâles. Cette faible teneur en GSH permettrait donc une forte LPO chez ces individus. Ainsi, le cadmium augmenterait les concentrations en GSH ce qui diminuerait la LPO. Nous pourrions émettre l'hypothèse que ces concentrations en GSH chez les mâles soient dues à l'état de maturité sexuelle ou au niveau hormonal chez ces individus. En effet, de pareilles observations avaient déjà été mises en évidence chez des poissons *Fundulus heteroclitus* mâles qui présentaient des valeurs de

glutathion significativement plus faibles comparées à celles des femelles. Ces individus mâles s'avéraient être en réalité, des poissons matures sexuellement. Une seconde expérience, menée cette fois avec des poissons immatures, n'avait pas révélé de différence entre les sexes. En perspective, il serait donc intéressant de pouvoir doser les hormones sexuelles chez les crabes exposés afin de vérifier notre hypothèse.

7. Le cadmium induit peu d'effets sur l'état de stress oxydant au niveau de l'hépatopancréas (HP) et des branchies postérieures (BP)

L'examen des résultats de la LPO dans l'HP de crabe chinois nous indique que ce métal ne semble pas induire de stress oxydant dans cet organe. En effet, malgré des valeurs plus élevées chez les individus exposés à de plus grandes concentrations en cadmium, ces augmentations ne sont pas significativement différentes des valeurs du groupe contrôle. Monteiro et al (2006) ont observé que le méthylparathion n'induisait aucune altération significative sur les niveaux de peroxydation lipidique hépatique alors qu'une augmentation significative de la LPO était décelée dans les muscles blancs et les branchies du poisson d'eau douce *Brycon cephalus*. Par contre, Jurczuk et al (2004) avaient noté l'augmentation de la concentration en MDA dans le foie de rats exposés à 50 mg Cd/l. Notre observation est d'autant plus surprenante que les concentrations en cadmium au niveau de cet organe sont importantes. En effet, lors de leur étude, Silvestre et al (2005a) avaient noté une concentration moyenne de 63,0 ± 29,8 µg Cd/g de tissu frais dans l'hépatopancréas de crabes exposés de façon aiguë et acclimatés auparavant à 50 µg Cd/l, contre par exemple 36 ± 38 µg Cd/g de tissu frais au niveau des branchies postérieures des mêmes individus. Cette accumulation importante de cadmium hépatique pourrait être prise en charge par la liaison de ce métal aux MTs. En effet, le niveau moyen de base de ces protéines dans cet organe atteint déjà 352 µg/g de poids frais. Le cadmium lié à ces MTs serait alors non toxique et n'induirait pas de stress oxydant.

Nos résultats concernant le dosage de la GPx, de la GST et du GSH dans l'HP nous renseigne sur une activité sans tendance particulière puisque les analyses statistiques n'ont pas révélé de différences significatives entre les conditions. Cela est en accord avec les travaux de Gamble et al (1995) sur les niveaux de la glutathion peroxydase et de la superoxyde dismutase dans différents tissus de la moule commune *Mytilus edulis*, de l'étoile de mer *Asteria rubens* et du crabe vert *Carcinus maenas*. Ils ont ainsi observé que l'activité de la GPx était toujours plus importante dans les tissus digestifs tel que l'hépatopancréas chez les différentes espèces étudiées **à l'exception** du **crabe vert**. Nous pouvons ainsi émettre l'hypothèse que le métabolisme du glutathion ne semble pas être altéré au niveau de cet organe suite à une exposition chronique et/ou aiguë au cadmium.
Lorsque nous comparons les valeurs du groupe contrôle (C0) concernant l'activité de la GST dans les trois tissus étudiés, nous remarquons que celles obtenues pour les branchies ont tendance à être plus faibles par rapport à celles de l'hépatopancréas (49,4 ± 10,4 nmol CDNB/min/mg prot dans BP contre 107 ± 20,6 nmol CDNB/min/mg prot dans HP). Cette observation indique le rôle effectif de cet organe dans la détoxification des xénobiotiques (Basha et Rani, 2003 cité dans Monteiro et al, 2006).

Il semblerait donc que ces systèmes antioxydants n'interviennent pas comme mécanismes dans le processus d'acclimatation au cadmium dans l'hépatopancréas du crabe chinois. En réalité, Silvestre et al (2005a) avaient suggéré comme mécanismes intervenant dans ce processus, l'augmentation du stockage du Cd hépatique. En effet, la concentration moyenne en Cd après une exposition aiguë est significativement supérieure pour des crabes ayant subi

une exposition préalable à 50 µg Cd/l par rapport à des animaux non-acclimatés (63 ± 29,8 µg/g de tissu frais contre 27 ± 16 µg/g de tissu frais). Cette capacité d'accumuler plus de Cd à ce niveau serait due, en partie, à une plus forte teneur en MTs, puisque les concentrations de celles-ci sont plus élevées chez les crabes acclimatés comparé aux individus directement soumis à une contamination aiguë. Cette hypothèse a aussi été supportée par Pan et Zhang (2006) dans leur étude relative aux MTs et aux enzymes antioxydantes chez le crabe marin *Charybdis japonica* exposé au cadmium.

Les résultats obtenus pour le dosage de la LPO dans les branchies postérieures (BP) ne nous renseignent pas sur un possible stress oxydant au niveau de cet organe. En effet, les analyses statistiques par l'ANOVA 1 n'ont pas décelé de différences significatives entre les traitements. Ceci pourrait être dû à l'intervention des systèmes antioxydants pour réduire les ROS et ainsi empêcher la peroxydation des lipides.
Cette hypothèse peut être de suite vérifiée en analysant les niveaux de GSH, GST et GPx dans ces organes. Lorsque nous comparons les valeurs entre contaminations chroniques et aiguës, nous observons généralement une augmentation significative de ces systèmes lors d'une exposition aiguë au métal. Par contre, nous ne notons **jamais** d'élévations significatives de ceux-ci que l'animal soit exposé à 10 µg Cd/l ou à 50 µg Cd/l. Nous ne remarquons donc pas d'effet chronique. Ces systèmes, au sein des branchies postérieures, interviendraient uniquement en **première ligne de défense** contre une exposition au cadmium. En perspective, nous pourrions comparer les isoformes de la GST induites dans les BP avec celles des BA. Logiquement, si notre hypothèse se tient, nous devrions retrouver, dans les BP, uniquement les isoformes impliquées dans la réponse rapide au niveau des BA.
Ces effets moins marquants comparés aux branchies antérieures pourraient être dus aux plus faibles accumulations de cadmium au niveau de cet organe. En effet, les concentrations étaient 3,5 à 16,2 fois plus faibles que dans les branchies antérieures. Les plus importantes étaient mesurées pour le groupe C10+A avec 45 ± 20 µg Cd/g de tissu frais et 36 ± 38 µg Cd/g de tissu frais pour le groupe C50+A. Cette faible accumulation de cadmium pourrait être due à la perméabilité sélective de la cuticule de ces branchies dites *osmorégulatrices*. (Silvestre, 2005).

8. La GR, CAT et SOD ne sont pas de bons biomarqueurs d'une contamination au cadmium

La catalase et la superoxyde dismutase sont deux des trois enzymes majeures des systèmes de défense antioxydants chez les animaux. La superoxyde dismutase catalyse la transformation des radicaux superoxydes en O_2 et en H_2O_2 qui est lui-même détoxifié par la catalase en oxygène moléculaire et en eau. Elles ont donc des fonctions apparentées. Ces deux enzymes sont souvent utilisées comme biomarqueurs indiquant un stress oxydant au sein de l'organisme.
Nos résultats concernant l'activité de ces deux enzymes sont plus ou moins similaires à savoir une activité constante malgré les différentes conditions de contamination. Cette observation va dans les sens de l'étude de Dimitrova et al (1994) (cité dans Pandey et al, 2003) qui avait énoncé que l'on observe généralement une induction simultanée de l'activité de la SOD et de la CAT lorsque les tissus sont exposés à des contaminants. Nos résultats confirment également l'étude de Atli et al (2006) relative à l'activité de la catalase dans les branchies de *Oreochromis niloticus* exposé à différentes concentrations de plusieurs métaux pendant 96 heures. Ils avaient remarqué que le cadmium et le zinc ne semblaient pas avoir d'effets significatifs sur les niveaux de cette enzyme. Une exposition au cuivre à long terme, chez le crabe bleu *Callinectes sapidus*, mène à l'augmentation significative de la GPx et de la SOD,

mais pas de la CAT et de la GR (Brouwer et Brouwer, 1998). L'activité de la catalase au sein des trois tissus est extrêmement faible, au seuil de la détection. Ces faibles niveaux peuvent être attribués à l'importante production des radicaux superoxydes qui ont été signalés comme inhibant l'activité de la CAT en cas de surproduction (Kono et Fridovich, 1982 cité dans Pandey et al, 2003). L'absence d'activité de la catalase pourrait être associée avec les niveaux importants de GPx, agissant conjointement avec celle-ci dans la défense contre la formation d'H_2O_2 (Atli et al, 2003).
Lorsque nous procédons à la comparaison de l'activité de la SOD dans les trois types de tissus étudiés, nous remarquons que les valeurs moyennes sont supérieures au sein des branchies postérieures par rapport aux antérieures, qui sont elles-mêmes plus élevées que celles mesurées dans l'hépatopancréas. Le rapport moyen est d'environ 4/2/1 respectivement pour les trois organes. Nous pourrions émettre l'hypothèse que cette activité de la SOD dans les BP soit plus élevée suite à la présence de nombreuses mitochondries. En effet, ces branchies *osmorégulatrices* possèdent un épithélium dont les membranes plasmiques forment des invaginations souvent profondes et extrêmement plissées remplies de mitochondries. En outre, les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes existant sous plusieurs isoformes caractérisées par leur métal de transition au niveau du site actif. Ainsi, la Mn-SOD semblerait être localisée uniquement dans la matrice soluble des mitochondries alors que la Cu-SOD et la Zn-SOD se situent essentiellement dans le cytosol. Une des perspectives de notre travail serait d'étudier les différentes isoformes des SOD, par des techniques de chromatographies ou protéomiques, afin de connaître celle(s) intervenant dans la défense contre un stress oxydant dû à une exposition au cadmium. Ce point serait donc interessant à étudier puisque Manduzio et al (2004) n'avaient eux-mêmes observé aucune modifications particulières de la SOD dans les tissus de la moule commune *Mytilus edulis* provenant de sites pollués par rapport au groupe contrôle, mais par contre l'étude des isoformes de la SOD par IEF leur avait révélé des différences significatives dans l'intervention individuelle de chacune de ces superoxydes dismutases.

Lors de l'analyse du dosage de la glutathion réductase, aucune tendance particulière de l'activité au sein des trois tissus étudiés n'a pu être mise en évidence. Cette absence de perturbations malgré les différents traitements au cadmium signifie théoriquement que la GR peut fournir le substrat nécessaire au bon fonctionnement de la GPx et de la GST. En effet, la GR permet la réduction du GSSG en GSH, ce dernier servant de substrat à la GST et à la GPx. Nos résultats sont donc différents de ceux de Mosleh et al (2005) qui avaient observé que les niveaux de la glutathion réductase avaient tendance à augmenter en réponse à la dose de fungicide administrée à des oligochètes *Tubifex tubifex*, démontrant de ce fait un stress oxydant chez ces vers. L'induction de GSH observée dans les branchies antérieures ne peut donc pas être mise en relation avec l'augmentation de GR comme l'avait cité Mosleh et al (2006).

9. Discussion de l'utilisation de l'analyse protéomique en écotoxicologie

Afin d'étayer notre compréhension du processus d'acclimatation chez le crabe chinois exposé au cadmium, nous avons entrepris l'analyse des protéines carbonylées au sein des branchies antérieures des individus exposés à différentes concentrations de ce métal. Cette analyse est des plus originale car, à notre connaissance, aucune étude écotoxicologique n'a encore abordé ce sujet chez ce crustacé.

La plupart des études en protéomique travaillant sur l'analyse des protéines carbonylées ont un but biomédical. En effet, elles se focalisent généralement sur la découverte de

médicaments, d'identification de biomarqueurs ou d'interactions protéines-protéines intervenant dans les maladies humaines. Parmi ces pathologies comprenant des niveaux élevés de groupements carbonyles, nous retrouvons la maladie d'Alzheimer, le diabète ou l'arthrite rhumatoïde (Dalle-Donne, 2003).
Une des conséquences de cet incroyable intérêt en médecine à ce sujet est que les études réalisées dans le domaine écotoxicologique sont plus rares. Cette approche en protéomique nous apporte plusieurs avantages. Un de ceux-ci est que les protéines participent grandement aux processus physiologiques par exemple en tant qu'enzyme. Parmi les travaux menés dans ce domaine, beaucoup se concentrent sur la mise en évidence de profils d'expression des protéines (PEPs) induits par une exposition à un xénobiotique (McDonagh et al, 2005 ; Boyd-Kimball et al, 2005). Seulement quelques études à but environnemental ont analysé l'induction de protéines carbonylées suite à l'exposition à un polluant donné (Dowling et al, Almroth et al, 2005).
Il faut tout de même garder à l'esprit que les résultats, discutés dans le point traitant de l'induction d'un stress oxydant par le cadmium (IV.3), sont relatifs. Nous observons, en effet, une grande variabilité entre les échantillons d'une même condition. Celle-ci pourrait être minimisée en travaillant avec un plus grand nombre de réplicats par condition. Il est nécessaire de souligner qu'il est toutefois impossible d'obtenir une vision d'ensemble de toutes les protéines présentes dans un tissu donné. Généralement, on s'attend à visualiser un maximum de 75% des produits finaux d'un génome sur des gels 2D. De plus, ce résultat ne peut être obtenu qu'en multipliant le nombre de gels pour un même échantillon (Cordwell, 2000 cité dans Silvestre, 2005). Une seconde perspective serait de travailler également sur les branchies antérieures des individus du groupe C50 afin de pouvoir les comparer les résultats déjà obtenus et ainsi vérifier qu'un stress de 30 jours à 50 µg Cd/l induit bien la carbonylation des protéines. Il serait également intéressant de réaliser une révélation des membranes de nitrocellulose permettant de visualiser l'ensemble des protéines de l'échantillon et ainsi calculer le ratio protéines oxydées/protéines totales. Grâce à cette méthode, nous pourrons aussi calculer l'index d'oxydation spécifique représentant les nmoles d'oxydation par mg de protéine (Conrad et al, 2000).

10. Conclusions

Plusieurs études ont montré qu'une exposition au cadmium affecte de façon négative les systèmes physiologiques et cellulaires des individus exposés. De la même manière, nous avons observé que ce métal provoque des modifications de l'osmolalité de l'hémolymphe chez des crabes chinois *Eriocheir sinensis* exposés de façon aiguë au cadmium (500µg/l). Par contre, les niveaux ne semblaient pas diminuer chez des individus pré-exposés chroniquement à 50 µg Cd/l suggérant ainsi la mise en place d'un processus d'acclimatation.

L'étude des paramètres caractérisant l'état de stress oxydant suite à l'exposition des organismes au cadmium et permettant de comprendre certains mécanismes intervenant dans le processus d'acclimatation nous a renseigné sur **l'induction d'un stress oxydant complexe** et intervenant à plusieurs niveaux d'organisation au sein des branchies antérieures. Ainsi, l'accumulation de ce métal dans ces branchies serait responsable d'une augmentation du nombre de protéines carbonylées au sein de ce tissu.
Les dosages des enzymes antioxydantes au sein de l'hépatopancréas et des branchies postérieures n'ont pas révélé, par contre, d'effet significatif du stress oxydant.

Les activités de la glutathion réductase (GR), de la catalase (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD) au niveau des BA n'ont pas montré d'augmentations significatives malgré

les différentes conditions de contaminations. Ces enzymes se révèlent donc être, dans notre cas, de mauvais biomarqueurs de stress oxydant. Les résultats les plus marquants ont été observés au niveau de l'activité ou des concentrations de 3 systèmes antioxydants à savoir le GSH, la GST et la GPx. Pour comprendre leur rôle, est nécessaire de faire la distinction entre exposition chronique et aiguë. Ainsi, le glutathion réduit (**GSH**) et la glutathione S-transférase (**GST**) interviendraient pour une **réponse rapide et durable**. En d'autres mots, ces deux systèmes agiraient lors d'une exposition aiguë au cadmium, c'est-à-dire à court terme, mais également lors d'une contamination à long terme. L'augmentation des teneurs en GSH et en GST en condition chronique serait donc un mécanisme permettant d'augmenter la résistance des organismes à des concentrations plus élevées en cadmium. Ils s'ajoutent donc aux autres éléments, telles les MTs ou les PDI, permettant l'*acclimatation* des crabes à ce métal. Cependant, l'étude de Silvestre et al (2006) avait mis en évidence des profils d'expression de différentes isoformes de la GST en fonction du type d'exposition. Il semblerait donc que le dosage de la GST en fonction des différents traitements inclue plusieurs isoformes de cette enzyme.
D'un autre coté, la glutathion peroxydase (**GPx**) interviendrait pour une **réponse rapide** au cadmium afin de limiter les dommages oxydatifs causés suite à une exposition à court terme à ce métal.

Au vu de ces résultats, il serait intéressant d'utiliser ces 3 systèmes antioxydants comme biomarqueurs de stress chez les organismes exposés naturellement au cadmium. En effet, notre environnement, de plus en plus pollué et dégradé par l'homme, expose parfois à la faune et à la flore des quantités considérables de métaux lourds. En comprenant à présent le rôle et l'intervention de ces systèmes de défense, nous pourrions nous en servir afin de savoir si l'organisme a été en contact de façon chronique ou aiguë au métal et ainsi connaître l'état de pollution de son environnement qui est également le nôtre.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Adewale, I. O. & Afolayan, A.(2005). Organ distribution and kinetics of Glutathione transferase from African river prawn, Macrobrachium vollenhovenii (Herklots). *Aquat Toxicol* **71**, 193-202

Ahmad, I., Maria, V. L., Oliveira, M., Pacheco, M. & Santos, M. A.(2006). Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of Anguilla anguilla L. exposed to chromium with or without pre-exposure to beta-naphthoflavone. *Mutat Res*

Almroth, B. C., Sturve, J., Berglund, A. & Forlin, L.(2005). Oxidative damage in eelpout (Zoarces viviparus), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat Toxicol* **73**, 171-80

Amado, E. M., Freire, C. A. & Souza, M. M.(2006). Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater red crab Dilocarcinus pagei (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead. *Aquat Toxicol* **79**, 1-8

Andres, S., Ribeyre, F., Tourencq, J. N. & Boudou, A.(2000). Interspecific comparison of cadmium and zinc contamination in the organs of four fish species along a polymetallic pollution gradient (Lot River, France). *Sci Total Environ* **248**, 11-25

Atli, G., Alptekin, O., Tukel, S. & Canli, M.(2006). Response of catalase activity to Ag+, Cd2+, Cr6+, Cu2+ and Zn2+ in five tissues of freshwater fish Oreochromis niloticus. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **143**, 218-24

Baillieul, M., Blust, R. (1999). Analysis of the swimming velocity of cadmium stressed Daphnia magna. *Aquatic Toxicology* **44**, 245-254

Basha, P. S. & Rani, A. U.(2003). Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost Oreochromis mossambicus (Tilapia). *Ecotoxicol Environ Saf* **56**, 218-21

Berlett, B. S. & Stadtman, E. R.(1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* **272**, 20313-6

Bianchini, A., Monserrat, J.M. (2006). Effects of methyl parathion on *Chasmagnathus granulatus* hepatopancreas: Protective role of sesamol. *Ecotox. and Environ.*

Bjerregaard, P., Depledge, M.H. (1994). Cadmium accumulation in *Littorina littorea*, *Mytilus edulis* and *Carcinus maenas*: the influence of salinity and calcium ion concentrations. *Mar.Biol.* **119**, 385-395

Bouilly, K. et al.(2006). Effects of cadmium on aneuploidy and hemocyte parameters in the Pacific oyster, Crassostrea gigas. *Aquat Toxicol* **78**, 149-56

Boyd-Kimball, D. et al.(2005). Proteomic identification of proteins specifically oxidized by intracerebral injection of amyloid beta-peptide (1-42) into rat brain: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience* **132**, 313-24

Brouwer, M. & Brouwer, T. H.(1998). Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, Callinectes sapidus. *Arch Biochem Biophys* **351**, 257-64

Calow, P. (1991) Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol.* **100C,** 3-6

Campbell, P.G.C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model.

Casalino, E., Sblano, C., Calzaretti, G. & Landriscina, C.(2006). Acute cadmium intoxication induces alpha-class glutathione S-transferase protein synthesis and enzyme activity in rat liver. *Toxicology* **217**, 240-5

Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, V., Calzaretti, G. & Landriscina, C.(2004). Rat liver glutathione S-transferase activity stimulation following acute cadmium or manganese intoxication. *Toxicology* **200**, 29-38

Cheung, C. C., Siu, W. H., Richardson, B. J., De Luca-Abbott, S. B. & Lam, P. K.(2004). Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, Perna viridis. *Environ Pollut* **128**, 393-403

Chowdhury, M. J., McDonald, D. G. & Wood, C. M.(2004). Gastrointestinal uptake and fate of cadmium in rainbow trout acclimated to sublethal dietary cadmium. *Aquat Toxicol* **69**, 149-63

Conconi, M. & Friguet, B.(1997). Proteasome inactivation upon aging and on oxidation-effect of HSP 90. *Mol Biol Rep* **24**, 45-50

Conrad, C. C. et al.(2000). Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochem Biophys Res Commun* **275**, 678-81

Daggett, D. A. et al.(1998). Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress. *Toxicology* **128**, 191-206

Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A. & Colombo, R.(2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* **329**, 23-38

Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F. & Romeo, M.(2004). Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **138**, 121-8

Devos, E. (1998). Impact du cadmium sur la morphologie et la physiologie des cellules à chlorure branchiales au cours du développement du saumon atlantique *Salmo salar L.*Thèse de doctorat. 189 pp

Dewes, L. J., Sandrini, J. Z., Monserrat, J. M. & Yunes, J. S.(2006). Biochemical and physiological responses after exposure to microcystins in the crab Chasmagnathus granulatus (Decapoda, Brachyura). *Ecotoxicol Environ Saf* **65**, 201-8

Dowling, V. et al.(2006). Protein carbonylation and heat shock response in Ruditapes decussatus following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: a proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquat Toxicol* **77**, 11-8

Fleischer, M. et al.(1974). Environmental impact of cadmium: a review by the Panel on Hazardous Trace Substances. *Environ Health Perspect* **7**, 253-323

Friguet, B.(2006). Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett* **580**, 2910-6

Gamble, S.C., Goldfarb, P.S., Porte, C., Livingstone, D.R. (1995). Glutathione Peroxidase and other Antioxidant Enzyme Function in Marine Invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asteria rubens*). *Marine Environ. Research* **39**, 191-195

Geret, F., Cosson, R.P. (1999). Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique: variabilité entre sites et organes chez l'huître *Crassostrea gigas*. *Oceanologica Acta* **23** n°3

Ghezzi, P. & Bonetto, V.(2003). Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* **3**, 1145-53

Gilles, R. et al. (2006). Physiologie animale. De boeck Université

Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M. & Santos, M. A.(2006). Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in Anguilla anguilla L. - the influence of pre-exposure to beta-naphthoflavone. *Chemosphere*

Guan, R. & Wang, W. X.(2006). Multigenerational cadmium acclimation and biokinetics in Daphnia magna. *Environ Pollut* **141**, 343-52

Hansen, B. H., Romma, S., Garmo, O. A., Olsvik, P. A. & Andersen, R. A.(2006). Antioxidative stress proteins and their gene expression in brown trout (Salmo trutta) from three rivers with different heavy metal levels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **143**, 263-74

Herborg, L.-M., Rushton, S., Clare, A., Bentley, M. (2003). Spread of the Chinese mitten crab (Eriocheir sinensis H. Milne Edwards) in Continental Europe: analysis of a historical data set. *Hydrologia* **503**, 21-28

Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, d.G., Wood, C.M. (1999). Cd accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* **46**, 101-119

Hour, W.S. (1966). General and comparative physiology. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 108-117

Jurczuk, M., Brzoska, M. M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Galazyn-Sidorczuk, M. & Kulikowska-Karpinska, E.(2004). Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol* **42**, 429-38

Klerks, P.L. (1999). Acclimation to contaminants by the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: individual contaminants vs. mixtures. *Ecotoxicology* **8**, 277-286

Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Paris, 419 pp.

Livingstone, D. R.(2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar Pollut Bull* **42**, 656-66

Livingstone, D.R. (1991). Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates dans : Gilles, R. (1991). Advances in Comparative and Environmental Physiology, Berlin; Springer-Verlag, 45-185

Lock, K. & Janssen, C. R.(2001). Tolerance changes of the potworm Enchytraeus albidus after long-term exposure to cadmium. *Sci Total Environ* **280**, 79-84

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F. & Rocher, B.(2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels Mytilus edulis collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. *Aquat Toxicol* **70**, 83-93

McDonagh, B., Tyther, R. & Sheehan, D.(2005). Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel Mytilus edulis detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquat Toxicol* **73**, 315-26

McDonald, D.G., Wood, C.M. (1993). Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. Dans: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (eds.), Fish ecophysiology. Chapman et Hall, London, 297-321

McGeer, J. C., Szebedinszky, C., McDonald, D. G. & Wood, C. M.(2000). Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. *Aquatic Toxicol* **50**, 231-243

Meyer, J. N., Smith, J. D., Winston, G. W. & Di Giulio, R. T.(2003). Antioxidant defenses in killifish (Fundulus heteroclitus) exposed to contaminated sediments and model prooxidants: short-term and heritable responses. *Aquat Toxicol* **65**, 377-95

Monnet, F., Bordas, F., Deluchat, V. & Baudu, M.(2006). Toxicity of copper excess on the lichen Dermatocarpon luridum: Antioxidant enzyme activities. *Chemosphere*

Monteiro, D. A., de Almeida, J. A., Rantin, F. T. & Kalinin, A. L.(2006). Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **143**, 141-9

Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S. & Biagianti-Risbourg, S.(2006). Metallothioneins induction and antioxidative response in aquatic worms Tubifex tubifex (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to copper. *Chemosphere* **64**, 121-8

Mosleh, Y.Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G. (2005). Metallothioneine induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaete) exposed to the fungicide, fenhexamid. *Environ. Pollution* **135**, 73-82

Muyssen, B. T. & Janssen, C. R.(2004). Multi-generation cadmium acclimation and tolerance in Daphnia magna Straus. *Environ Pollut* **130**, 309-16

Nordberg, J. & Arner, E. S.(2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**, 1287-312

Normant, M., Wiszniewska A., Szaniawska A. (2000). The Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae) from polish waters. *Oceanologia*, **42** (3), 375-383

Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**, 134-139

Oguri, T. et al.(2000). Glutathione S-transferase-pi gene expression and platinum drug exposure in human lung cancer. *Cancer Lett* **156**, 93-9

Pan, L. & Zhang, H.(2006). Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, Charybdis japonica. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*

Pandey, S. et al.(2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). *Sci Total Environ* **309**, 105-15

Panning, A., (1938). The Chinese mitten crab. *Annu Rep. Smithsonian Inst.* 361-375

Pérez-Coll, C.S., Herkovits, J., Fridman, O., Daniel, P., D'Heramo, J.L. (1999). Metallothionein induction and cadmium uptake in *Bufo arenarum* embryos following an acclimation protocol. *Environ. Pollution* **106**, 443-448.

Rainbow, P. S. & Black, W. H.(2005). Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, Carcinus maenas and Eriocheir sinensis. *Aquat Toxicol* **72**, 45-65

Rajindar, S. Sohal (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 37-44

Rasmussen, A. D. & Andersen, O.(2000). Effects of cadmium exposure on volume regulation in the lugworm, Arenicola marina. *Aquatic Toxicol* **48**, 151-164

Reynders, H., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W. M. & Blust, R.(2006). Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (Cyprinus carpio) during simultaneous exposure to water and food (Tubifex tubifex). *Environ Toxicol Chem* **25**, 1558-67

Ribera, D., Narbonne, J. F., Michel, X., Livingstone, D. R. & O'Hara, S.(1991). Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp Biochem Physiol C* **100**, 177-81

Rudnick, D. A., Hieb, K., Grimmer, K. F., Resh, V.H. (2003). Patterns and processes of biological invasion: The Chinese mitten crab in San Francisco Bay. *Basic Appl. Ecol.* **4**, 249-262

Scandalios, J. G.(1997). Oxidative stress and defense mechanisms in plants: introduction. *Free Radic Biol Med* **23**, 471-2

Scandalios, J. G.(2002). The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* **27**, 483-6

Schoenmakers, T. J. et al.(1992). Actions of cadmium on basolateral plasma membrane proteins involved in calcium uptake by fish intestine. *J Membr Biol* **127**, 161-72

Silvestre, F. (2005). Réponses à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin, *Eriocheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse du protéome. Thèse de doctorat 274 pp

Silvestre, F. et al.(2006). Differential protein expression profiles in anterior gills of Eriocheir sinensis during acclimation to cadmium. *Aquat Toxicol* **76**, 46-58

Silvestre, F., Duchene, C., Trausch, G. & Devos, P.(2005a). Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab Eriocheir sinensis. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **140**, 39-45

Silvestre, F., Trausch, G. & Devos, P.(2005b). Hyper-osmoregulatory capacity of the Chinese mitten crab (Eriocheir sinensis) exposed to cadmium; acclimation during chronic exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **140**, 29-37

Veldhuizen, T.C., Stanish,S. (1999). Overview of the life history, distribution, abundance, and impacts of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. California Department of water Resources, Sacramento, USA

Verbost, P.M., Van Rooij, J., Flik, G., Lock, R.A.C., Wendelaar Bonga, S.E. (1989). The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. J. *Exp. Biol.* **145**, 185-197

Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J. & Xue, Y.(2004). Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish Carassius auratus. *Chemosphere* **55**, 167-74

Zohouri, M. A., Pyle, G. G. & Wood, C. M.(2001). Dietary Ca inhibits waterborne Cd uptake in Cd-exposed rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **130**, 347-56

Annexe 1 : Dosage de la peroxydation lipidique

La procédure expérimentale consiste à :

- Mélanger 500µl d'homogénat (non dilué pour l'hépatopancréas et dilué 10X pour les branchies) directement avec du TCA 5% (trichloroacetic acid) en proportion 1 :1.
- Incuber sur glace pendant 15 minutes
- Mélanger la solution avec du TBA (thiobarbituric acid) 0.67% en proportion 2 :1 (67mg de TBA dans 1ml de DMSO + 9ml d'H_2O).
- Centrifuger à 3000 RPM (2200g) pendant 10min à 4°C.
- Faire bouillir le surnageant pendant 10min.
- Laisser refroidir à température ambiante.
- Lire l'absorbance à 535 nm.

La droite de calibration s'obtient avec des quantités croissantes de 1,1,2,3 méthylmalonaldéhyde (TMOP). Préparer une solution stock 500 µM (4µM de TMOP dans 1ml d'éthanol + 49 ml d'eau).
Diluer dans de l'eau pour obtenir comme concentration finale 10-5-2,5-1,25-0,625 µM. Cette solution subit les mêmes traitement que les échantillons (TCA 5% + TBA 0.67% + centrifugation + 100°C).

Annexe 2 : Dosage du glutathion total (GSH)

La procédure expérimentale consiste à :

	Blanc(µl)	**Test (ul)**
Tampon phosphate 200mM ; EDTA 0.1mM; pH 7.5	740	740
NADPH 0.2mM final	100	100
DTNB 0.15mM final	100	100
Echantillon	/	20
SSA 5%	20	/
GR 2U/ml final	40	40

La GR est ajoutée en dernier. Il est nécessaire de bien mélanger la cuvette avent de la passer au spectrophotomètre à 412 nm pendant 5 minutes. L'échantillon, après homogénéisation dans le tampon phosphate doit être dilué dans du SSA 5% en proportin 1 :1 et centrifugé à 10000g pendant 10 minutes.

La concentration en GSH est calculée à l'aide d'une droite de calibration obtenue avec des concentrations croissantes de GSH purifiée :

	0 pmoles (Blanc)	**60 pmoles**	**120 pmoles**	**180 pmoles**	**240 pmoles**	**300 pmoles**
Tampon phosphate	740	740	740	740	740	740
NADPH	100	100	100	100	100	100
DTNB	100	100	100	100	100	100
SSA 2.5%	20	16	12	8	4	0
GSH (15µM)	0	4	8	12	16	20
GR	40	40	40	40	40	40

La GSH est diluée dans du SSA 1% afin d'obtenir une concentration final de 15µM. De nouvelles solutions doivent être préparées chaque mois et tous les échantillons doivent être calculés à partir de la même courbe d'étalonnage.

Annexe 3 : Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

La procédure expérimentale consiste à :

	Blanc (µl)	**Test (µl)**
Tampon phosphate 50mM. EDTA 1mM. NaN_3 1mM. pH 7	550	550
GR 2U/ml final	100	100
GSH 2Mm final	100	100
NADPH 0.2Mm final	100	100
Tampon d'homogénéisation	50	/
Echantillon	/	50
10 minutes à T° ambiante		
	100	100
Lecture à 340 nm pendant 5 min		

La réaction commence lors de l'ajout des 100µl de H_2O_2 et la diminution de l'absorption à 340nm est mesurée pendant 5 minutes. Le blanc (avec le NADPH et l'H_2O_2 mais sans l'échantillon a une absorbance initiale d'environ1.2 et un taux de décroissance de -0.017 dA/min. Nous utilisons ce blanc comme le zéro.
Il faut faire attention à ce que l'absorbance initiale de l'échantillon ne dépasse pas celle du blanc 2. Dans ce cas, cela signifie qu'il y a une interférence entre l'opacité de l'échantillon due à la dilution. Il faut donc diluer beaucoup plus l'échantillon.

Annexe 4 : Dosage de la glutathion réductase (GR)

La procédure expérimentale consiste en :

	Blanc (µl)	**Test (µl)**
Tampon phosphate 100mM ; EDTA 0.5mM ; pH 7.6	600	600
GSSG 2mM final	100	100
NADPH 0.2mM final	/	100
H_2O	100	/
10 minutes à température ambiante		
Echantillon	200	200
Lecture à 340 nm pendant 5 minutes		

La réaction débute lors de l'ajout des 150µl d'échantillon. La diminution de l'absornace à 340 nm est mesurée pendant 5 minutes.
Le blanc contient le même volume d'échantillon que le test de façon à corriger les interférences dues à l'opacité de la solution.

Annexe 5 : Dosage de la glutathion S-transférase

La procédure expérimentale consiste en :

	Test (µl)	**Blanc 1 (µl)**	**Blanc 2 (µl)**
Tampon Hepes pH 7.5 ;33mM (23mM final)	700	700	700
CDNB (dans ethanol) 1.5 mM final	15	15	15
GSH 1.5mM final	10	10	/
H_2O	255	275	265
Echantillon	20	/	20

La reaction débute par l'ajout des 20µl d'échantillon. L'augmentation de l'absorbance à 340 nm est mesurée pendant 3 minutes à température ambiante.
Le blanc 1 est utilisé comme zéro, le blanc 2 n'est pas toujours nécessaire.

Annexe 6 : Dosage de la catalase (CAT)

La procédure expérimentale consiste en :

Premièrement, nous préparons une solution stock appelée BC contenant

- 1g de BSA ;
- 100ml de tampon d'Imidazol 0.2M pH 7.0 ;
- 900ml d'H_2O

Deuxiémement, nous préparons une solution stock de TiOSO4 : 1.7g de $TiOSO_4$ dans 500ml d'H_2SO_4 2N. On laisse bouillir cette solution pendant 10 minutes et on la laisse refroidir jusqu'au jour suivant. Le lendemain, nous diluons 1.5 fois la solution avec du H_2SO_4 et nous la filtrons sur du papier Whatman.

Troisièmement, nous ajustons la quantité de H_2O_2 à la solution BC. Nous essayons tout d'abord avec 40µl de H_2O_2 30% ajouté à 250ml de BC dui devient la solution SC. Ensuite, nous ajoutons 0.75ml de $TiOSO_4$ 0 1.3ml de SC. La lecture se fait à 420 nm. L'absorbance doit être comprise entre 0.75 et 0.95. Si celle-ci n'est pas atteinte, on ajoute un nouveau volume d'H_2O_2.

Ensuite, nous procédons aux remplissages des cuvettes comme décrit ci-dessous :

	Test (µl)	**Blanc 1 (µl)**	**Blanc 2 (µl)**
SC	1250	/	/
BC	/	1250	1250
Triton X-100 2%	25	25	25
Tampon phosphate	/	25	/
Echantillon	25	/	25
6 minutes à 0°C			
$TiOSO_4$	750	750	750
Lecture à 420 nm après 5 à 10 minutes			

Chaque unité de catalase est définie comme la quantité d'enzymes causant la destruction de 90% du substrat en 1 minute dans un volume de 50 ml sous les conditions expérimentales.
L'absorbance du blanc spectro est prise comme le zéro. L'absorbance du blanc test est soustraite de l'échantillon. Cela correspond à la réaction intrinsèque de l'échantillon avec le $TiOSO_4$.

Annexe 7 : Dosage de la superoxyde dismutase (SOD)

Premièrement, nous préparons une solution appelée MIX A (tous les réactifs sont dissous dans du tampon phosphate) :

- 132ml de tampon phosphate 50mm pH 7.8 + DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) 1.33 mM + BSA 0.2mg/ml
- 5ml de catalase 40 U/ml (=1.25 U final)
- 5ml de NBT (nitroblue tétrazolium) 2.24 mM, préparé le jour même et gardé à l'abri de la lumière
- 17ml de Xanthine 1.8 mM (où l(on a ajouté une toute petite quantité de NaOH pour aider à dissoudre)
- 1ml de BCS (Bathocuproine disulfonic acid) 10mM

Ensuite, nous testons les différentes quantités de xanthine oxydase (XOD) afin d'obtenir une absorbance finale comprise entre 0.02 et 0.03. La XOD est diluée dans du tampon phosphate + DTPA + BSA comme décrit ci-dessus.

La procédure expérimentale est la suivante :

- 800µl de MIX A
- 100µl de tampon phosphate
- 100µl de XOD (à ajuster)

Nous avons déterminé qu'une solution stock de 0,5 U de XOD/ml permet une bonne calibration d'absorbance. L'addition de 25 µl de cette solution (0,0125 U) donne une valeur d'absorbance de 0,035.

Cependant, une nouvelle évaluation doit être réalisée au début de chaque journée ou à chaque fois que nous préparons une nouvelle solution de XOD.
Cette valeur d'absorbance est due à la formation maximale de $O_2^{\cdot -}$. L'addition de SOD dans l'échantillon diminuera l'absorbance du à la réduction de $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2. L'unité d'activité SOD est définie comme la quantité qui inhibe la réduction du NBT de moitié sous les conditions décrites ci-dessus.

	Blanc 1 (µl)	**Blanc 2 (µl)**	**Test 1 (µl)**	**Test 2 (µl)**	**Test 3 (µl)**	**Test4 (µl)**	**Test5 (µl)**
MIX A	800	800	800	800	800	800	800
Echant.	/	50	10	25	50	75	100
XOD	/	/	25	25	25	25	25
Tp PO_4	200	150	165	150	125	100	75

La lecture se fait à 560 nm pendant 5 minutes

Remarque : Les volumes des tests doivent être ajustés en fonction des valeurs d'absorbance. Idéalement, une valeur doit être au-dessus et une autre en dessous de 50% d'inhibition de la valeur maximale avec le XOD seul.