



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Etude de l'effet d'un pesticide pyréthroïde et sa modulation par les conditions environnementales sur la réponse biologique de *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978) : approche biochimique

DE MEULDER, Bertrand

Award date:
2007

[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.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ETUDE DE L'EFFET D'UN PESTICIDE PYRETROÏDE ET SA MODULATION PAR
LES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LA REPONSE BIOLOGIQUE DE
PENAEUS MONODON (FABRICIUS, 1798) : APPROCHE BIOCHIMIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**
Bertrand De Meulder
Septembre 2007

VLS 20068507

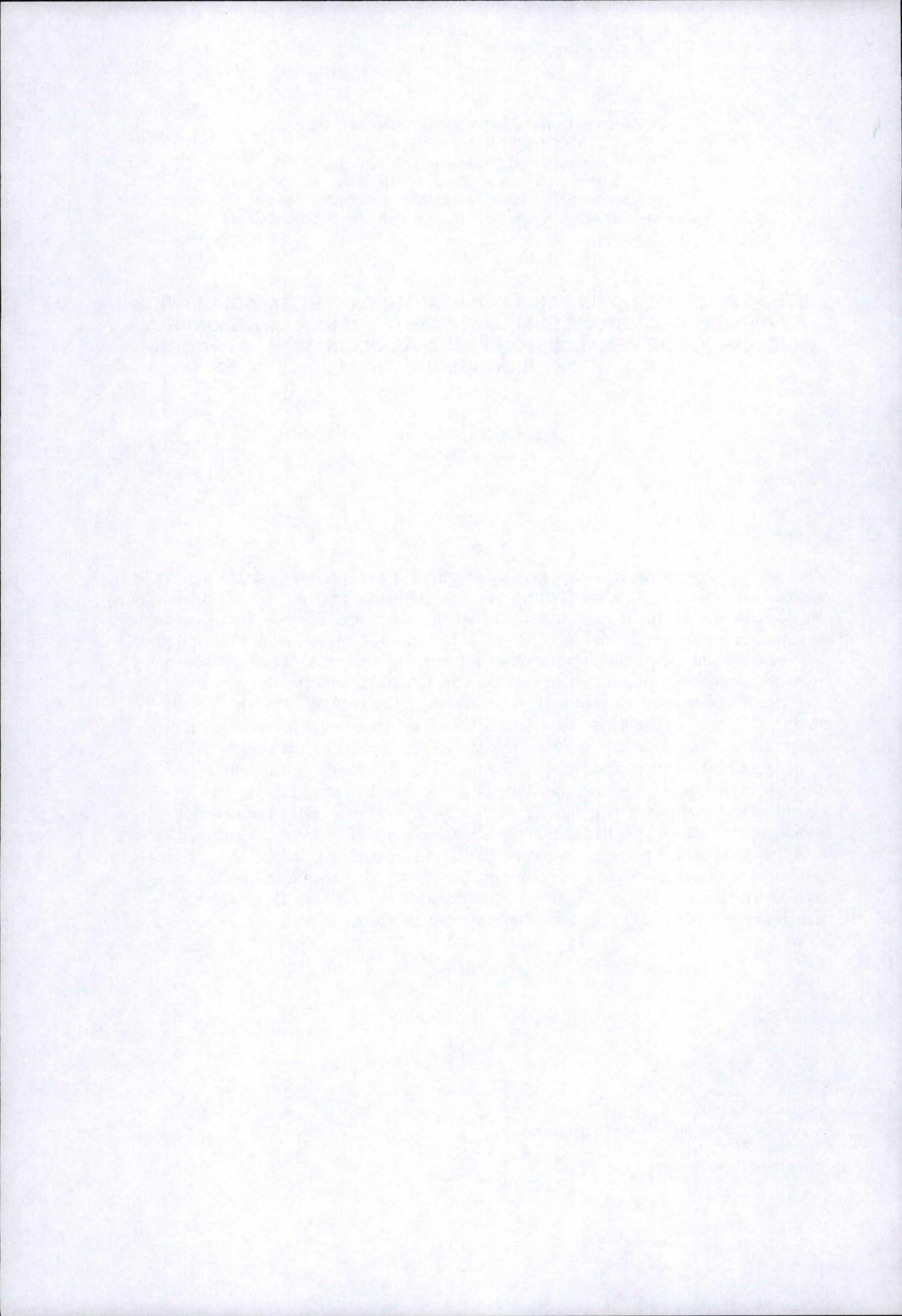
Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**ETUDE DE L'EFFET D'UN PESTICIDE PYRETHROÏDE ET SA MODULATION
PAR LES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LA REPONSE
BIOLOGIQUE DE *PENAEUS MONODON* (FABRICIUS, 1798) : APPROCHE
BIOCHIMIQUE**

DE MEULDER Bertrand

Résumé

L'impact d'un pesticide pyréthroïde, la deltaméthrine à une concentration de 0,1 µg/l sur la réponse biologique de la crevette géante tigrée *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798), ainsi que sa modulation par la salinité et la température ont été mesurés lors d'une contamination aiguë de 4 jours, en conditions de laboratoire (Can Tho University, Mekong Delta, Vietnam). Nos résultats indiquent que l'effet du pesticide est fortement dépendant de la température et, à moindre mesure, de la salinité. Nous avons constaté l'effet du pesticide sur l'activité de l'acétylcholine estérase dans les muscles (diminution de l'activité de 20 % : 3010 ± 181 nmol/min/mg prot en conditions contrôle et 2708 ± 344 nmol/min/mg prot en conditions tests) et sur certains paramètres du stress oxydant comme l'activité de la glutathione peroxydase dans l'hépatopancréas (379 ± 68 µmol NADPH/min/mg prot au jour 0 et de 207 ± 39 µmol NADPH/min/mg prot au jour 4) ou de la concentration en glutathion dans les branchies (15 ± 1 nmol GSH / g tissu au jour 0 et de 25 ± 3 nmol GSH / g tissu au jour 4). La modulation de l'effet du pesticide par la température est visualisée dans les résultats d'activité de la glutathione peroxydase dans l'hépatopancréas et l'hémolymphe, de la catalase et dans la concentration en glutathion dans les branchies. Ces résultats indiquent que l'utilisation de la deltaméthrine dans les fermes d'élevage doit être modifiée en fonction des conditions de température et de salinité susceptibles d'influencer la toxicité de ce pesticide.



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>

**STUDY OF THE EFFECT OF A PYRETHROID PESTICIDE AND ITS
MODULATION BY ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON THE BIOLOGICAL
RESPONSE OF *PENAEUS MONODON* (FABRICIUS, 1798): BIOCHEMICAL
ASPECTS**

DE MEULDER Bertrand

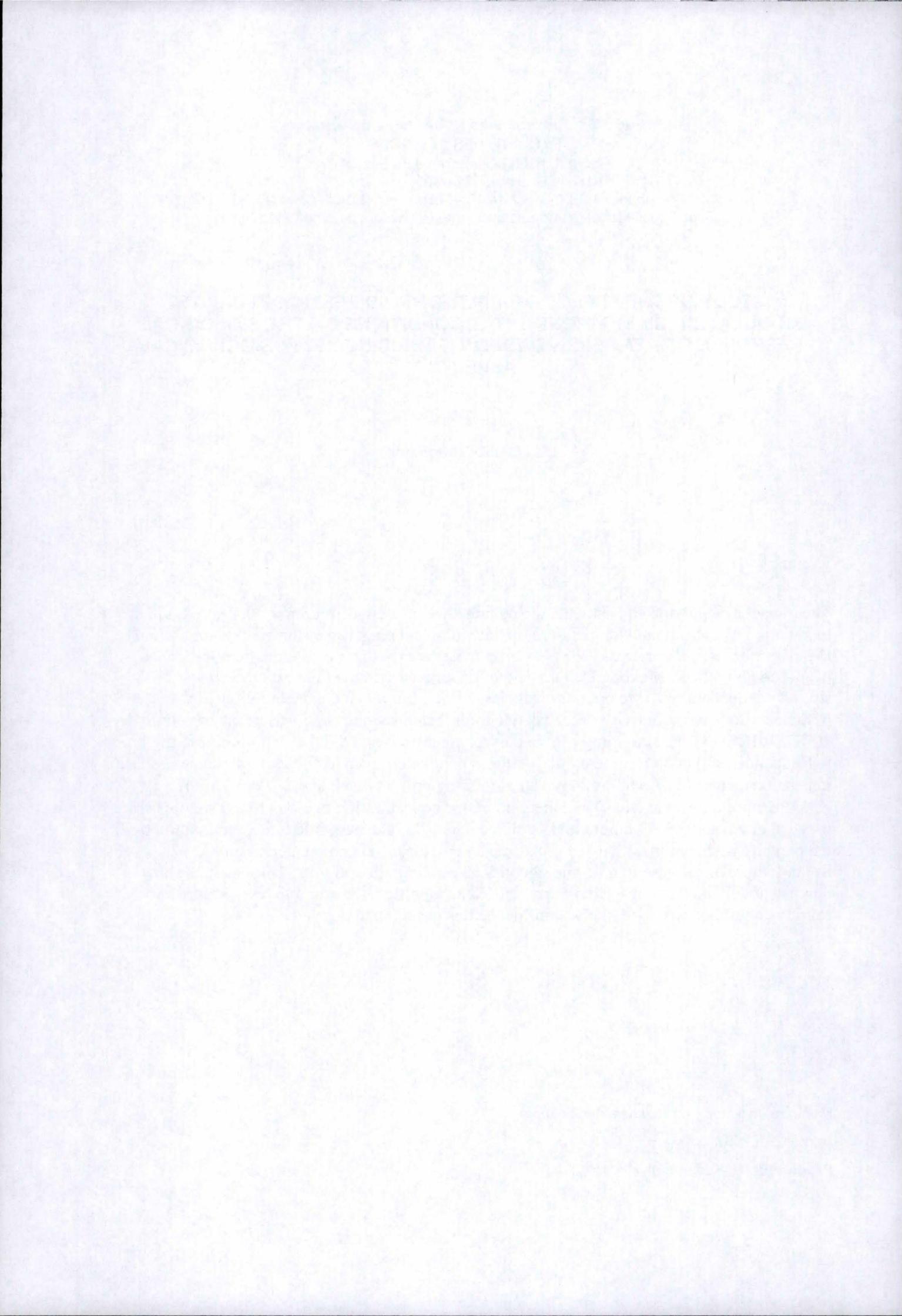
Summary

The impact of a perythroid pesticide, the deltamethrin at a concentration of 0,1 µg/l, and its modulation by salinity and temperature on the biological response of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) has been measured during a contamination of 4 days (Can Tho University, Mekong Delta, Vietnam). Our results show the pesticide effect is strongly dependant of the temperature and less of the salinity. We have highlighted the pesticide effect on the activity of the acetylcholine esterase in muscles (decrease of activity by 20 % : 3010 ± 181 nmol/min/mg prot in control conditions and 2708 ± 344 nmol/min/mg prot in test conditions) and on some oxidative stress parameters such as the glutathione peroxidase in hepatopancreas (379 ± 68 µmol NADPH/min/mg prot on day 0 and 207 ± 39 µmol NADPH/min/mg prot at day 4) and the glutathione concentration in gills (15 ± 1 nmol GSH /g tissue at day 0 and 25 ± 3 nmol GSH / g tissue at day 4). The pesticide effect modulation by temperature is shown in activity of glutathione peroxidase in hepatopancreas and haemolymph, of catalase in gills and glutathione concentration in gills. These results show that use of deltamethrin in shrimp farms should be modified according to temperature and salinity conditions wich are likely to influence this pesticide toxicity.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Septembre 2007

Promoteur: P. Kestemont



Remerciements :

Je voudrais remercier le Pr. Patrick Kestemont, mon promoteur, pour m'avoir donné la possibilité de découvrir ce magnifique pays qu'est le Vietnam, de même que le Pr. Nguyen Thanh Phuong, le directeur du collège d'Aquaculture et pêche de l'université de Can Tho pour m'avoir accueilli au sein de son établissement.

Au laboratoire de Can Tho, Melle Huyn Thi Tu pour nous m'avoir pris en charge au cours du séjour ainsi que tout le personnel de l'écloserie pour m'avoir aidé à mettre en place le matériel considérable nécessaire à mon expérience.

Au laboratoire de Namur, je remercie chaleureusement Marie-Claire Forget pour sa patience et ses conseils éclairés ainsi que sa bonne humeur. Je remercie également Frederic Sylvestre d'avoir accepté, malgré son emploi du temps chargé, de prendre en charge le rôle de tuteur.

Je remercie également Benoît de Hertog pour m'avoir sorti du brouillard sur le plan statistique.

Je remercie ma famille pour avoir cru en moi et m'avoir soutenu pour la réalisation de ce projet.

Je remercie aussi mes amis et mes camarades d'URBO pour m'avoir supporté pendant ces quatre ans et m'avoir permis de garder les pieds sur terre.

Un tout grand merci à Noé, sans qui ce voyage aurait été bien morne, pour sa folie et sa « bonne » humeur. Je ne pourrais pas penser à ce voyage sans toi.

Andrew, Tho, Johnny, Claire, Laure, Mr Bruce, les françaises et les anglaises ... La fine équipe...

Merci à tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de ce mémoire et de ces quatre années.

Merci à vous, lecteur, de passer du temps à lire ma production

Enfin merci à Bob, la crevette inconnue, pour toutes les autres qui se sont sacrifiées au nom de la science.

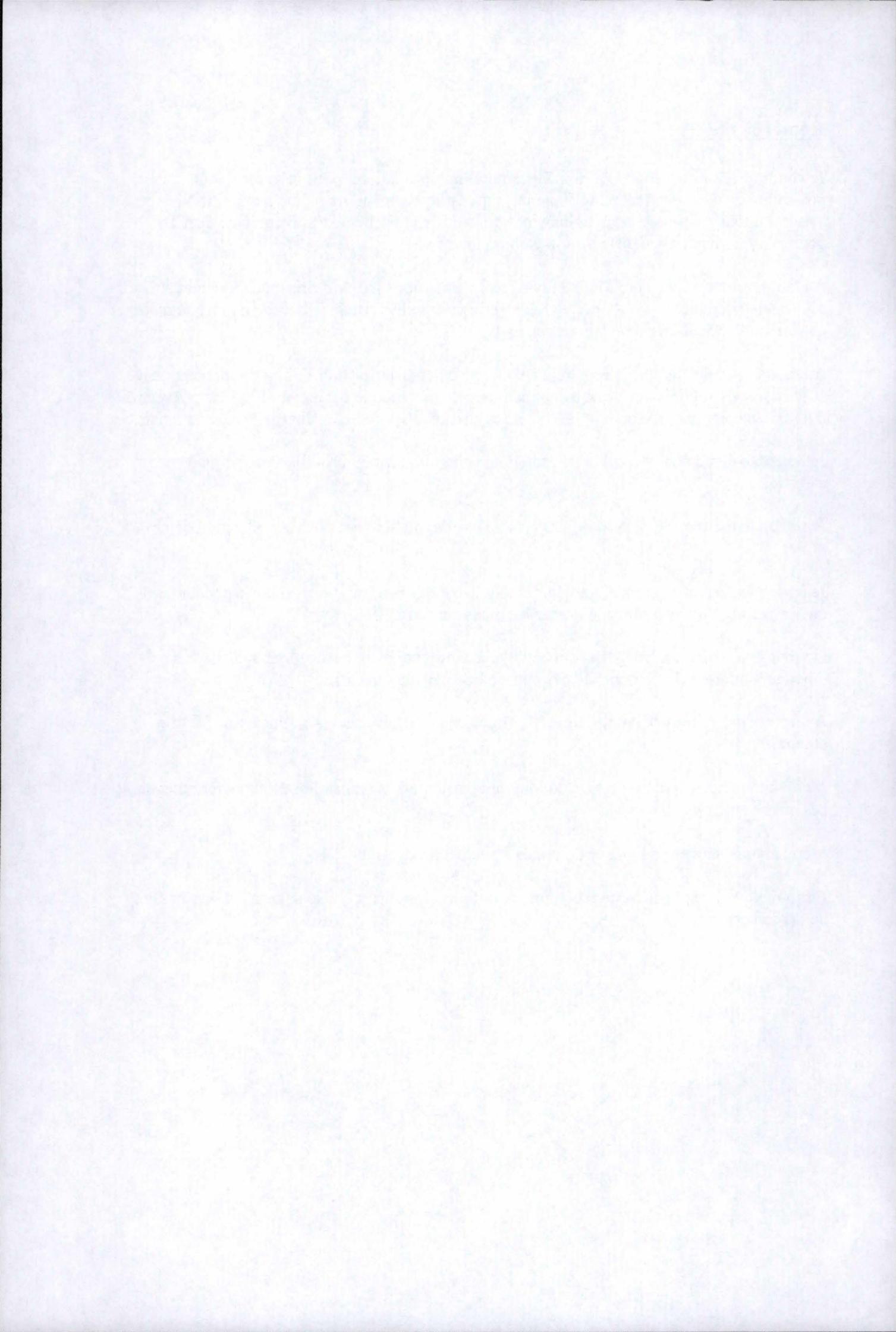
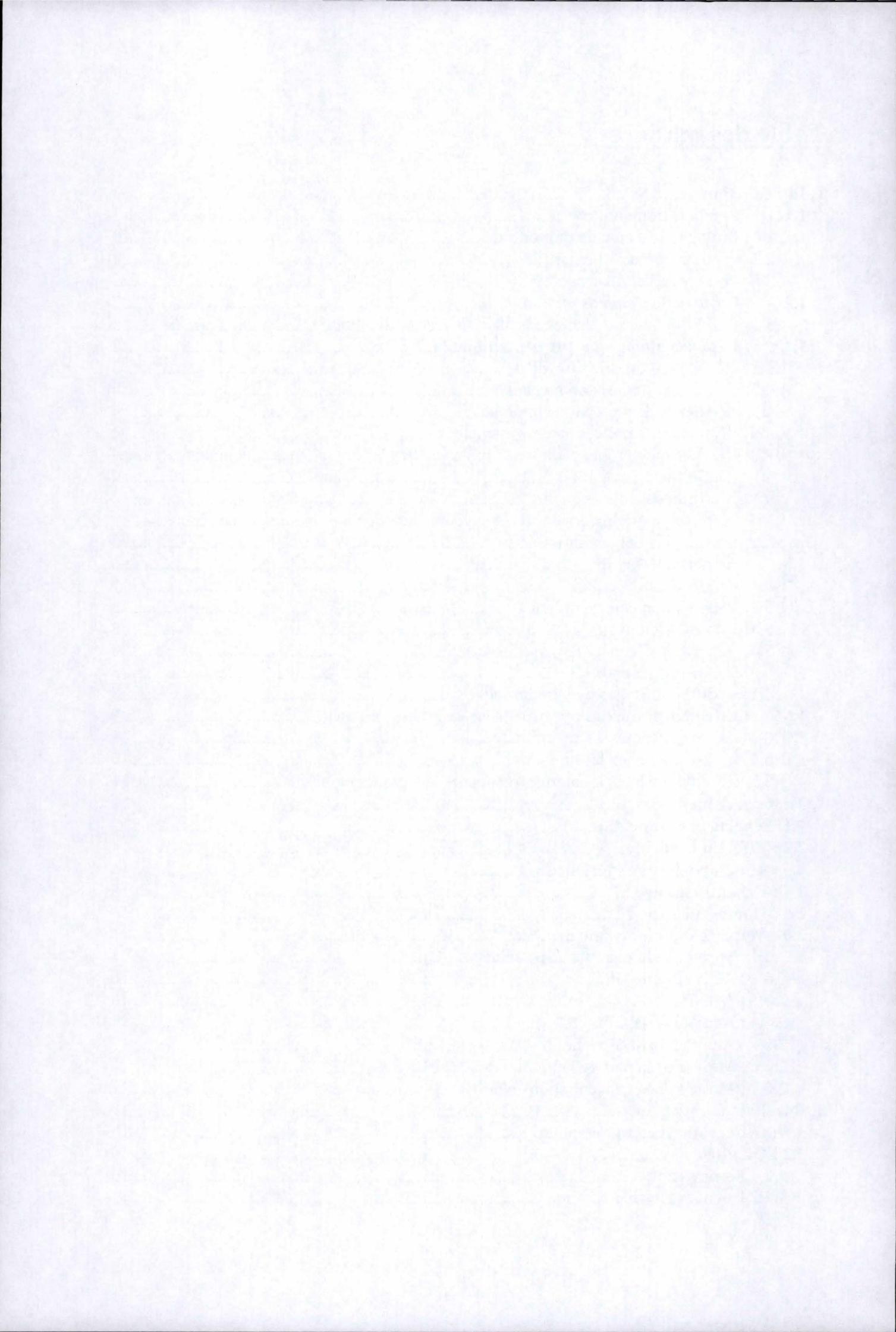
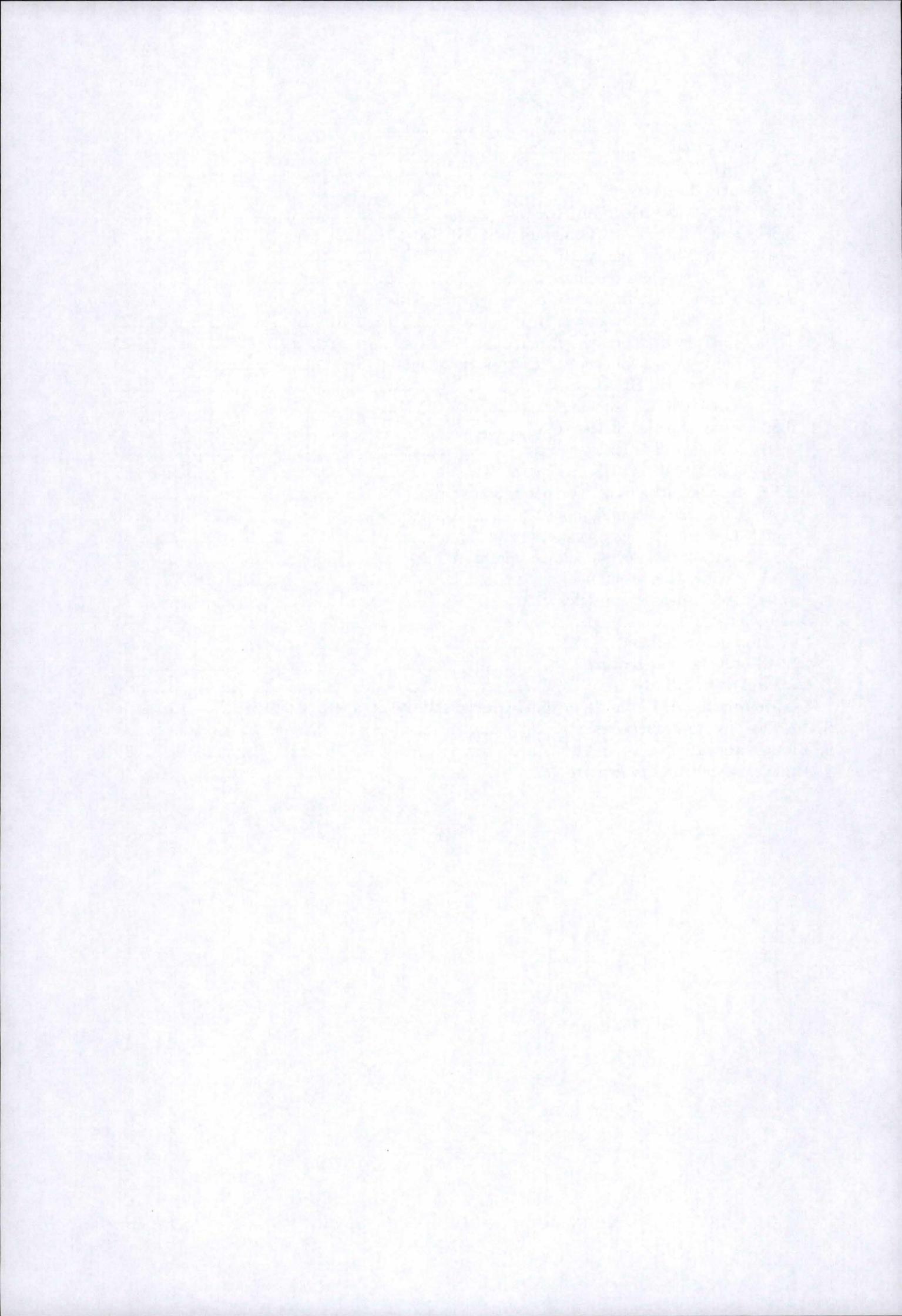


Table des matières :

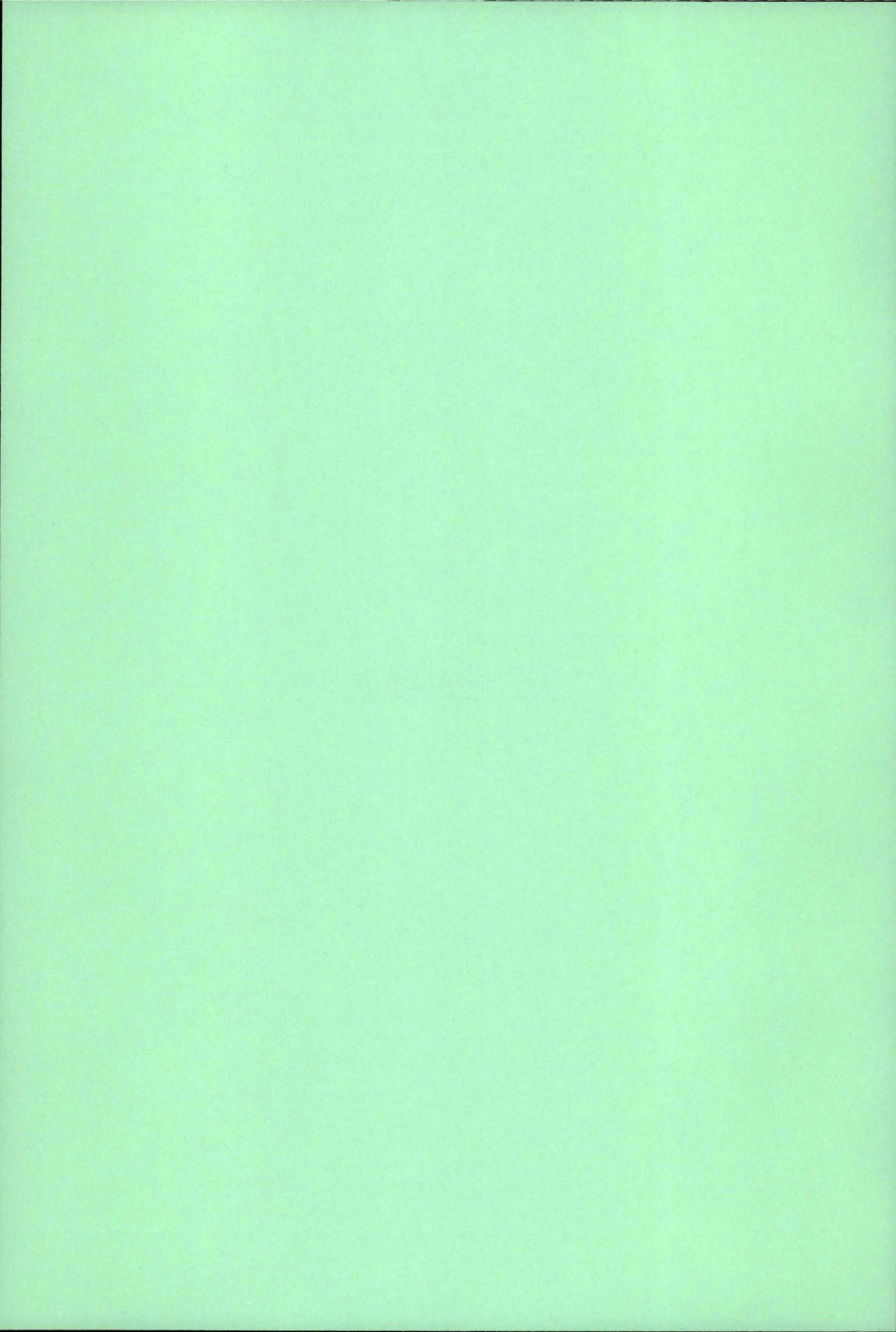
| | |
|--|----|
| 1: Introduction | 1 |
| 1.1 : Présentation générale | 1 |
| 1.2 : Biologie de <i>Penaeus monodon</i> | 1 |
| 1.2.1 : Taxonomie et répartition | 1 |
| 1.2.2 : Cycle de vie et écologie | 2 |
| 1.3 : Culture de <i>Penaeus monodon</i> | 2 |
| 1.3.1 : Principales maladies associées à la crevetticulture | 3 |
| 1.4 : Réponse biologique aux contaminants | 3 |
| 1.4.1 : Notion de stress oxydant | 3 |
| 1.4.2 : Les systèmes antioxydants | 4 |
| a) Systèmes de protection chimiques | 4 |
| b) Systèmes de protection enzymatiques | 4 |
| 1.4.3 : Les biomarqueurs du stress oxydant chez les organismes aquatiques | 4 |
| a) Définition | 4 |
| b) Utilisation des biomarqueurs | 4 |
| 1.4.4 : Les biomarqueurs du stress oxydant chez <i>Penaeus monodon</i> en réponse à contamination à la deltaméthrine. | 5 |
| 1.5 : La deltaméthrine | 6 |
| 1.5.1 : Toxicité | 7 |
| 1.5.2 : Dégradation dans le milieu..... | 8 |
| 1.5.3 : Bioaccumulation | 8 |
| 1.5.4 : Mode d'action des pyréthroïdes | 8 |
| a) Mécanisme général..... | 8 |
| b) Les différents types de pyréthroïdes | 8 |
| 1.6 : Effet des pesticides pyréthroïdes sur les organismes | 9 |
| 1.6.3 Toxicité chez les mammifères..... | 9 |
| 1.6.4 Toxicité chez les poissons | 10 |
| 1.6.5 Toxicité chez les autres organismes aquatiques et marins : | 11 |
| 2. Matériel & méthodes | 12 |
| 2.1: Schéma expérimental | 12 |
| 2.2 : Effet du pesticide | 14 |
| 2.3 : Monitoring de l'expérience | 14 |
| 2.4 : Echantillonnage | 15 |
| 2.5 : Homogénéisation | 15 |
| 2.6 : Mesures des biomarqueurs | 15 |
| 2.6.1 : Mesure de la quantité de protéines..... | 15 |
| 2.6.2 : Activité de la GST..... | 16 |
| 2.6.3 : Activité de la catalase..... | 16 |
| 2.6.4 : Activité de la GPx | 16 |
| 2.6.5 : Activité de l'acétylcholine estérase (AChE) | 17 |
| 2.6.6 : Mesure de la peroxydation lipidique (LPO)..... | 17 |
| 2.6.7 : Mesure de la concentration en GSH..... | 17 |
| 3. Résultats | 19 |
| 3.1 : Observations comportementales | 19 |
| 3.2 : Qualité de l'eau | 19 |
| 3.2.1 Formes azotées | 19 |
| 3.2.2 Données physico-chimiques..... | 19 |



| | |
|--|-----------|
| a) Température | 19 |
| b) O ₂ dissous | 19 |
| c) pH | 20 |
| 3.3 : Mesures du stress oxydant | 20 |
| 3.3.1 : Statistiques descriptives | 20 |
| 3.3.2 : Indice de peroxydation lipidique (TBARS) | 20 |
| a) Dans l'hépatopancréas : | 20 |
| b) LPO dans les branchies : | 21 |
| 3.3.3 : Mesure d'activité de la glutathion S-transférase | 22 |
| a) GST dans les hépatopancréas : | 22 |
| b) GST dans les branchies : | 23 |
| 3.3.4 : Mesure de la concentration en glutathion total (GSH) | 24 |
| a) GSH dans l'HP : | 24 |
| b) GSH dans les branchies | 27 |
| 3.3.5 : Activité de la catalase (CAT) | 29 |
| a) Catalase dans les branchies : | 29 |
| b) Catalase dans l'HP | 29 |
| 3.3.6 : Activité de la glutathion peroxidase (Gpx) | 30 |
| a) Gpx dans l'hémolymphe : | 30 |
| b) Gpx dans l'hépatopancréas : | 30 |
| 3.3.7 : Activité de l'acétylcholine estérase (AChE) : | 31 |
| a) AChE dans les branchies : | 31 |
| b) AChE dans les muscles | 32 |
| 4. Discussion | 34 |
| 4.1 : Effet du pesticide | 34 |
| 4.2 : Effet de la température | 35 |
| 4.3. Effet de la salinité | 36 |
| 4.4. Modulation de l'effet du pesticide par la salinité et la température | 36 |
| 5. Conclusions et perspectives | 37 |
| 6. Bibliographie | 39 |
| 7. Annexes: protocoles <i>in extenso</i> | 44 |



1. Introduction



1: Introduction

1.1 : Présentation générale

Dans le cadre d'une collaboration entre l'université de Can Tho (Vietnam) et l'université Notre-Dame de la Paix de Namur (Belgique), un projet de surveillance de la qualité des crevettes produites par l'aquaculture dans le sud Vietnam a été lancé. C'est dans la lignée de ce projet que s'inscrit mon mémoire. Le principal objectif est de développer une méthode rapide et peu onéreuse permettant de mesurer la présence de polluants dans les élevages.

Plus concrètement, mon mémoire traite de l'étude de l'effet d'un pesticide sur les biomarqueurs du stress oxydant et sa modulation par la température et la salinité.

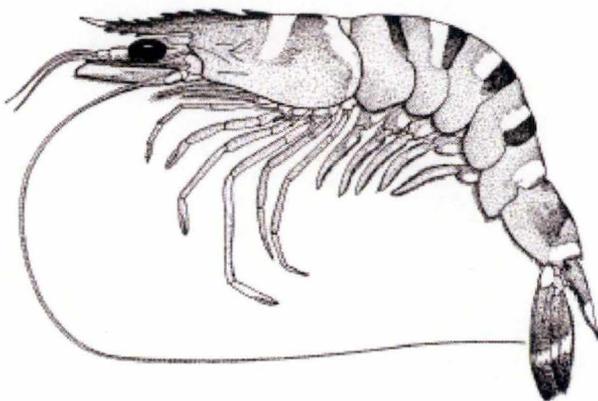
En s'appuyant sur les résultats disponibles dans la littérature et des années précédentes du projet (notamment ceux de J. Dorts (2006)), mais aussi dans un souci de représentativité de la réalité du terrain, le pesticide choisi pour cette expérience est la deltaméthrine (classe des pyréthroïdes). Dans les résultats précédents, les réponses étaient parmi les plus marquées et la deltaméthrine est globalement utilisée dans le delta du Mékong et dans d'autres régions crevetticoles du sud-est asiatique.

1.2 : Biologie de *Penaeus monodon*

1.2.1 : Taxonomie et répartition

La crevette *Penaeus monodon* fait partie de la famille des pénéidés, de l'ordre des décapodes, de la classe des malacostracés et du phylum des arthropodes.

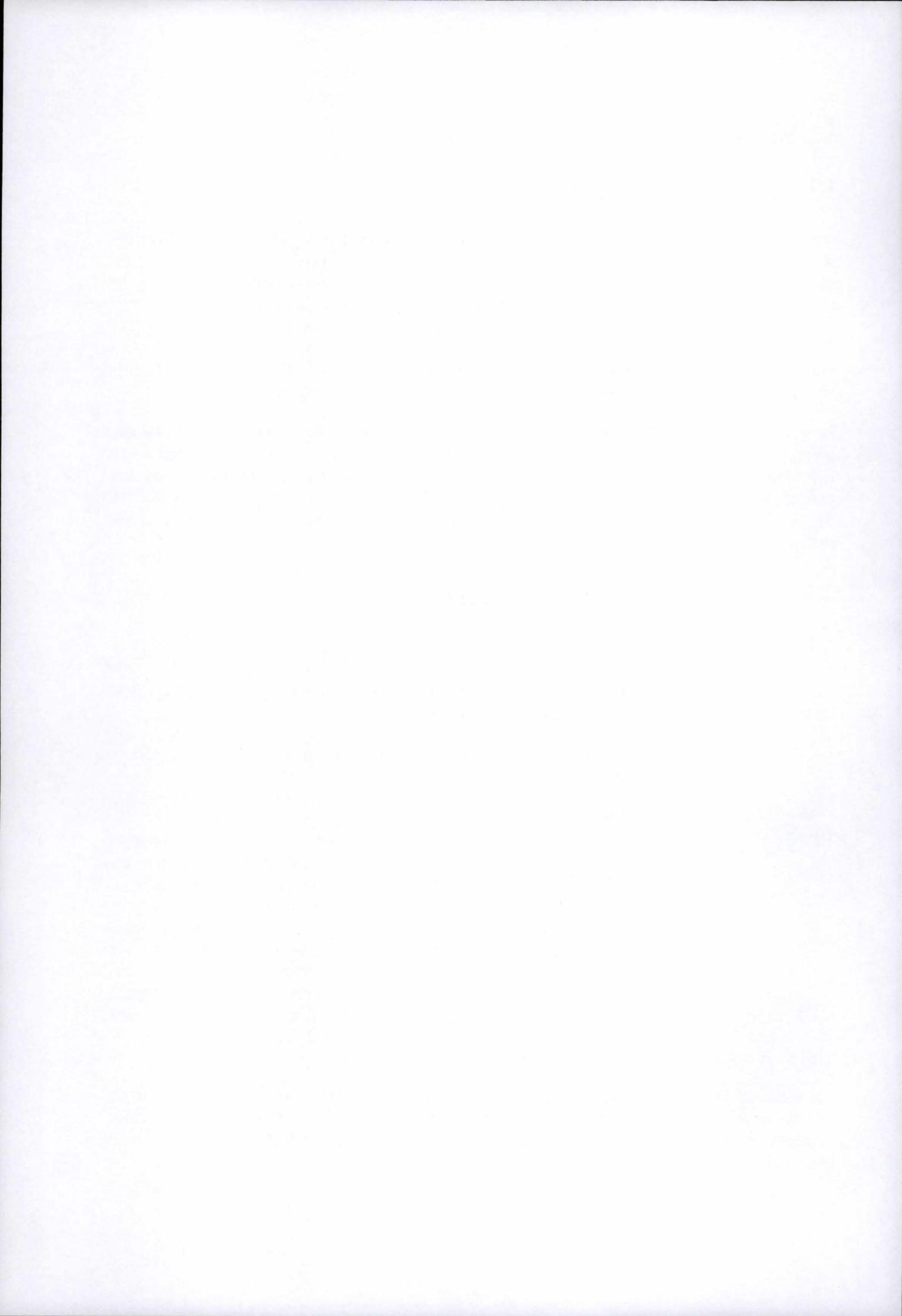
Les crevettes adultes peuvent mesurer jusqu'à 36 cm de long pour un poids d'environ 650 gr . Les principales caractéristiques distinctives sont :



- la présence d'un rostre important et denté,
- la pigmentation particulière : la couleur du corps varie entre vert, brun, rouge, bleu et gris. Les bandes transversales sur l'abdomen et la carapace (d'où le nom crevette géante tigrée) alternent entre bleu ou noir et jaune.

Figure 1 : Schéma d'une crevette *Penaeus monodon* adulte (source : FAO 1990)

Dans son milieu naturel, la crevette géante tigrée vit dans les eaux tropicales comprises entre la côte est de l'Afrique et la mer du Japon, depuis la Péninsule Arabique jusqu'aux côtes septentrionales de l'Australie. Des populations invasives ont été signalées en Méditerranée et près de la côte ouest des USA.



1.2.2 : Cycle de vie et écologie

La *Penaeus monodon* mature se reproduit dans les habitats marins tropicaux uniquement. Les larves migrent ensuite en se laissant porter par les courants et la marée vers les estuaires. Les stades larvaires, juvéniles, subadultes et adultes se déroulent dans les estuaires, les zones lagunaires et les mangroves.

En moyenne, une femelle pond entre 500.000 et 750.000 œufs qui éclosent après une quinzaine d'heures. La larve nauplius utilise ses réserves vitellines et passe rapidement par six mues. Les stades suivants (zoé, mysis et postlarve) sont planctoniques et se laissent porter par les courants vers les côtes.

Ces crevettes sont des prédateurs benthiques à activité nocturne marquée, passant la journée enfouies dans le substrat. A l'inverse des autres péneïdés, la *Penaeus monodon* est considérée comme un véritable prédateur et non pas comme un détritivore ou un omnivore. Les stades larvaires se nourrissent de phyto- et de zooplancton alors que les adultes se nourrissent principalement de crustacés et de mollusques ainsi que de polychètes, poissons et matières végétales en plus petite quantité.

1.3 : Culture de *Penaeus monodon*

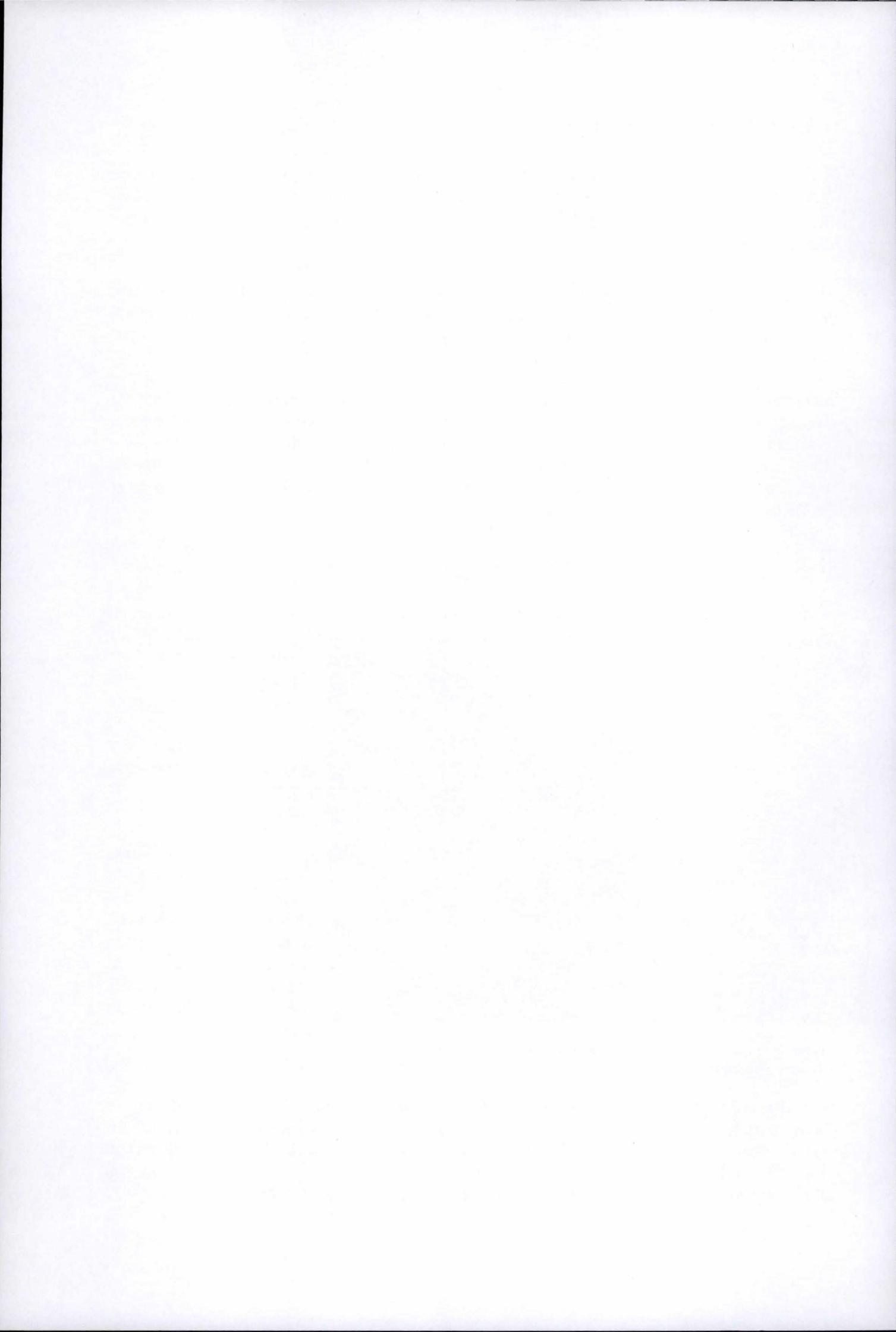
L'élevage de la crevette géante tigrée est une activité ancestrale en Asie du Sud-Est. Avant de devenir la source de profit importante qu'elle est aujourd'hui, elle fournissait de quoi nourrir des millions de familles, qui élevaient dans des bassins miniatures des petites quantités de crevettes.



Figure 2 : Principaux pays producteurs (source : Rapport FAO Cultured Aquatic Species Information Programme *Penaeus monodon*. 2007)

C'est en 1970 que l'industrialisation de la production s'amorce : des recherches, menées de front au Laboratoire de Recherche Marine de Taiwan et à l'IFREMER (centre de recherche du Pacifique, Tahiti),

ont permis de comprendre le cycle de vie et les habitudes de reproduction des péneïdés. Grâce à ces recherches, des élevages extensifs et semi-intensifs à échelle importante ont vu le jour en Thaïlande, entre 1972 et 1974. Par la suite, la maîtrise du cycle de reproduction et la formulation d'un aliment commercial performant ont permis un boom de création de fermes d'élevage intensif à petite échelle, à Taiwan et en Thaïlande, de 1980 à 1987. En 1988, la



Thaïlande devient le principal producteur, augmentant les quantités produites pour répondre à la demande du marché japonais. On pense que les élevages taiwanais ont été victimes de virus pendant la saison 1987-88, ce qui a permis l'essor de la production thaï. Jusqu'à aujourd'hui, la Thaïlande a su garder son statut de premier producteur mondial grâce à une gestion efficace des maladies et des systèmes de production.

1.3.1 : Principales maladies associées à la crevetticulture

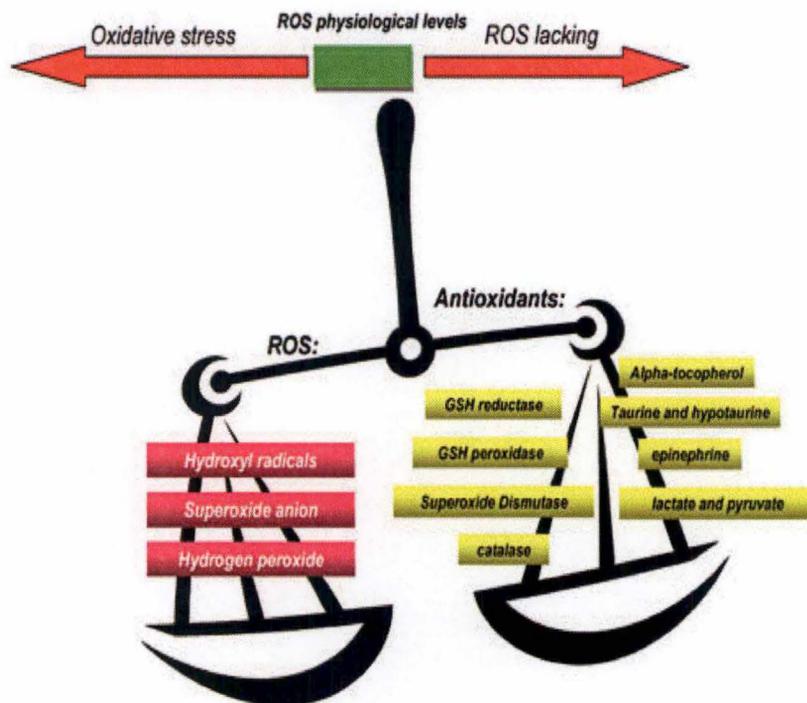
Depuis les débuts de la culture commerciale, les fermiers sont confrontés à différentes maladies, virales et bactériennes. Dans l'ordre des dégâts causés en Thaïlande, les principales maladies sont :

- la maladie des points blancs (white spot disease, causée par un virus bacilliforme)
- le virus de la tête jaune (yellow head virus, virus à ARN)
- la maladie due au parvovirus hépatopancréatique
- la maladie due au *Baculovirus monodon*

Ces maladies ont occasionné des pertes énormes pour les exploitants, détruisant des récoltes entières en quelques jours. En 1996-97, les pertes dues à la maladie des points blancs ont été estimées à un milliard US\$, uniquement en Thaïlande.

1.4 : Réponse biologique aux contaminants

1.4.1 : Notion de stress oxydant



Le stress oxydant est le résultat d'un déséquilibre entre les systèmes pro- et antioxydants d'un organisme, menant à des dégâts cellulaires causés par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (O_2^- , H_2O_2 , ...). Le stress oxydant peut être causé par des polluants, des variations environnementales ou des facteurs intrinsèques, comme un taux élevé en acides gras polyinsaturés. La respiration aérobie produit également des ROS, ce qui implique la nécessité constante de système de détoxification de ces molécules.

Figure 3 : Balance entre systèmes antioxydants et oxydants

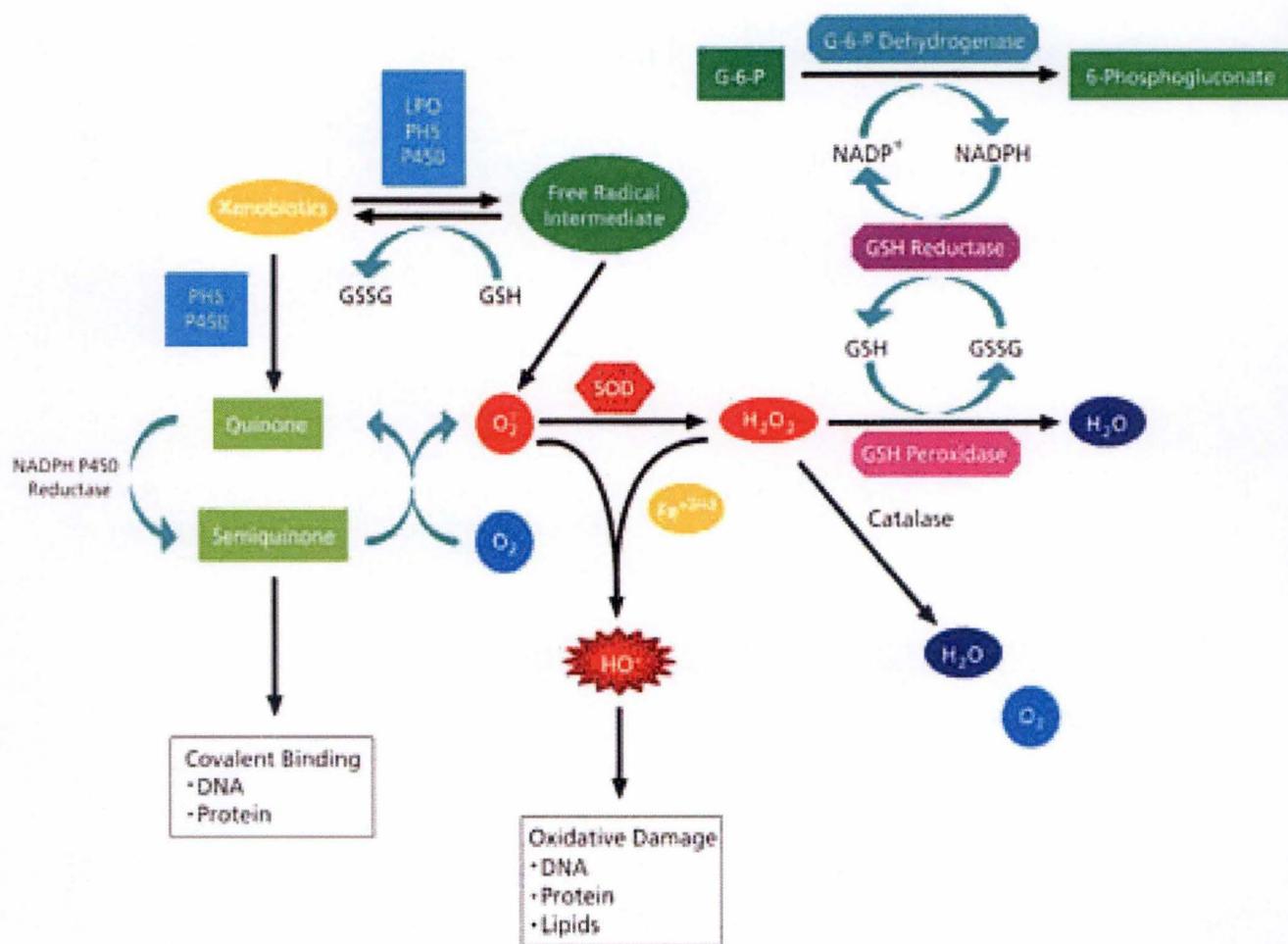


Figure 4: Schéma simplifié des voies métaboliques du stress oxydant.

1.4.2 : Les systèmes antioxydants

Il existe deux façons de se protéger des effets négatifs des ROS : la voie chimique et la voie enzymatique.

a) Systèmes de protection chimiques

Certaines molécules agissent comme des capteurs des espèces réactives de l'oxygène : les vitamines A, C et E qui agissent au sein des membranes ou le glutathion, qui agit comme donneur d'électrons dans les réactions de désactivation de l'oxygène réactif.

b) Systèmes de protection enzymatiques

Les systèmes enzymatiques visent à détruire les superoxydes (O_2^-) et les peroxydes (H_2O_2). Trois types d'enzymes sont utilisés : les superoxyde dismutases (SOD), les peroxydases (Exemple : la glutathion peroxydase (Gpx), qui réduit les lipides hydroperoxydés afin d'éviter les dommages intracellulaires de ceux-ci. On la trouve généralement dans le cytoplasme) et les catalases. D'autres enzymes sont également nécessaires, telle la glutathion S-transférase (GST), qui agit sur les molécules xénobiotiques électrophiles. Chez les pénéidés, la GST et les catalases sont particulièrement bien adaptées à l'évaluation du stress oxydant. (voir figure 4)

1.4.3 : Les biomarqueurs du stress oxydant chez les organismes aquatiques

a) Définition

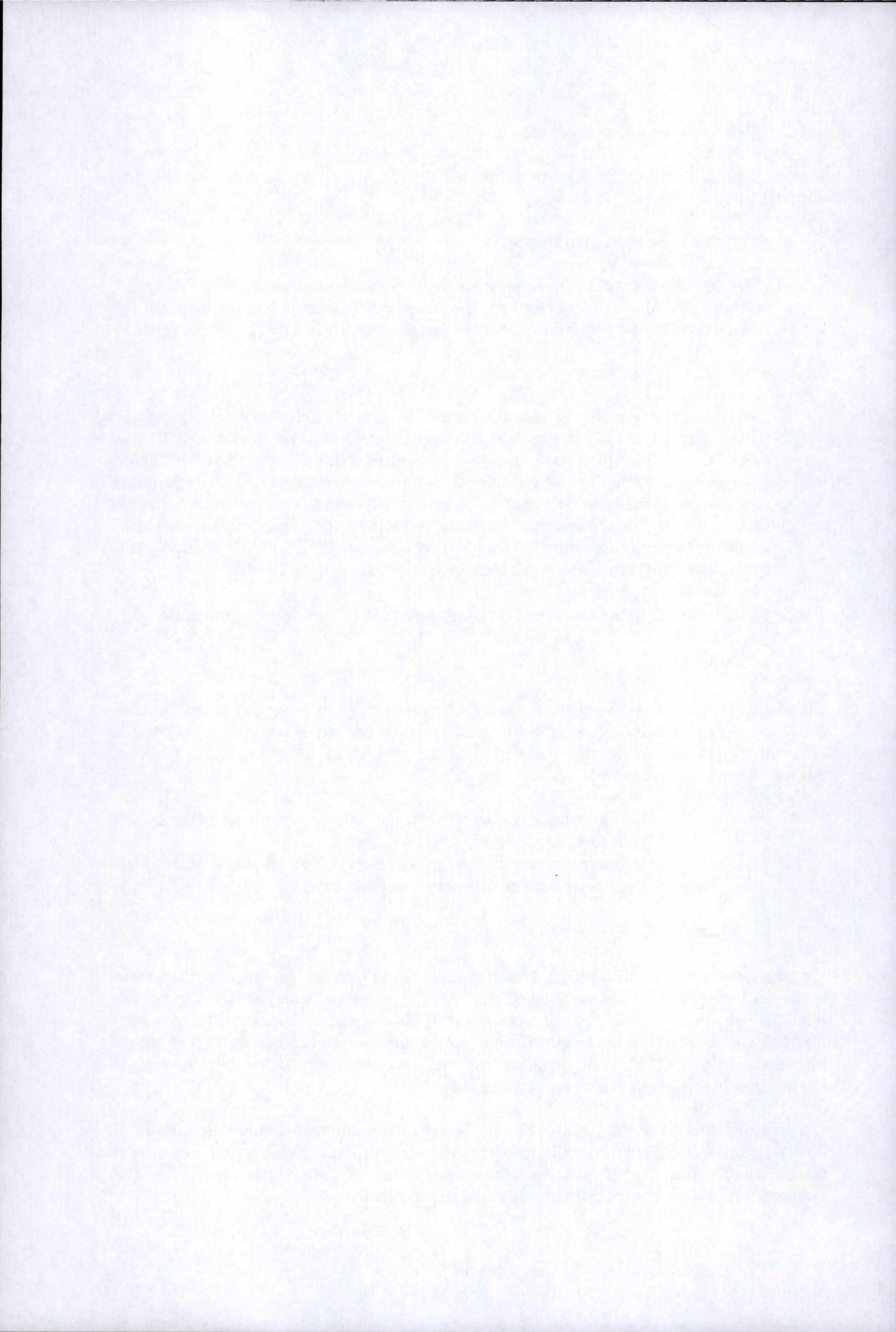
Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, cellulaire, physiologique ou comportemental en réponse à une exposition passée ou présente d'un individu à une molécule à caractère polluant (Lagadic *et al.*). Deux types de biomarqueurs sont principalement utilisés :

- les biomarqueurs d'exposition, qui indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme
- les biomarqueurs d'effet, qui montrent que le polluant a pénétré dans l'organisme et a eu un effet sur sa cible critique.

b) Utilisation des biomarqueurs

Un grand avantage de l'utilisation des biomarqueurs est qu'il ne faut pas disposer de matériel sophistiqué pour mesurer leurs changements, contrairement aux analyses chimiques fines (chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse, ...). Ils permettent en outre d'effectuer une batterie de tests à moindre coût, permettant de diriger les analyses plus lourdes ultérieures. Ils permettent enfin de mesurer une réponse intégrée (réaction de l'organisme à l'exposition au stress) et ce, avec une sensibilité élevée.

Les biomarqueurs du stress oxydant ont été proposés par différents auteurs (Fatima *et al.*, 2000), (Lamela *et al.*, 2005), pour les programmes de surveillance de la qualité des milieux aquatiques et marins. De nombreuses études ont établi une corrélation entre l'exposition à un polluant et la réponse par les biomarqueurs du stress oxydant.



Dans l'étude réalisée par S. Ménézès *et al* (2006), les variations dans l'activité de la GST, de la lactate déshydrogénase (LDH) et de l'acétylcholine estérase (AChE) ont été mesurés en fonction de la salinité, de la température et du stress de manutention, sur la crevette grise *Crangon crangon*. Ils ont mis en évidence que la diminution de la salinité augmente l'activité de la LDH, ce qui pourrait être dû à une augmentation de la demande en énergie pour assurer l'osmorégulation de l'organisme. Ils ont également remarqué qu'une augmentation de la température entraîne une augmentation de l'activité de l'AChE, ce qui est en accord avec les résultats indiquant une augmentation de l'activité endogène de l'AChE avec la température.

Pour Damiens *et al* (2004), qui ont utilisé l'activité de plusieurs biomarqueurs (GST et catalase notamment) pour mesurer l'impact de la salinité, de la température et de la présence de carbofurane (insecticide du groupe des carbamates), l'utilisation des biomarqueurs pour les programmes de biomonitoring est indispensable, étant donné la rapidité et la fiabilité des tests.

L'article publié en 2005 par Wang *et al* met en évidence la modification de l'activité de la super oxyde dismutase (SOD) chez la crevette géante *Penaeus monodon* en fonction de la salinité mais aussi en fonction de la présence d'une bactérie pathogène responsable de vibrioses, *Photobacterium damsela damsela*. Ils proposent donc dans leur conclusion l'utilisation de ce biomarqueur dans les programmes de surveillance de cette maladie.

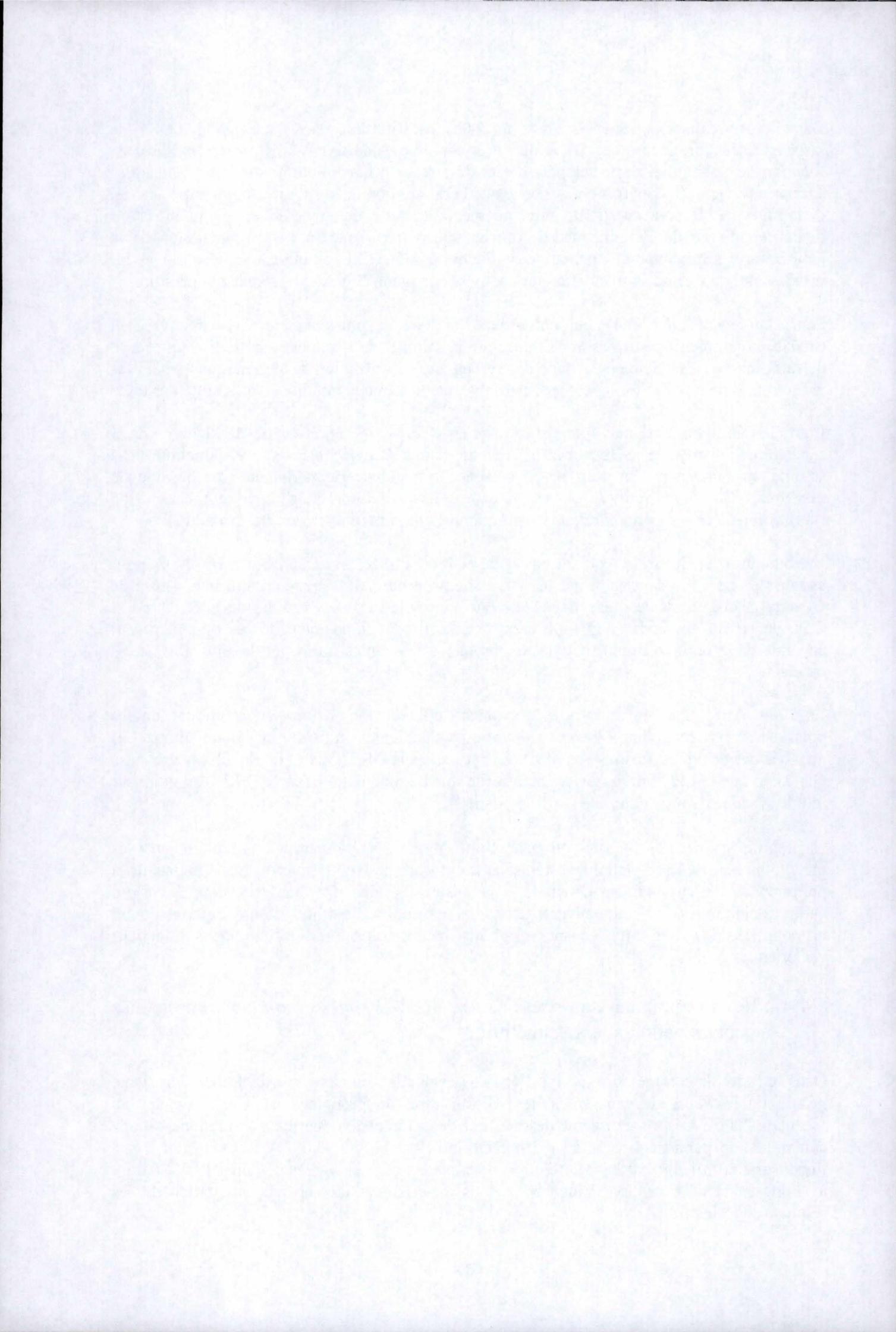
Les biomarqueurs du stress oxydant ont également été utilisés par Dandapat *et al* (2002) pour évaluer le stress oxydant subi par les larves de *Macrobrachium rosenbergii*, une espèce de crevette géante tropicale d'eau douce. Ils ont pour cela mesuré l'activité de la SOD, de la Gpx, de la catalase et la LPO à différents stades de développement de ces organismes. Il apparaît dans leurs résultats que les embryons et juvéniles subissent le plus fort stress oxydant.

En 2004, Atif *et al* ont eut l'idée d'évaluer l'effet de l'exposition au cadmium sur des poissons de rivière Indien, *Channa punctatus*, préalablement traités à la deltaméthrine. Les activités des enzymes du stress oxydant (en particulier la GST, Gpx et la glutathion reductase GR) ainsi que la LPO ont permis de montrer le rôle de modulation exercé par le cadmium sur tout le système de lutte contre le stress oxydant.

Cajaraville *et al* (2000) ont proposé l'utilisation des biomarqueurs (notamment les métallothionéines, l'acétylcholine estérase et le cytochrome P 450) pour évaluer l'impact de la pollution de l'environnement côtier de la péninsule Ibérique. Ces analyses, couplées à des analyses chimiques de l'eau, peuvent, selon eux, assurer le rôle d'un système d'alarme contre les pollutions de toutes sortes venant de l'océan (marées noires, produits chimiques, infections bactériennes..).

1.4.4 : Les biomarqueurs du stress oxydant chez *Penaeus monodon* en réponse à contamination à la deltaméthrine.

Dans le cadre de son mémoire de fin d'études (Evaluation du stress oxydant chez la crevette géante tigrée *Penaeus monodon* suite à l'utilisation de pesticides dans les élevages au Vietnam, 2006), J. Dorts a effectué des mesures de différents biomarqueurs en réponses à une contamination pendant 4 jours à la deltaméthrine (0,001 µg/l ; 0,01 µg/l et 0,1 µg/l) et à l'endosulfan (0,01 µg/l ; 0,1 µg/l et 1 µg/l) de crevettes géantes tigrées juvéniles (8,5 ± 0,4 g), à l'université de Can Tho, Vietnam. Je vais ici effectuer une brève présentation de ses résultats significatifs.



Ses expériences ont montré que la peroxydation lipidique (LPO) augmentait de façon hautement significative dans les branchies ($p=0,001$) et dans l'hépatopancréas ($p=0,002$) en présence de deltaméthrine.

L'activité de la GST dans les branchies ($p=0,023$) et dans l'hépatopancréas ($p=0,017$) ainsi que celle de la catalase dans les branchies ($p=0,034$) et dans l'hépatopancréas ($p=0,014$) variaient également de façon significative.

1.5 : La deltaméthrine

La deltaméthrine appartient à la famille des pyréthroïdes, famille de pesticides utilisés massivement depuis des dizaines d'années dans l'agriculture mais aussi dans les contrôles de maladies (imprégnation de moustiquaires pour lutter contre la malaria en Afrique et en Amérique centrale, contrôle de la maladie de Chagas en Amérique du Sud,...).

On utilise son pouvoir insecticide dans de nombreuses cultures, notamment le coton, certains fruits et légumes, les céréales (maïs et soja principalement) et le café. L'analyse des résidus dans les produits de l'agriculture ont montré que :

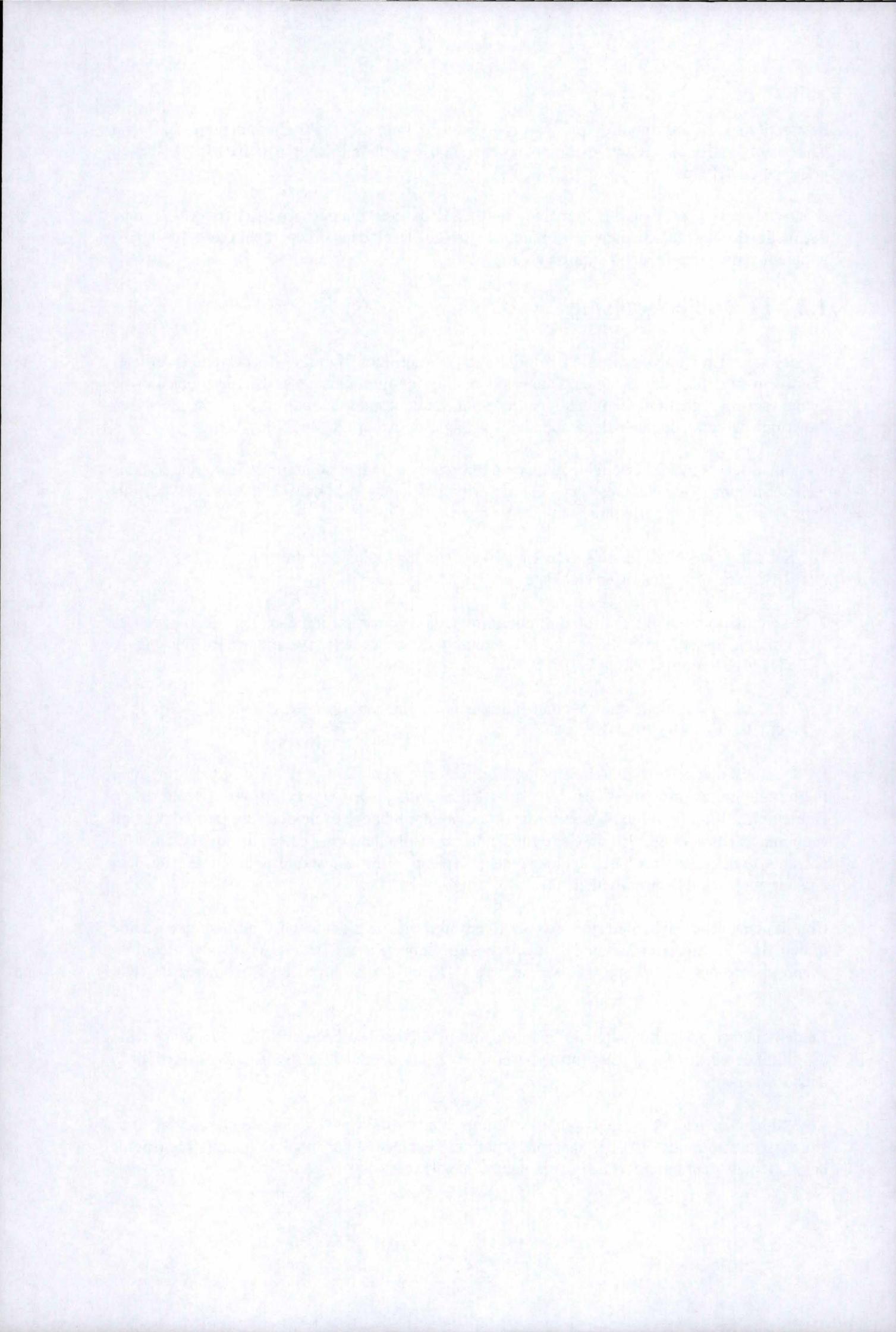
- 1 : Sur des grains de blé traités avec 2 mg / kg avant la récolte, on retrouvait 1,08 g/kg après 9 mois de stockage.
- 2 : La cuisson ou la préparation diminue fortement la concentration dans les aliments : après cuisson de pain avec les grains cités plus haut, on ne retrouve plus que 0,11 mg/kg. (Halls & Periam, 1980 *in* WHO 1990)
- 3 : La cuisson diminue dans les autres aliments la concentration de 20 à 98 %. (Mestrès *et al*, 1986 *in* WHO 1990).

La deltaméthrine a été synthétisée pour la première fois en 1974, à partir de pyréthrine, une toxine naturelle présente dans la plante *Chrysanthemum cinerariifolium* (Pyrèthre de Dalmatie). Elle se présente sous la forme d'une poudre blanche et inodore. Le point de fusion est compris entre 98 et 101 °C. Cette molécule est insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques (acétone, cyclohexane et xylène). Elle est stable à la lumière et à la chaleur mais instable en milieu alcalin.

Chimiquement, la deltaméthrine est un ester dibromé de l'acide chrysanthémique (acide diméthyl-1-2,2 (dibromo-2,2vinyl)-3 cyclopropanecarboxylique) (Br 2CA) et de l'alcool α -cyano-phénoxy-3 benzylique ; c'est l'isomère [1R, cis ; α S] parmi les 8 isomères de cette molécule.

La deltaméthrine est une molécule lipophile, qui peut être absorbée par différentes voies ; elle est éliminée via les fèces sous forme de produits de sa dégradation (hydrolyse et oxydation) dans l'organisme.

Les études *in vitro* ont permis d'estimer le taux d'absorption par voie orale chez le rat. Il se situe aux alentours de 90 %. L'absorption par voie cutanée et par inhalation est faible (moins de 5 %), mais peut être modifiée par la nature du solvant.



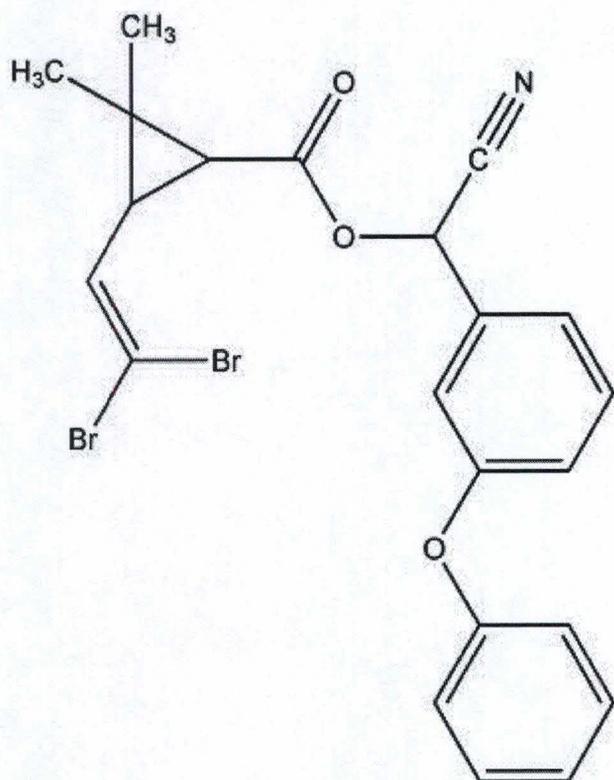


Figure 5 : Molécule de deltaméthrine (source : http://www.pesticideinfo.org/Detail_chemical.jsp?Rec_Id=PC33475)

Les études chez le rat, la vache et la souris ont montré qu'après absorption, la deltaméthrine se distribue dans tous les tissus, avec une légère préférence pour les graisses. La durée de vie dans la graisse de vache est de 7 à 9 jours.

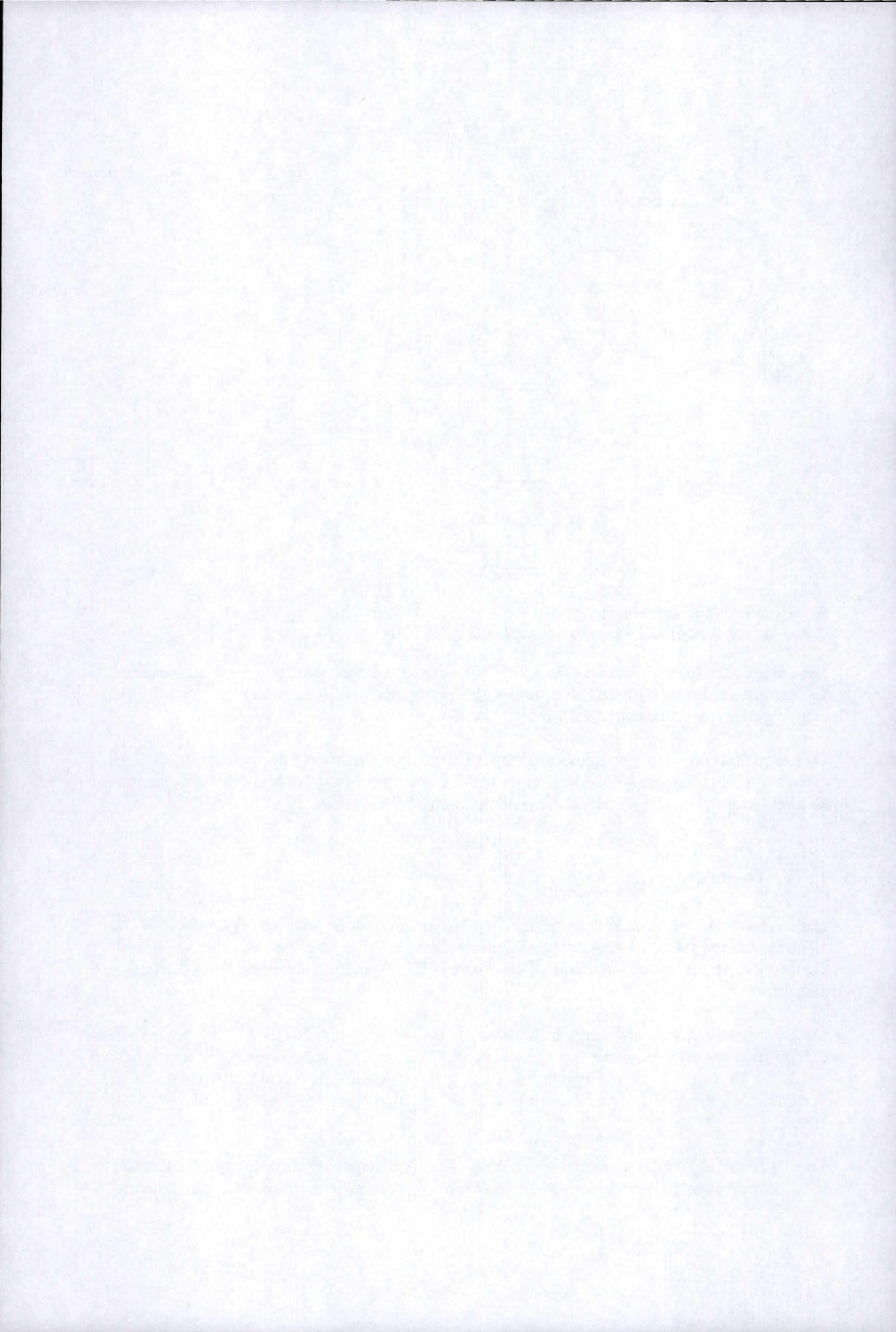
La métabolisation se fait en plusieurs étapes : oxydation, hydrolyse de la fonction ester et conversion du groupement cyano en thiocyanate. Les métabolites oxydés sont ensuite sulfo- ou gluco conjugués, afin de faciliter leur élimination. (WHO, 1990).

1.5.1 : Toxicité

Des études ont montré que la deltaméthrine est hautement toxique pour les organismes : la DL 50 chez la souris est de 19 à 34 mg / kg et elle est de 31 à 139 mg/kg chez le rat, en exposition aigue, quand le solvant est organique. Dans l'eau, la DL50 peut monter à plus de 5000 mg /kg chez le rat.

Chez les organismes aquatiques, la toxicité est encore plus élevée : la LC 50 pour 96 h d'exposition sur les poissons est comprise entre 0,4 et 2 µg /l. Pour les invertébrés aquatiques, la CL 50 48 h pour *Daphnia magna* est de 5µg /l. Cependant, la dégradation rapide de la deltaméthrine empêche cette mortalité de se manifester dans les conditions naturelles. (WHO, 1990).

Chez l'homme, la deltaméthrine provoque des dommages dermatologiques chez les travailleurs (rougeurs, démangeaisons, brûlures et érythèmes dans les cas les plus graves),



ainsi que des vertiges et des nausées. Trois cas d'empoisonnement non létaux ont été décrits, après ingestion de plusieurs grammes de substance pure.

1.5.2 : Dégradation dans le milieu

Des études menées sur la dégradation par photo-oxydation et dégradation dans les sols montrent la faible persistance de ce pesticide.

La photo-oxydation a été mesurée en plaçant au soleil pendant 4 à 8 heures une fine couche (40 µg / cm²) de deltaméthrine marquée au ¹⁴C. Après exposition, environ 70 % de la radioactivité était associée à des isomères inoffensifs. De plus, des études de biodégradation en conditions aérobies et au soleil ont montré que la demi-vie était 4 jours pour une solution de deltaméthrine à pH 5 en présence d'acétone.

Différentes études (Kaufman & Kayser, 1979 ; Kaufman & Kayser, 1980 ; Chapman *et al*, 1981 ; Zhang *et al*, 1984; Hill & Schaalje, 1985 *in* WHO 1990) ont montré que la demi-vie de la deltaméthrine dans différents types de sols est comprise entre 11 et 72 jours, en conditions aérobies et non-stériles.

1.5.3 : Bioaccumulation

Des études sur le poisson *Ictalurus punctatus* (poisson-chat américain) (Cary *et al*, 1978 *in* WHO, 1990) ont montré que les facteurs de bioaccumulation pour une exposition de 30 jours à une concentration finale de 2,19 µg / l (plus de 3 fois la CL 50 96 h pour ce poisson) vont de 25 pour les muscles à 972 pour les viscères. Cependant, la décontamination est rapide et après 14 jours, plus de 75 % ont été éliminés.

1.5.4 : Mode d'action des pyréthroïdes

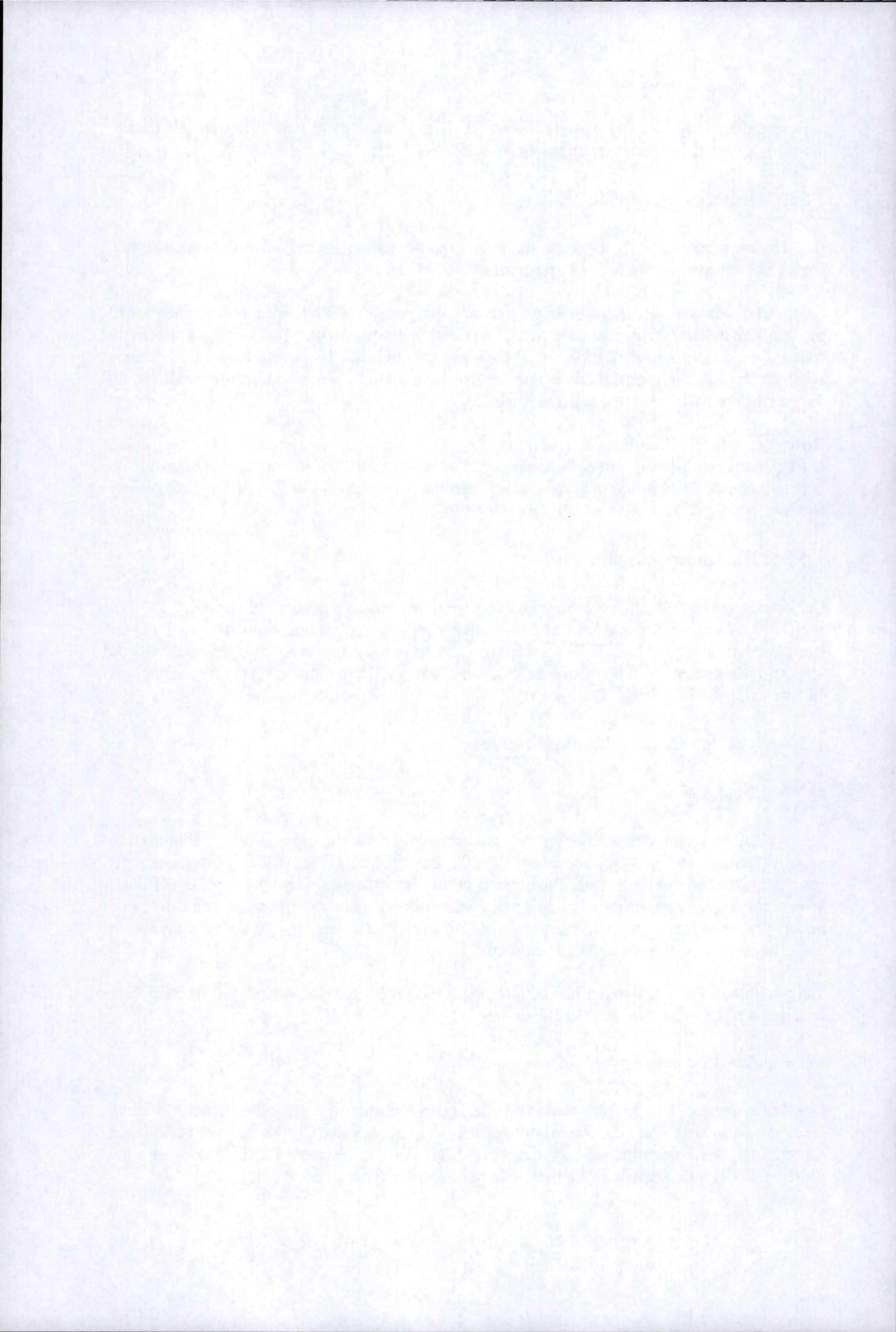
a) Mécanisme général

Les pyréthroïdes synthétiques agissent directement sur la membrane des axones, en interférant avec les canaux sodiques qui génèrent et conduisent l'influx nerveux. Ces canaux sodiques possèdent deux mécanismes : un d'activation et un d'inactivation. Les pyréthroïdes affectent le courant d'ions sodium pendant la dépolarisation de la membrane et maintiennent le canal ouvert (*i.e.* en ralentissant la fermeture du mécanisme d'activation). Cette action entraîne un état d'hyperexcitabilité des cellules neuronales.

Les pyréthroïdes ont également une action sur les récepteurs GABAnergiques et ils modifient les réponses postsynaptiques à l'acétylcholine.

b) Les différents types de pyréthroïdes

Des études menées sur des préparations de nerfs périphériques d'amphibiens (*Xenopus laevi*, *Rana temporaria* et *Rana esculenta*) ont permis de distinguer deux types de pyréthroïdes, en accord avec des études menées sur des mammifères et des insectes. La différence se situe principalement au niveau de l'intensité de la perturbation occasionnée :



1 : Type I : pyréthroïdes qui ne contiennent pas de groupe α -cyano (perméthrine, tetraméthrine,...) :

L'action de ces pesticides se situe sur les organes sensoriels et les fibres nerveuses sensorielles : des trains d'ondes répétées (25 répétitions maximum) de 5 à 10 millisecondes au total se manifestent au contact du pesticide.

Ils induisent également des décharges répétées des terminaisons nerveuses des jonctions neuro-musculaires. On n'observe pas de différences significatives dans le taux de libération du neurotransmetteur ou sur la sensibilité de la membrane musculaire, ni sur la membrane subsynaptique.

Les pyréthroïdes de type I ont une action semblable à celle du DDT sur les cellules nerveuses, en augmentant le temps d'ouverture des canaux sodiums membranaires.

2 : Type II : pyréthroïdes contenant un groupe α -cyano (deltaméthrine, cyperméthrine, ...):

Les effets de ce type de pyréthroïdes sont sensiblement les mêmes que ceux du groupe I, à la différence que l'effet est plus long (prolongement de l'ouverture des canaux sodiums pendant 100 msec pour le type I, supérieur pour le type II, allant jusqu'à un effet permanent.)

L'effet sur les récepteurs GABAnergiques (récepteurs commandant l'ouverture des canaux conducteurs des ions Cl⁻) est d'augmenter le seuil minimal d'activation des potentiels d'actions des muscles

Les mécanismes régulant l'ouverture des canaux neuronaux étant universels, on peut avancer l'hypothèse que les pyréthroïdes sont toxiques pour tous les animaux. Les différences interspécifiques observées dans les données de toxicité sont dues aux différences entre les seuils d'activation de ces canaux dans les différentes espèces.

1.6 : Effet des pesticides pyréthroïdes sur les organismes

1.6.3 Toxicité chez les mammifères

De nombreuses études ont été menées sur différentes espèces de mammifères (souris, bétail, rat,...) afin d'estimer les dangers de sa manipulation par les travailleurs mais aussi sa toxicité vers les organismes non-cibles.

Kale *et al* (1998) ont montré l'implication des ROS dans la toxicité des pyréthroïdes chez le rat, à une dose correspondant à 0,001% de la LC₅₀ (environ 4 μ g /kg, dépendant du solvant utilisé).

Les études menées par Yousef *et al* (2006) sur le rat ont montré l'effet de la deltaméthrine sur ce modèle biologique des mammifères, ainsi que la modulation de cet effet par la vitamine E. Ils ont étudié la réponse des organismes sur une série de biomarqueurs du stress oxydant (GST, LPO et SOD notamment) ainsi que les réponse sur des paramètres plasmatiques (AChE, LDH, phosphatases,...).

(Table 1)

Acute toxicity of deltamethrin tested as the technical or formulated product on fish; lethal concentrations all expressed as µg active ingredient (a.i.)/litre (96-h)

| Species (Common name) No. | System ^a | LC ₅₀ (µg/litre) tested as technical product | Ref. No. | LC ₅₀ (µg/litre) tested as formulated product ^b | Ref. |
|--|---------------------|--|-------------|--|------|
| <i>Alburnus alburnus</i> (Bleak) | S | 0.69 | 4 | 82 (ULV) | 4 |
| <i>Brachydanio rerio</i> (Zebra fish) | F, S | 2.0 | 10 | - | |
| <i>Cyprinodon macularius</i> (Desert pupfish) | S | - | | 0.6 ^c (EC) | 13 |
| <i>Cyprinodon</i> 19 <i>variegatus</i> ^d (Sheepshead minnow) | S | - | | 0.9 (EC) | |
| <i>Cyprinus carpio</i> (Common carp) | F, S | 1.84 0.86 | 4 3 | 0.65 (EC) 210.0 (ULV) | 4 |
| <i>Gambusia affinis</i> (Mosquito fish) | F, S | - | | 1.0 ^c (EC) | 13 |
| <i>Ictalurus nebulosus</i> 15 (Brown bullhead) | F, S | 1.2 | 7 | 2.3 (EC) | |
| <i>Ictalurus punctatus</i> (Hannel catfish) | F, S | 0.63 | 8 | - | |
| <i>Idus idus melanotus</i> 16 (Golden orfe) | S | - | | 1.2 (EC) | |
| <i>Lebistes reticulatus</i> 17 (Guppy) | F, S | - | | 1.8 (EC) | |
| <i>Lepomis gibbosus</i> 14 (Pumpkinseed sunfish) | F, S | 0.58 | 5 | 0.87 (EC) | |
| <i>Lepomis machrochirus</i> (Bluegill sunfish) | F | 1.2 | 6 | - | |
| <i>Osteochilus hasselti</i> ^e (Nilem carp) | S | - | | 1.2 (EC) | 20 |
| <i>Rhodeus sericeus</i> <i>amarus</i> | S | 1.12 | 4 | 140 (ULV) | 4 |
| <i>Salmo gairdneri</i> 12 (Rainbow trout) | F, S | 0.39 | 1 | 2.2 (EC) | |
| <i>Salmo salar</i> | | 1.97 | 2 | 0.59 (EC) | 2 |
| <i>Salmo trutta</i> (Brown trout) | F, S | - | | 4.7 ^c (EC) | 11 |

^a F: Flow system, S: Static condition.

^b EC: 25 g a.i./litre; ULV: 1 g a.i./litre; values in a.i. equivalent obtained by calculation.

^c LC₅₀ (48-h)

^d Marine fish.

^e River or pond fish from tropical areas (water temperature \geq 24 °C).

Rehman *et al* (2006) ont eux démontré l'effet modulant de la deltaméthrine sur les enzymes antioxydantes chez le rat. Ils ont notamment mis en évidence l'effet de peroxydation lipidique (LPO) important dû au pesticide.

Des études portées sur de nombreux organismes terrestres (microorganismes, arthropodes, limaces, oiseaux, ...) ont démontré la toxicité de la deltaméthrine chez tous les organismes. (WHO, 1990).

Des test effectués sur des cultures cellulaires, des microorganismes et des souris on permis d'établir que la deltaméthrine n'est pas cancérigène, ni mutagène (WHO, 1990).

1.6.4 Toxicité chez les poissons

Ural *et al.* (2005) ont démontré que des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ de deltaméthrine étaient létales pour la truite juvénile *Oncorhynchus mykiss* après une exposition d'une vingtaine d'heures.

Il a aussi été démontré que la DL50 ne variait pas avec la durée de l'exposition (Lakota *et al.* 1989 *in* Ural *et al.*) (Mulla *et al.* 1978 *in* Ural *et al.*).

D'autres études ont démontré la létalité de la deltaméthrine sur es œufs et des larves de poissons (Köprücü *et al.*, 2004), et ce, à des concentrations aussi faibles que 0,005 $\mu\text{g/L}$.

L'Hotellier et Vincent (1986) (*in* WHO 1990) ont mesuré la toxicité aigue du pesticide pour différentes espèces de poissons. Il apparaît que la toxicité pour les poissons est élevée et que celle-ci dépend du solvant utilisé. (voir Table 1)

D'autres études menées par Sayeed *et al* (2003), Atif *et al* (2006) ont montré l'effet de la deltaméthrine sur les biomarqueurs du stress oxydant (GST, LPO, catalase, ...). Ces résultats montrent un effet d'affaiblissement des défenses contre les ROS dans tous les organes testés chez le poisson *Channa punctatus*, Bloch (poisson à tête de serpent asiatique).

Pimpão *et al* (2006) ont montré la toxicité de la deltaméthrine sur le poisson brésilien *Ancistrus multispinis*, un téléostéen de l'ordre des siluriformes. Leurs résultats montrent un effet de la contamination par la deltaméthrine sur le nombre de globules blancs, de globules rouges, sur la concentration en hémoglobine ainsi que sur les enzymes de défense contre le stress oxydant GST et EROD (éthoxyrésorufine O-dééthylase).

Velisek *et al* (2006) ont, eux, travaillé sur la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* pour évaluer la CL₅₀ et l'effet de la deltaméthrine sur des paramètres sanguins (concentration en glucose, nombre d'érythrocytes, concentration en hémoglobine, hématocrite, ...) et sur des enzymes telles que l'acétylcholine estérase, l'aspartate aminotransférase, la créatinekinase et d'autres. Leurs résultats ont mené à la classification de la préparation de deltaméthrine utilisée comme substances fortement toxiques pour les poissons.

Table 2expressed as µg active ingredient (a.i.)/litre (96-h)^a

| Species | LC ₅₀ (µg/litre) tested as technical product | LC ₅₀ (µg/litre) tested as formulated product ^b |
|--|---|---|
| <i>Crassostrea virginica</i> (Eastern oyster) | - | 12.0 |
| <i>Daphnia magna</i> (Water flea) | 5 ^c | - |
| <i>Gammarus pulex</i> (Scud) | - | 0.03 ^c |
| <i>Penaeus duorarum</i> (Pink shrimp) | - | 0.35 |
| <i>Uca pugilatorulosus</i> (Fiddler crab) | - | 1.1 |
| <i>Bufo bufo</i> (larvae) (Common toad) | - | 0.93 |

^a Adapted from: L'Hotellier & Vincent (1986).^b EC: 25 g a.i./litre; ULV: 1 g a.i./litre; values in a.i. equivalent obtained by calculation.^c LC₅₀ (48-h).**Table 3**Acute toxicity^a of deltamethrin formulation^b in freshwater mussels, under static conditions at 21 - 23 °C^c

| Species | 24-h | 48-h | 72-h | 96-h | 7-day |
|-------------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Anodonta cygnea</i> | nd | nd | ~24.6 | 12.0 | 7.6 |
| <i>Anodonta anatina</i> | nd | nd | nd | ~23.4 | 10.3 |
| <i>Unio pictorum</i> | nd | ~31.8 | 9.7 | 7.0 | 6.0 |

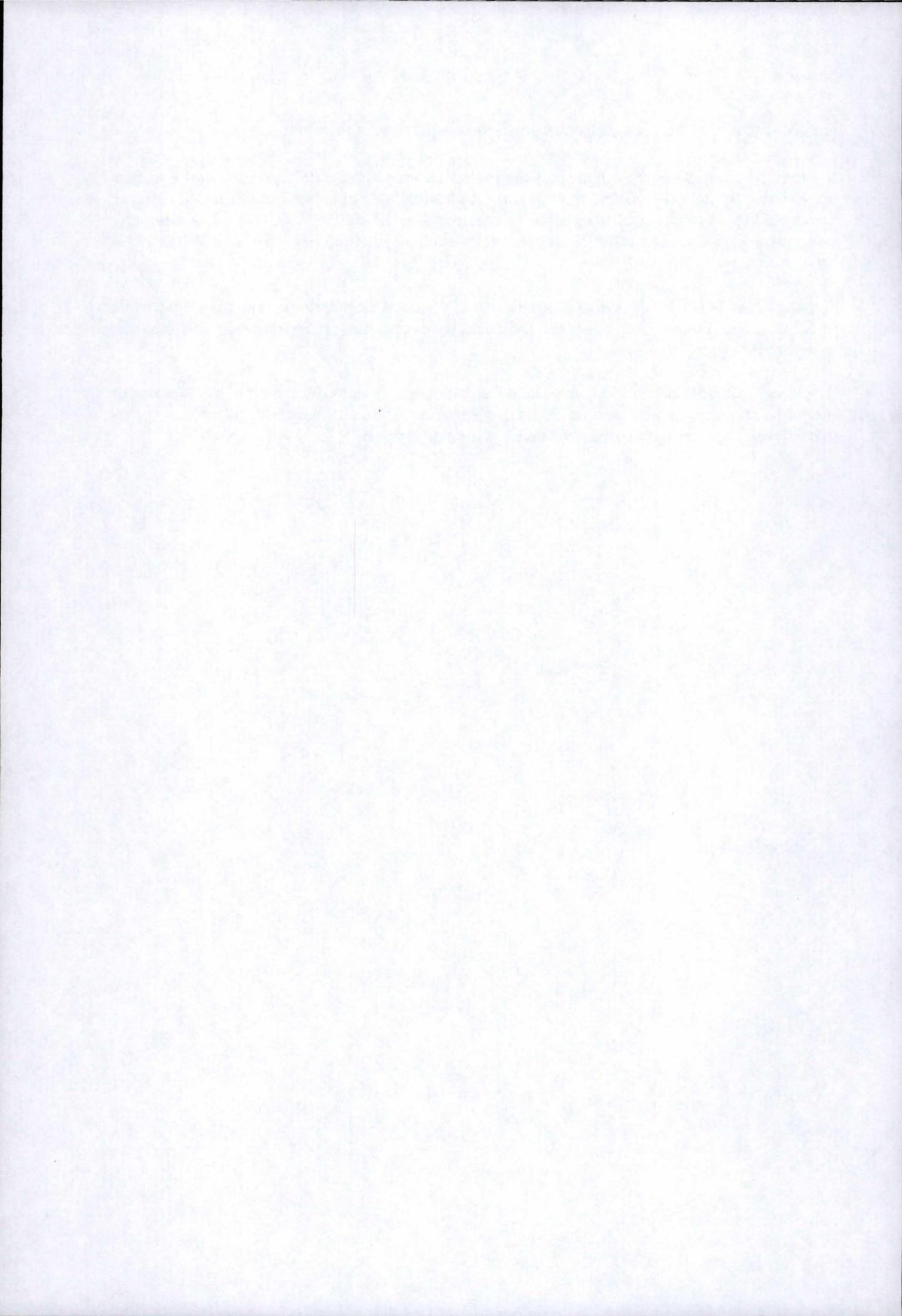
^a LC₅₀ µg active ingredient (a.i.)/litre): values in a.i. equivalent obtained by calculation.^b ULV 0.12%.^c From: Varanka (1987).

1.6.5 Toxicité chez les autres organismes aquatiques et marins :

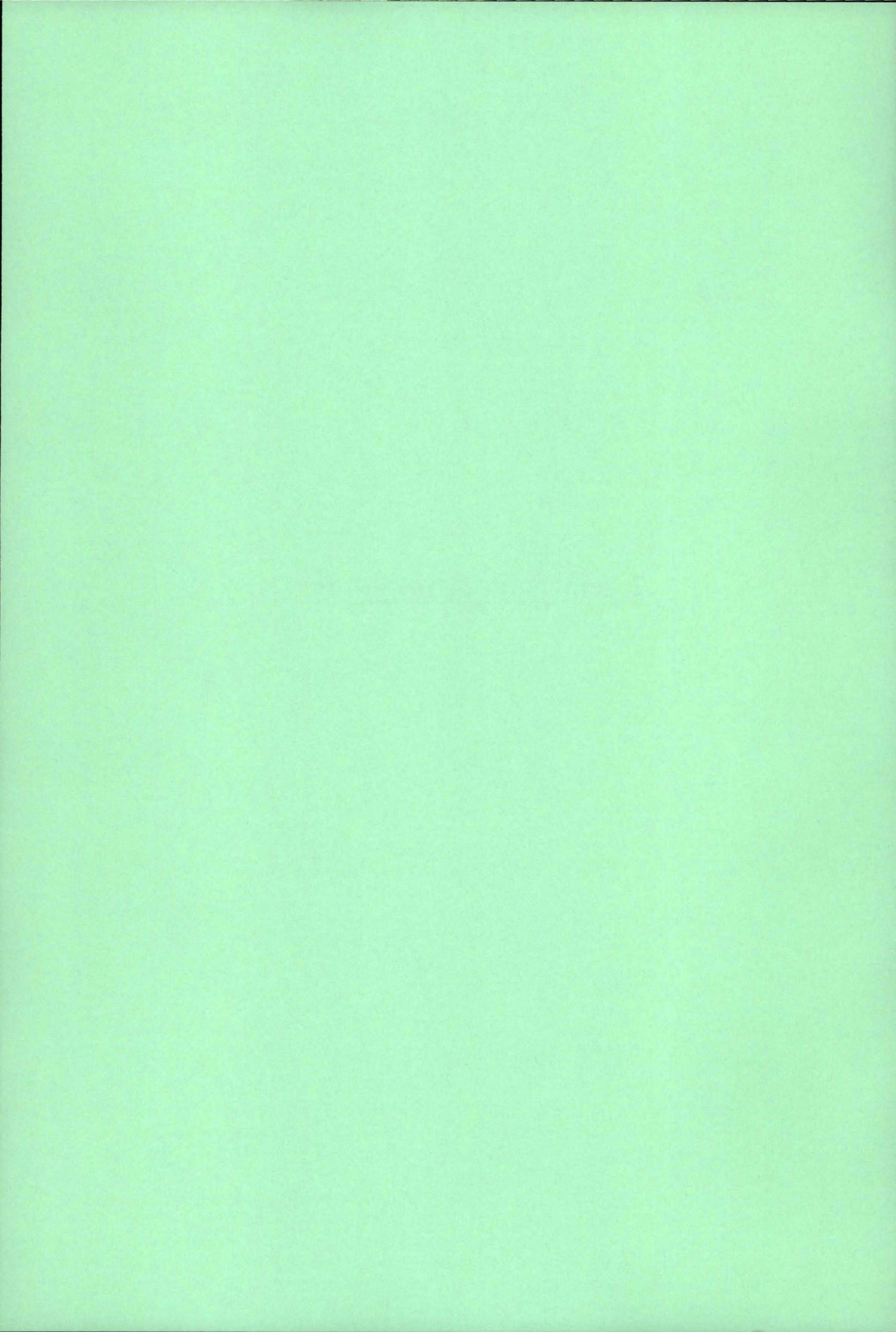
La toxicité chez les autres organismes marins est du même ordre de grandeur, sauf quelques exceptions : l'huître *S-transfêrase virginica* est plus tolêrante et le homard nordique *Homarus americanus* est beaucoup plus sensible (respectivement 12 µg/l et 0,0014 µg/l, à comparer avec les 4,7 µg/l pour la truite *Salmo trutta* par exemple) (Zitko *et al*, 1979 *in* WHO 1990) (voir table 2)

Varanka (1987) (*in* WHO 1990) a mesuré les effets de la deltamêthrine sur trois espêces de moules d'eau douce. Ses résultats indiquent que ces espêces sont peu sensibles aux pyrêthroïdes. (voir table 3)

Lopes *et al* (2006) ont montré la toxicité de la deltamêthrine dans des conditions de terrain sur les populations planctoniques de la rivière Paraguaçu (Brésil). Les tests effectuée sur *S-transfêrase brachyurum* ont montré une CL₅₀ d'environ 5µg/l.



2. Matériel & méthodes



2. Matériel & méthodes

2.1: Schéma expérimental

Afin d'étudier l'effet de la salinité et de la température sur les enzymes du stress oxydant, j'ai choisi de placer des crevettes (poids moyen : $12 \pm 1,7$ g) dans 3 températures et 2 salinités différentes, à savoir 24, 29 et 34 °C et 15 et 25 ‰. Ces valeurs ont été choisies pour refléter la réalité du terrain : les écarts de température au cours d'une saison d'élevage se situent entre 24 et 34 °C et la salinité oscille entre 15 ‰ pendant les épisodes pluvieux et 25 ‰ pendant les épisodes secs.

Les crevettes proviennent d'un élevage extensif de la province de Ca Mau (Sud Vietnam). Elles ont été transportées dans des bacs, sous la surveillance d'un technicien du Collège d'Aquaculture et Pêches de l'université de Can Tho.



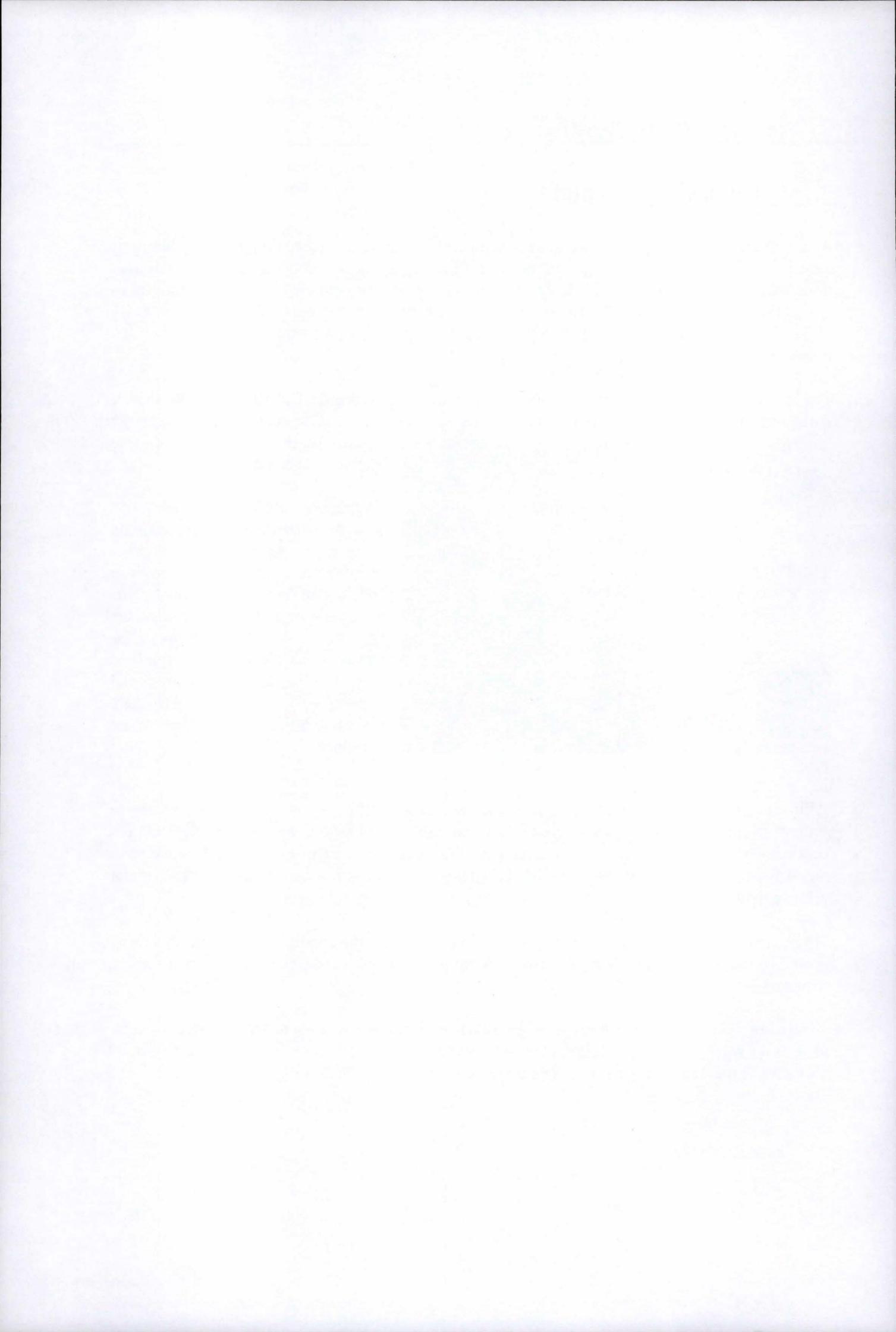
Figure 6 : Carte du Sud Vietnam Can Tho

Nous avons acclimaté ces crevettes dans des bassins de 2 m³, remplis d'eau à une salinité de 15 ‰ et à température ambiante (environ 30°C), afin de se rapprocher le plus possible des conditions d'élevage. Pendant l'acclimatation, les crevettes sont nourries 4 fois par jour, avec un aliment commercial (Greenfeed™, 35 % de protéines). L'acclimatation a duré une semaine.

Afin de minimiser le stress dû au choc de température et de salinité, nous avons progressivement acclimaté les crevettes aux conditions abiotiques auxquelles elles étaient destinées. Cela s'est fait dans les bassins qui allaient servir pendant la suite de l'expérience. Nous avons laissé les crevettes dans ces bassins pendant un jour avant d'effectuer le premier prélèvement.

Nous avons placé les crevettes dans 36 bassins, la moitié en conditions contrôle et l'autre moitié en conditions tests. (Voir schéma ci-dessous). Toutes les conditions ont été réalisées en triplicats.

Chaque prélèvement se compose de trois crevettes. Nous avons deux temps de prélèvements, au jour 0 (avant ajout du pesticide) et au jour 4. Nous avons donc placé dans chaque bassin 10 crevettes et prélevé en deux fois 6 dans chacun.



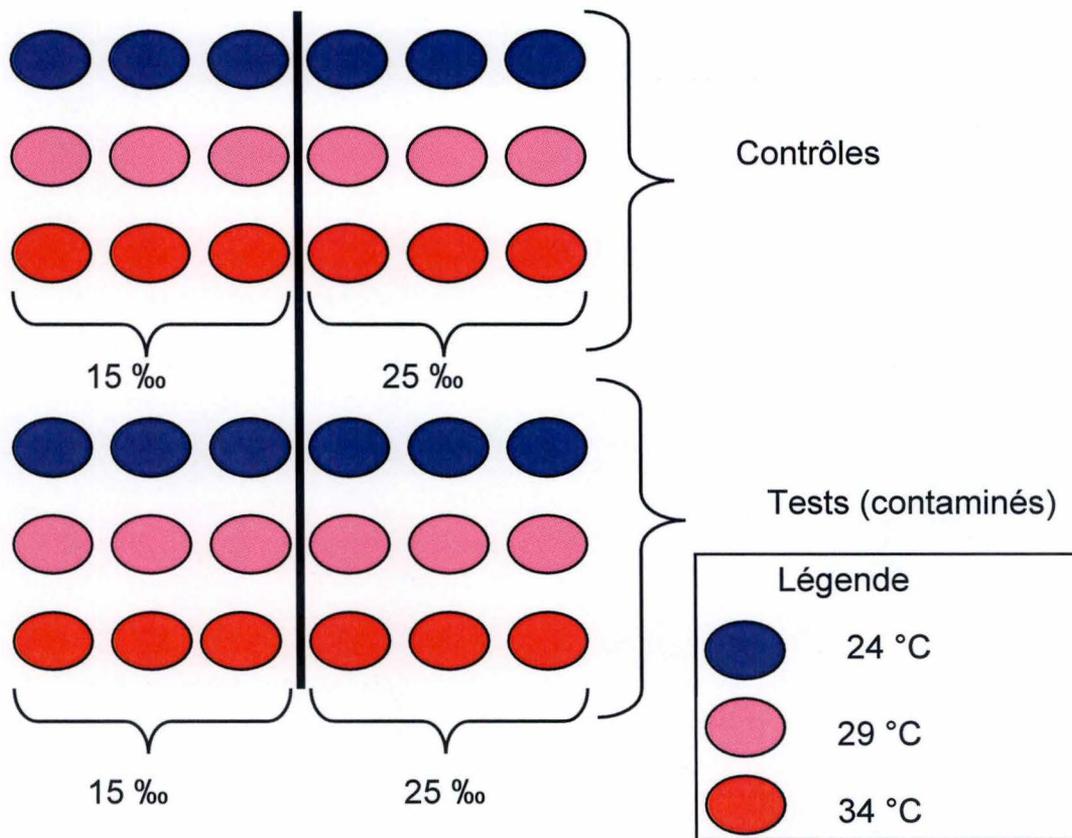
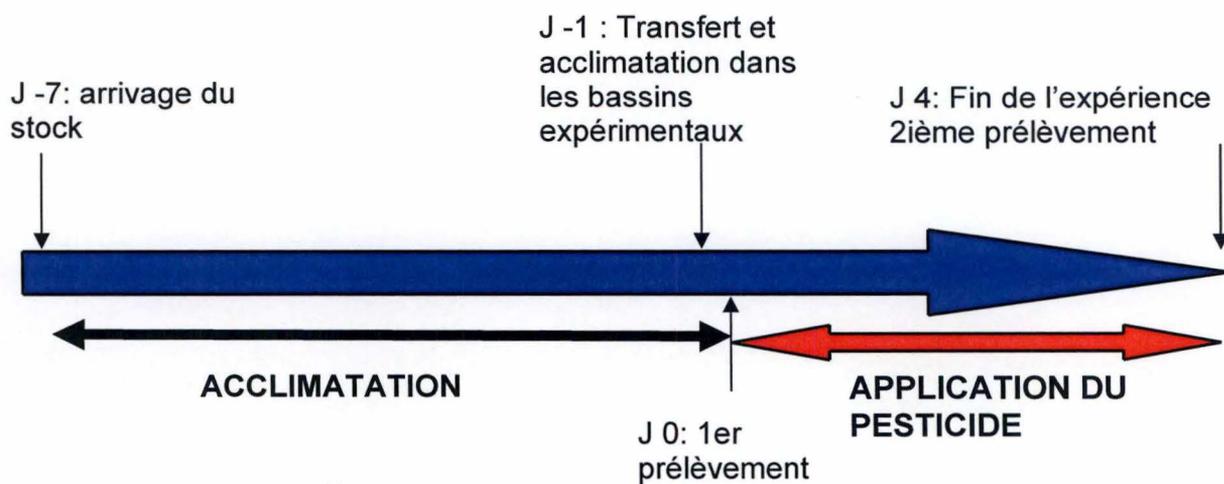


Figure 7 : Schéma du dispositif expérimental

La ligne du temps ci-dessous explique le déroulement de l'expérience :



Nombre de crevettes = 36 bassins * 3 crevettes * 2 temps de prélèvement = 216.

L'eau des bassins était changée tous les jours, en gardant les mêmes températures et salinités.



Figure 8 : Crevettes dans le bassin d'acclimatation

2.2 : Effet du pesticide

Afin de maximiser les effets observés, nous avons utilisé la deltaméthrine à une concentration correspondant à la plus forte utilisée pour les expériences de J. Dorts dans le cadre de son mémoire (année 06-07), c'est-à-dire $0,1 \mu\text{g/l}$, pendant une période de 4 jours. Le pesticide fut d'abord dissout dans de l'acétone (à une concentration de 100mg/l). Dans le but de prendre en compte l'effet stressant de l'ajout d'une substance dans les bassins, nous avons également ajouté $100 \mu\text{l/l}$ d'acétone dans tous les bassins.

Nous avons donc ajouté, tous les jours après avoir changé l'eau des bassins, une même quantité de deltaméthrine dans tous les bassins contaminés.

2.3 : Monitoring de l'expérience



Figure 9 : Installation des tanks pour l'expérience
Tanks en extérieur

Afin de s'assurer de la continuité des températures et salinités imposées dans les bassins, nous avons mesuré tous les jours, quatre fois par jour, la température et la salinité de l'eau. Nous avons également mesuré le pH à une fréquence équivalente et la concentration en ammonium, nitrate et nitrite une fois tous les deux jours.

Pour connaître la concentration effective de pesticide dans le milieu, des échantillons d'eau ont été pris juste après administration du pesticide et 24 h plus tard. Les échantillons ont été envoyés à l'université de Liège, au laboratoire d'Ecologie Animale et Ecotoxicologie (Prof. J.P. Thomé) pour analyse.

2.4 : Echantillonnage

A chaque jour de prélèvement (jour 0 et jour 4), nous avons prélevé 3 crevettes au hasard dans chaque bassin. Nous avons prélevé sur les crevettes vivantes l'hémolymphe qui fut ensuite congelée à -80°C . L'hémolymphe est additionnée d'un anticoagulant (EDTA 62 mM). Nous avons également noté le poids et le sexe de chaque individu.

Nous avons ensuite prélevé les branchies, l'hépatopancréas et du muscle, en poolant les organes des 3 crevettes d'un même bassin dans un même échantillon. Tous les échantillons ont été gardés à -80°C en attendant l'homogénéisation.

2.5 : Homogénéisation

Pour homogénéiser les tissus, nous avons utilisé un Ultraturrax, pendant 2X 10 secondes sur chaque échantillon. Nous avons utilisé comme tampon d'homogénéisation un tampon phosphate de potassium ($\text{K}_2\text{HPO}_4 / \text{KH}_2\text{PO}_4$, à une concentration de 5 mM et un pH de 7,5. Nous avons ajouté à ce tampon un inhibiteur de protéase (Cocktail d'inhibiteur de protéase Sigma ©, dilution 100 X final), afin de garantir la conservation des enzymes dans les échantillons.

Pour les branchies, nous avons homogénéisé 0,1 g, pour les muscles et l'hépatopancréas, 0,2 g par pool.

Les homogénats ont ensuite été séparés : nous avons gardé 2X 0,5 ml pour les mesures de peroxydation lipidique (LPO) et de concentration en glutathion (GSH). Le reste de l'homogénat a été centrifugé à $10\ 000 \times g$ pendant 10 minutes. La fraction post-mitochondriale ainsi récupérée est aliquotée pour les autres analyses.

L'intégralité du processus a été réalisée sur glace, pour éviter la dégradation des enzymes et molécules d'intérêt.

2.6 : Mesures des biomarqueurs

NB: Les protocoles complets se trouvent en annexe

Nous avons décidé de mesurer l'activité de la catalase (CAT), de la glutathion peroxydase (GPx), de l'acétylcholine estérase (AChE), de la glutathion S-transférase (GST) ainsi que la peroxydation lipidique et la concentration en glutathion total.

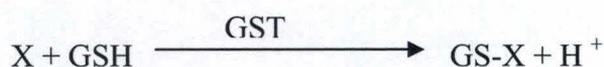
2.6.1 : Mesure de la quantité de protéines

Les quantités de protéines ont été dosées dans les échantillons en utilisant la technique Lowry, qui utilise la réaction entre les protéines dénaturées, le cuivre et le réactif de Folin. La quantité de protéine est déterminée en utilisant un étalon de concentration connue d'albumine sérique de bovin et est mesurée à 660 nm.

2.6.2 : Activité de la GST

Pour mesurer l'activité de la GST, nous avons utilisé la technique mise au point par Habig *et al* (1974) avec quelques modifications.

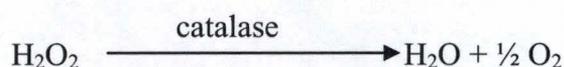
La GST est une enzyme qui utilise le GSH pour scinder les molécules de xénobiotiques électrophiles, elle fait partie du système de détoxification des xénobiotiques de l'organisme. La réaction est schématisée comme suit :



La mesure de l'activité de la GST se fait grâce à la conjugaison du GSH avec le 1-chloro-2,-dinitrobenzene (CDNB) grâce à la GST. Le produit de la réaction est détecté à une longueur d'onde de 340 nm (ultraviolet).

2.6.3 : Activité de la catalase

La catalase est une enzyme servant de défense contre l' H_2O_2 , un oxydant puissant provenant du métabolisme de l'oxygène. La réaction est la suivante :

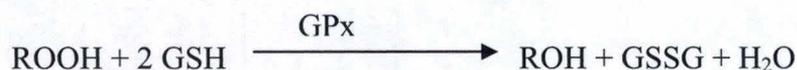


Pour mesurer l'activité de la catalase, on mesure la quantité d' H_2O_2 non décomposée dans un échantillon après une période de temps déterminée (6 minutes) en ajoutant de l'oxysulfate de Titane (TiOSO_4), à une longueur d'onde de 420 nm (jaune). La technique a été mise au point par Baudhuin *et al* (1964).

2.6.4 : Activité de la GPx

La fonction de la glutathion peroxidase (GPx) est de détoxifier les peroxydes à l'intérieur des cellules. Les peroxydes se décomposant naturellement en radicaux libres hautement réactifs, la Gpx joue un rôle important dans la protection de la cellule contre les effets délétères de ceux-ci.

La Gpx catalyse la réduction de H_2O_2 et d'autres peroxydes (ROOH pour synthétiser) en alcool stable en utilisant le glutathion comme source d' H^+ . La réaction est la suivante :



Le GSSG (glutathion oxydé) formé est instantanément réduit par la glutathion réductase, en utilisant du NADPH. C'est l'oxydation du NADPH en NADP + (qui absorbe à 340 nm, ultraviolet) qui est mesurée dans cette technique mise au point par Flohé and Günzler (1984) et modifiée par Mohandas *et al* (1984).

2.6.5 : Activité de l'acétylcholine estérase (AChE)

L'acétylcholine est un neurotransmetteur important dans les synapses chimiques de beaucoup d'organismes ; l'AChE est l'enzyme effectuant sa dégradation. La technique utilisée pour mesurer son activité est celle développée par Ellman *et al.* (1961). La réaction est la suivante :



Thiocholine + dithiobisnitrobenzoate (DTNB) \longrightarrow coloration jaune (412 nm).

2.6.6 : Mesure de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation lipidique est associée au stress oxydatif et contribue à plusieurs processus pathologiques. L'oxydation de lipides polyinsaturés implique la suppression d'un hydrogène allylique, l'insertion d'une molécule d'oxygène et la suppression par le radical hydroperoxyl ainsi formé d'un hydrogène pour former les hydroperoxydes de lipides (LOOH). Les LOOH sont décomposés en malondialdéhyde (MDA) et en 4-hydroxyalkenals (HAE).

La mesure de la LPO se fait par la technique de Fatima *et al* (2000) ; elle consiste à ajouter à l'échantillon de l'acide thiobarbiturique (TBARS) qui va réagir avec le MDA pour former un composé absorbant à 535 nm (bleu-vert), en se basant sur une droite de calibration calculée avec des concentrations croissantes de 1,1,2,3 méthylmalonaldéhyde (TMOP).

2.6.7 : Mesure de la concentration en GSH

Le glutathion (GSH) est une molécule indispensable aux systèmes de défense antioxydant des cellules aérobies. Il agit comme donneur d'électrons dans un grand nombre de réactions.

Pour mesurer sa concentration, on utilise les réactions suivantes :



La formation de NADP^+ est suivie pendant 5 minutes à 512 nm (Vert).

2.6.8 Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés en utilisant les outils de statistique descriptive (calcul de la moyenne, variance, écart type).

Les résultats ont indiqué une différence entre les moyennes des différentes mesures, nous avons donc effectué une analyse ANOVA à 3 dimensions à mesures répétées sur les résultats, en utilisant le logiciel Statistica ® (StatSoft, Inc). Les paramètres intervenant dans l'analyse sont la présence ou absence de pesticide, la température et la salinité. Les mesures sont répétées dans le temps.



Figure 11': bassins dans la pièce conditionnée

Il est nécessaire d'utiliser un tel modèle (plutôt qu'une ANOVA 4 où le temps serait un paramètre) pour respecter la troisième loi de l'ANOVA : l'indépendance des échantillons. En effet, les échantillons pris au jour 0 et au jour 4 sont considérés comme deux échantillons de la même population (le bassin) et sont donc dépendants.

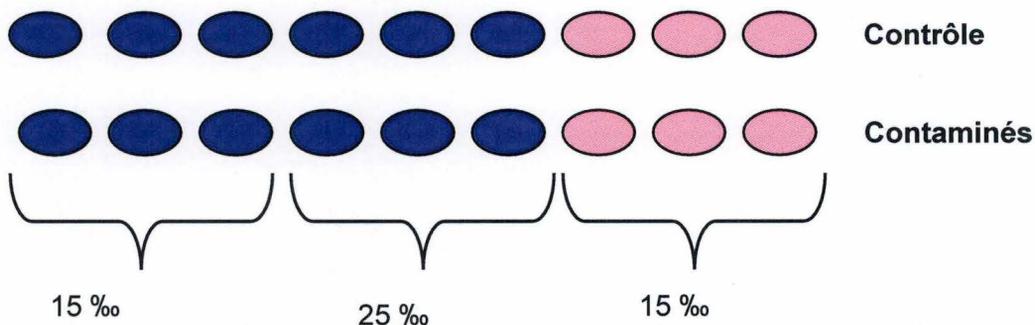


Figure 10 : Bacs d'acclimatation et autres

Le modèle utilisé ici permet également de prendre en compte l'effet du bassin sur les résultats ; en effet, les bassins d'acclimatation et ceux pour l'expérience ne sont pas tous dans le même environnement, ce qui peut influencer les résultats. Dans ce modèle, on utilise la moyenne entre les trois réplicats de l'expérience, ce qui permet de diminuer fortement la variabilité individuelle des bassins et donc de tenir compte des conditions environnementales.

Répartition des bassins :

Pièce équipée d'air conditionné ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$)



Extérieur (voir figure 9)

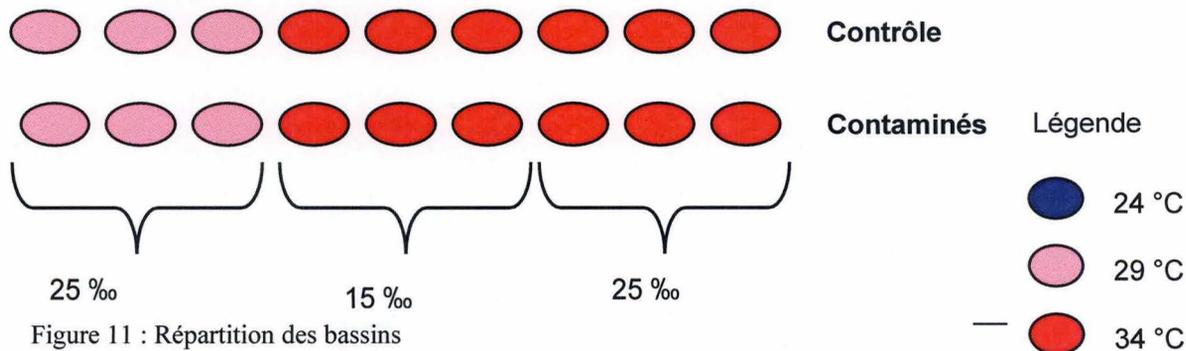


Figure 11 : Répartition des bassins

(Voir figure 11 : Bassins dans la pièce conditionnée)

Les résultats sont considérés statistiquement significatifs quand la valeur de p est inférieure à 5 %. Si un effet significatif est trouvé en exécutant l'ANOVA, un test LSD est effectué, afin de déterminer plus précisément les circonstances de la modification.

3. Résultats

3. Résultats

3.1 : Observations comportementales

Lors de nos observations au cours de l'expérience, nous avons constaté des différences comportementales des crevettes entre les bassins : les crevettes placées dans les températures plus faibles (24 et 29 °C) étaient plus agressives et arboraient une coloration caractéristique foncée avec des bandes colorées sur le dos. De plus, la mortalité dans le set de bassin à l'extérieur était plus importante que dans la pièce à air conditionné. Durant la durée de l'expérience, les crevettes n'ont pas été nourries ; nous avons constaté un comportement cannibale des individus, les survivants se nourrissant des cadavres des morts.

3.2 : Qualité de l'eau

Nous avons mesuré certains paramètres de qualité de l'eau : la concentration en NO_2 , NO_3 et NH_3 , ainsi que la température, le pH et la concentration en O_2 .

3.2.1 Formes azotées

Les mesures de concentrations des différentes formes d'azote présentes dans l'eau ont donné les résultats suivants : N-NO_3^- : concentration moyenne de $1,69 \pm 0,15$ mg/l au jour 0 et de $1,93 \pm 0,11$ mg/l au jour 4. N-NO_2^- : concentration moyenne de $0,031 \pm 0,005$ mg/l au jour 0 et de $0,059 \pm 0,014$ mg/l au jour 4. N-NH_4^+ : jour 0 : $0,05 \pm 0,009$ mg/l ; jour 4 : $0,068 \pm 0,013$ mg/l.

Au vu de ces résultats, on remarque que la concentration en nutriments reste faible dans l'eau, ce qui est logique étant donné que nous avons changé l'eau des bassins tous les jours.

L'analyse des paramètres indique que les crevettes étaient dans un environnement sain et non stressant, pour ce qui est des concentrations en résidus azotés.

3.2.2 Données physico-chimiques

La température, la concentration en oxygène dissous et le pH ont été mesurés 4 fois par jour au cours de l'expérience. Les données présentées ici sont les moyennes réalisées sur l'ensemble des mesures.

a) Température

La température, au cours des 4 jours, est comprise entre :

- $24,5 \pm 1$ °C
- $28 \pm 2,3$ °C
- $34 \pm 0,3$ °C

b) O_2 dissous

La concentration en oxygène dans les bassins est de $7,04 \pm 0,01$ mg/l. Cette concentration, proche de la saturation, assure aux crevettes un apport en oxygène suffisant, nécessaire au bon état général des individus.

c) pH

Le pH est, en moyenne, de $8,16 \pm 0,04$.

3.3 : Mesures du stress oxydant

NB : Afin de clarifier les résultats, la notation par lettre est utilisée pour identifier les groupes significativement différents sur les graphes, quand cela est pertinent c'est-à-dire quand le test LSD a été réalisé sur les données concernées.

3.3.1 : Statistiques descriptives

Pour tous les résultats présentés ci-dessous, une analyse statistique descriptive a été réalisée, afin d'avoir une première idée des distributions des valeurs récoltées. Il en est ressorti que, pour tous les résultats présentés, il y avait des indications (moyenne sensiblement différentes, distributions différentes, ...) de possibles différences statistiquement significatives. Pour s'en assurer, nous avons effectué une analyse ANOVA de niveau 3 avec répétition u cours du temps sur tous les résultats présentés.

3.3.2 : Indice de peroxydation lipidique (TBARS)

Les mesures de la peroxydation lipidique ont été réalisées dans l'hépatopancréas (HP) et dans les branchies (G).

a) Dans l'hépatopancréas :

Nous constatons une augmentation de la peroxydation lipidique en fonction de la température (figure 12), avec des valeurs allant de 84 ± 9 nmol de MDA g tissu⁻¹ à 24 °C à 105 ± 11 nmol de MDA g tissu⁻¹ à 34 °C.

Un effet du temps est également constaté (figure 13), les valeurs de 85 ± 9 nmol MDA / g tissu au jour 0 et de 100 ± 11 nmol MDA g tissu⁻¹ au jour 4.

L'analyse ANOVA donne des valeurs de p confirmant un effet très significatif ($p= 0,0017$) de la température. On observe aussi un effet significatif de la salinité ($p=0,034$) et un effet très hautement significatif du temps ($p= 0,0013$). Nous n'observons pas d'effet significatif de la présence de pesticide ($p= 0,54$).

Afin de déterminer plus précisément les effets des différents paramètres, nous effectuons une analyse post-hoc sur les résultats significatifs avec le test LSD. Il apparaît que la différence existe principalement entre les deux groupes de température 24°C et 29°C différent de 34 °C, avec une probabilité de $p= 0,0005$.

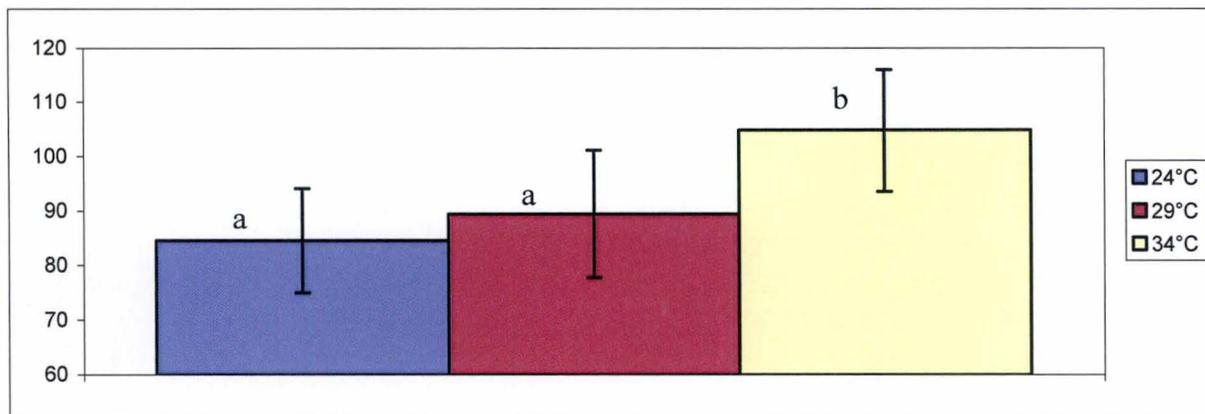


Figure 12 : Taux de peroxydation lipidique (nmol MDA /g tissu) en fonction de la température dans l'hépatopancreas

L'effet du temps est montré sur le graphe ci-dessous :

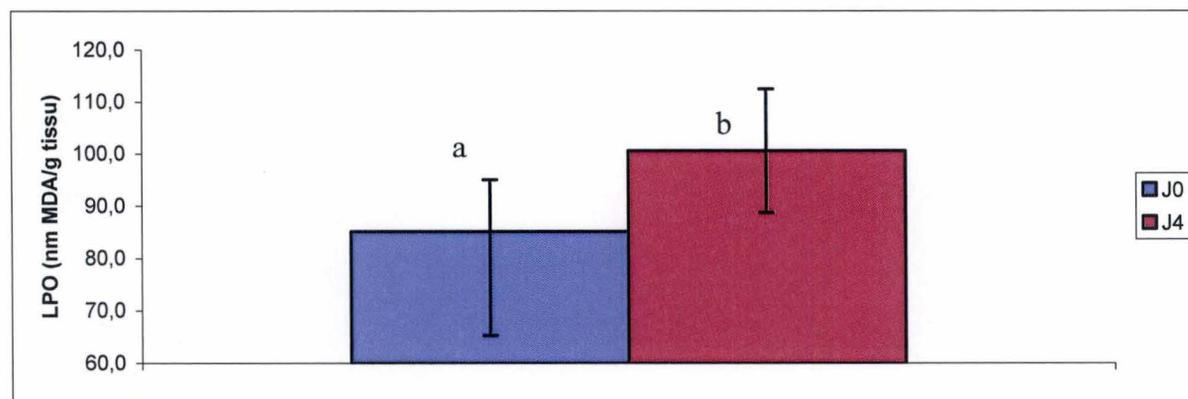


Figure 13 : Taux de peroxydation lipidique (nmol MDA /g tissu) en fonction du temps dans l'hépatopancreas

On observe une augmentation de la LPO au cours du temps, due à une augmentation du stress.

b) LPO dans les branchies :

Dans les branchies, le niveau de LPO est en moyenne de $36 \pm 8,8$ nmol MDA / g tissu.

La mesure de la LPO dans les branchies n'a pas donné de résultats significatifs, hormis une interaction significative ($p = 0,048$) entre la salinité et la présence de pesticide. Les analyses post-hoc n'ont pas décelé de différences supplémentaires.

D'après ces résultats, on observe donc que la deltaméthrine n'a pas d'influence directe sur le taux de peroxydation lipidique à cette concentration et pendant 4 jours. On remarque cependant que les valeurs varient fortement en fonction de la température et la durée de l'expérience. Ces résultats sont en contradiction avec la littérature, en ce sens que la deltaméthrine est reconnue pour augmenter significativement la LPO dans les organes de nombreux animaux (Rehman *et al*, 2006, travail sur des souris de laboratoire ;Yousef *et al*, 2006, travail sur des rats ; Atif *et al*, 2004, travail sur le poisson *Channa punctatus*).

3.3.3 : Mesure d'activité de la glutathion S-transférase

Les mesures d'activité de la GST ont été de nouveau réalisées sur les branchies et l'hépatopancréas.

a) GST dans les hépatopancréas :

L'activité de la GST est dépendante de la température (figure 14) : à 24 °C, l'activité est de 141 ± 24 nmol CDNB/min/mg prot et de 98 ± 15 nmol CDNB/min/mg prot à 34 °C. On observe une diminution de l'activité quand la température augmente.

La salinité influence également l'activité de cette enzyme (figure 15) : elle est de 137 ± 15 nmol CDNB/min/mg prot à 15 ‰ et de 148 ± 23 nmol/min/mg prot à 25 ‰

L'activité de la GST dans l'HP diminue au cours du temps (figure 16) : elle est de 143 ± 19 nmol CDNB/min/mg prot au jour 0 et de 108 ± 22 nmol CDNB/min/mg prot au jour 4.

Les résultats de l'analyse ANOVA sont les suivants : on observe un effet très hautement significatif de la température ($p=0,0003$). L'effet du temps ($p=0,0004$) est très hautement significatif, ainsi que celui de la salinité ($p=0,019$).

Il existe également une interaction hautement significative entre la salinité et la température ($p=0,016$). De nouveau, on observe pas d'effet significatif de la présence de pesticide ($p=0,11$).

Le test LSD indique que l'activité de la GST à 34 °C diffère de manière très hautement significative de celles observées aux autres températures. ($p=0,0008$ entre 29 et 34 °C).

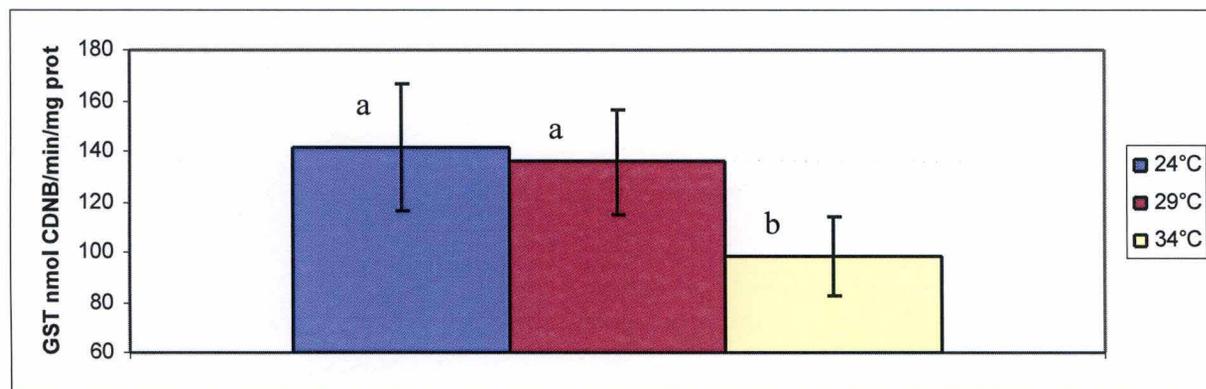


Figure 14 : Activité de la GST (nm CDNB /min / mg prot) en fonction de la température dans l'hépatopancréas

Effet de la salinité :

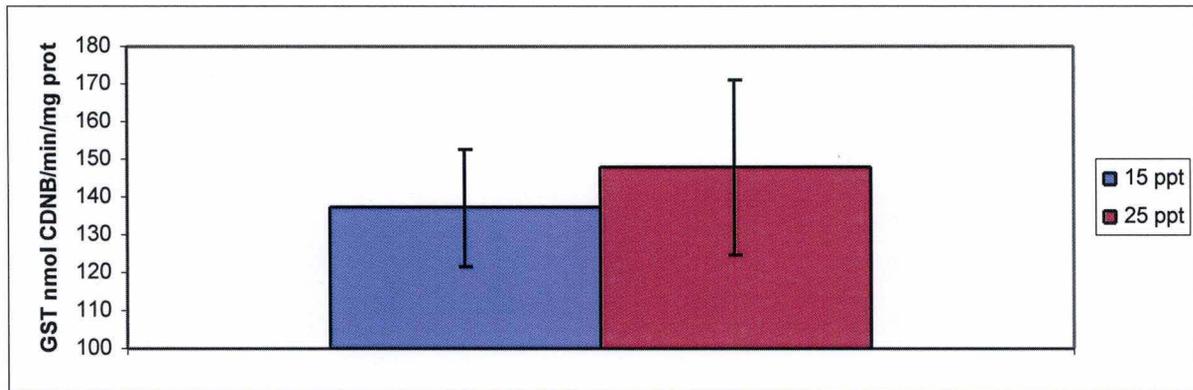


Figure 15 : Activité de la GST (nmol CDNB / min / mg prot) en fonction de la salinité dans l'hépatopancreas

Effet du temps :

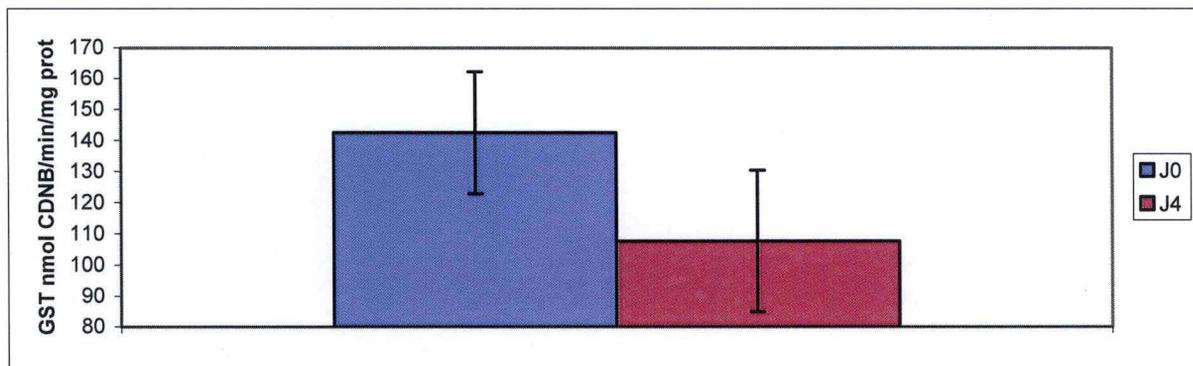


Figure 16 : Activité de la GST (nmol CDNB / min / mg prot) en fonction du temps dans l'hépatopancreas

On observe donc une augmentation de l'activité de la GST en fonction de la salinité mais une diminution en fonction du temps et de la température dans l'HP.

b) GST dans les branchies :

Dans les branchies, l'activité de la GST est modifiée par la température (figure 17) : moyennes de 176 ± 17 nmol CDNB/min/mg prot à 24 °C et 221 ± 22 nmol CDNB/min/mg prot à 34 °C. Le temps joue aussi un rôle, comme le montre les différences entre les moyennes au jour 0 (210 ± 27 nmol CDNB/min/mg prot) et au jour 4 (186 ± 20 nmol CDNB/min/mg prot) (figure 18).

Les analyses statistiques de l'activité de la GST dans les branchies ont mis en évidence un effet très hautement significatif de la température ($p= 0,009$) ainsi qu'un effet significatif ($p=0,046$) du temps.

Le test LSD effectué entre les 3 températures nous apprend que les résultats à 34°C sont hautement significativement différents ($p=0,003$) des résultats aux autres températures.

Effet de la température :

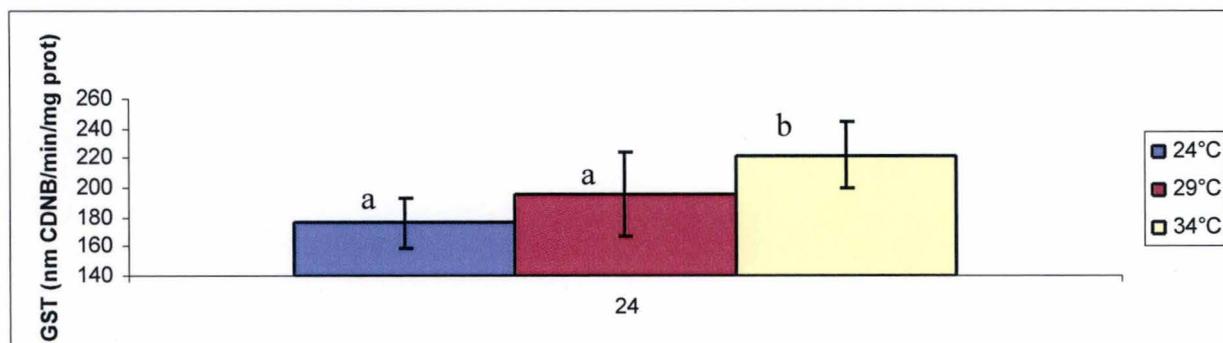


Figure 17 : Activité de la GST (nmol CDNB/min/mg prot) en fonction de la température dans les branchies

Effet du temps :

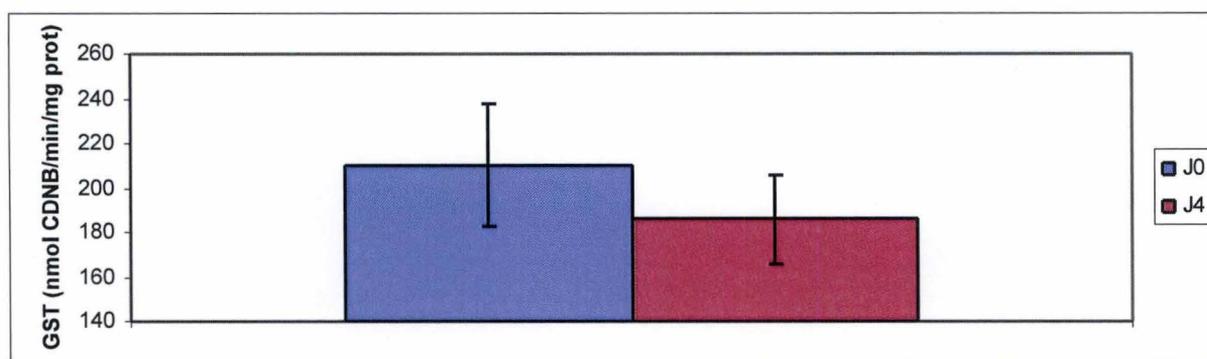


Figure 18 : Activité de la GST (nmol CDNB/min/mg prot) en fonction du temps dans les branchies

Plusieurs études (Yousef *et al*, 2006 ; Rehman *et al*, 2006) ont montré que la présence de deltaméthrine diminuait l'activité de la GST, à des doses 100 X inférieures à la LC_{50} , sur des souris et des rats. De même, les études menées par da Silva *et al* (2004) sur deux espèces de tiques montrent une diminution significative de l'activité de la GST à des concentrations aussi faibles que 0,5 mM.

3.3.4 : Mesure de la concentration en glutathion total (GSH)

La concentration en glutathion a été évaluée dans l'hépatopancréas et dans les branchies.

a) GSH dans l'HP :

La concentration en GSH est influencée par la présence de pesticide (figure 20) : les valeurs vont de $6,3 \pm 3,5$ nmol / g tissu (contrôle) à $16,4 \pm 10$ nmol / g tissu (test). La concentration varie également au cours du temps (figure 21): au jour 0, la valeur moyenne est de $2,9 \pm 2$ nmol / g tissu ; au jour 4 elle est de $19,8 \pm 9$ nmol / g tissu. La température a également un effet (figure 22) : on observe une augmentation de la concentration de $8,7 \pm 7$ nmol / g tissu à 24 °C jusqu'à $16,8$ nmol / g tissu à 34 °C.

L'ANOVA 3 a décelé un effet très hautement significatif de la présence de pesticide ($p=0,0004$). La durée de l'expérience ($p=8 \times 10^{-7}$) a également un effet très hautement significatif. La température a un effet significatif ($p=0,015$). On observe également un effet

significatif ($p=0,037$) de l'interaction entre le pesticide et la température et un effet significatif ($p=0,03$) de l'interaction entre le pesticide et la durée. Le graphe ci-dessous (figure 19) permet de se rendre compte de l'interaction de ces deux paramètres :

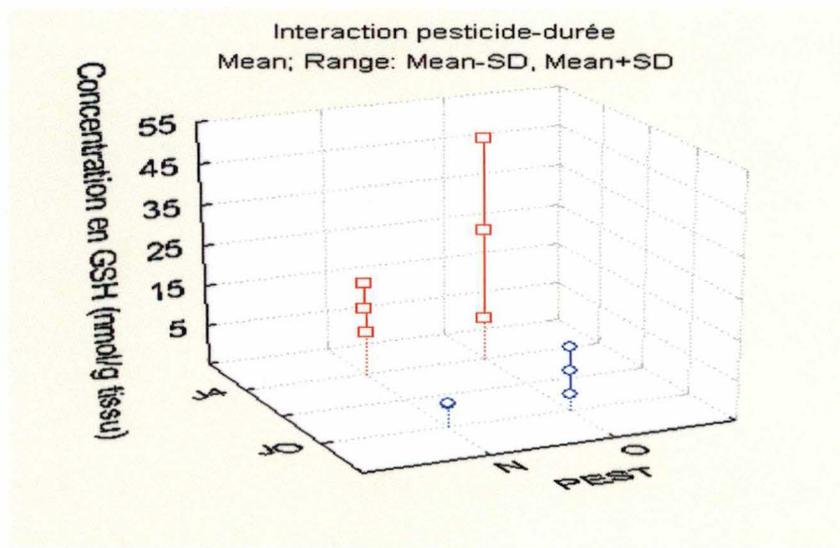


Figure 19 : Interaction entre la présence de pesticide et la durée sur la concentration en GSH dans l'hépatopancréas

Effet du pesticide :

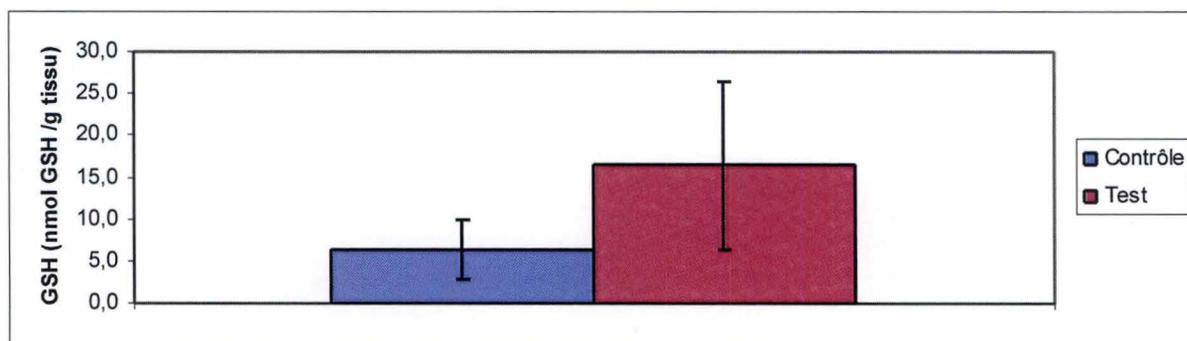


Figure 20 : Concentration en GSH (nmol GSH / g tissu) en fonction de la présence de pesticide dans l'hépatopancréas

Effet du temps :

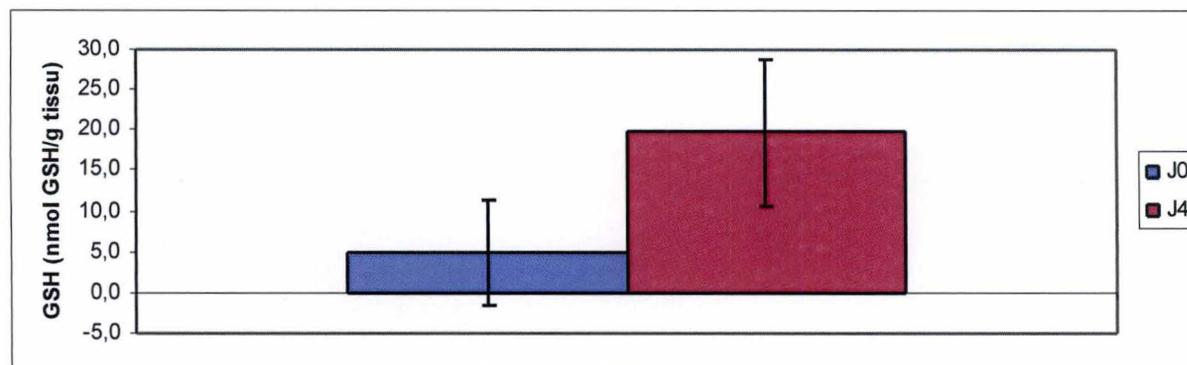


Figure 21 : Concentration en GSH (nmol GSH/g tissu) en fonction du temps dans l'hépatopancréas

Effet de la température :

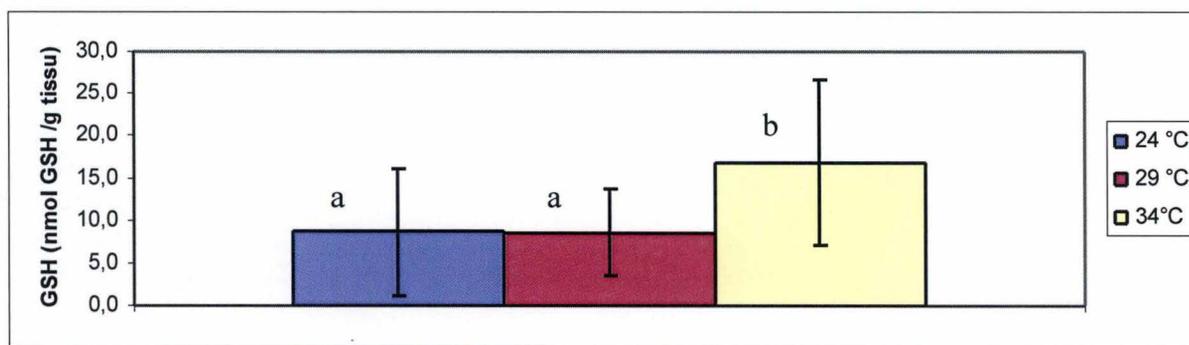


Figure 22 : Influence de la température sur la concentration en GSH (nmol GSH /g tissu) dans l'hépatopancreas

Le test LSD montre que les valeurs prises à 24 et 29 °C sont significativement différentes de celle prise à 34 °C ($p= 0,11$).

On observe donc que la présence du pesticide ainsi que la durée et la température fait augmenter la concentration en GSH. Cela est en accord avec les publications récentes (Sayeed *et al*, 2003, p. ex.) mais aussi avec la logique d'adaptation de l'organisme : le GSH protège des ROS, la deltaméthrine induit l'augmentation de ROS et donc également la concentration en GSH.

3D Box Plot Effet de la salinité et de la durée sur la concentration en GSH dans
Mean; Range: Mean-SD, Mean+SD

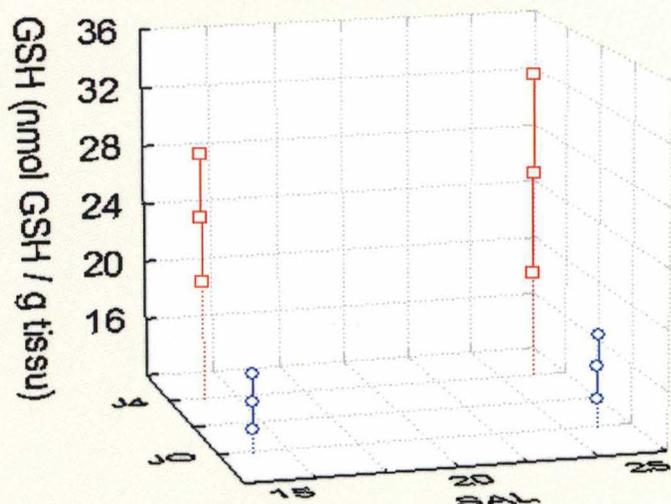


Figure 23 : Interaction entre la salinité et le temps sur la concentration en GSH l'hépatopancreas

Le graphique ci-dessus montre une corrélation entre la salinité et la durée de l'expérience. Dans la logique de l'hypothèse énoncée plus haut, on interprète cette corrélation comme l'augmentation de la pénétration du pesticide due a la salinité, corrélée au temps qui permet au pesticide d'exercer son effet. Cependant, cette interaction n'est pas statistiquement significative et on ne retrouve aucune interaction significative entre la salinité et la durée dans toutes les mesures. Cet effet doit donc être très modeste mais il est incontestable qu'il existe.

b) GSH dans les branchies

Dans les branchies, on observe une modification de la concentration en GSH en fonction de nombreux paramètres : la température (figure 24) (moyennes : (nmol GSH / g tissu): 18 ± 2 à 24°C , 20 ± 2 à 29°C et 24 ± 3 à 34°C), la salinité (figure 25) (moyennes (nmol GSH / g tissu): 20 ± 3 à 15‰ et 21 ± 4 à 25‰), le pesticide (figure 26) (moyennes (nmol GSH / g tissu): 20 ± 3 en contrôle et 21 ± 4 en test) et le temps (figure 27) (moyennes (nmol GSH / g tissu): jour 0 : 15 ± 1 ; jour 4 : 25 ± 3).

Ces résultats ont été calculé comme étant statistiquement significatifs :

| | |
|---|--------------------------------|
| Effet de la température | $p = 1,4 \cdot 10^{-7}$ (***) |
| Effet de la salinité | $p = 0,03$ (*) |
| Effet de la présence de pesticide | $p = 0,049$ (*) |
| Effet du jour de prélèvement | $p = 2,8 \cdot 10^{-14}$ (***) |
| Interaction salinité-température | $p = 0,0025$ (**) |
| Interaction température-pesticide | $p = 1 \cdot 10^{-5}$ (***) |
| Interaction température-jour | $p = 0,004$ (**) |
| Interaction température-pesticide-jour | $p = 0,0006$ (***) |
| Interaction température-pesticide-salinité-jour | $p = 0,04$ (*) |

* = effet significatif ($0,05 > p > 0,01$)

** = effet hautement significatif ($0,01 > p > 0,001$)

*** = effet très hautement significatif ($p < 0,001$)

Effet de la température :

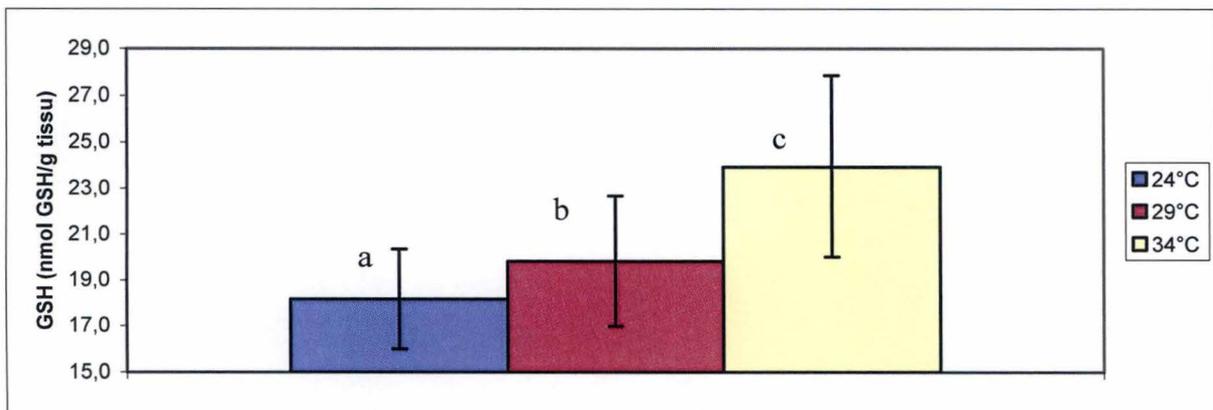


Figure 24 : Effet de la température sur la concentration en GSH (nmol GSH/g tissu) dans les branchies

Le test LSD pratiqué sur ces valeurs montre que les valeurs sont toutes statistiquement différentes : entre 24 et 29°C , $p = 0,02$; la différence entre la valeur à 29 et à 34°C est très hautement statistiquement différentes ($p = 7 \cdot 10^{-5}$).

Effet de la salinité :

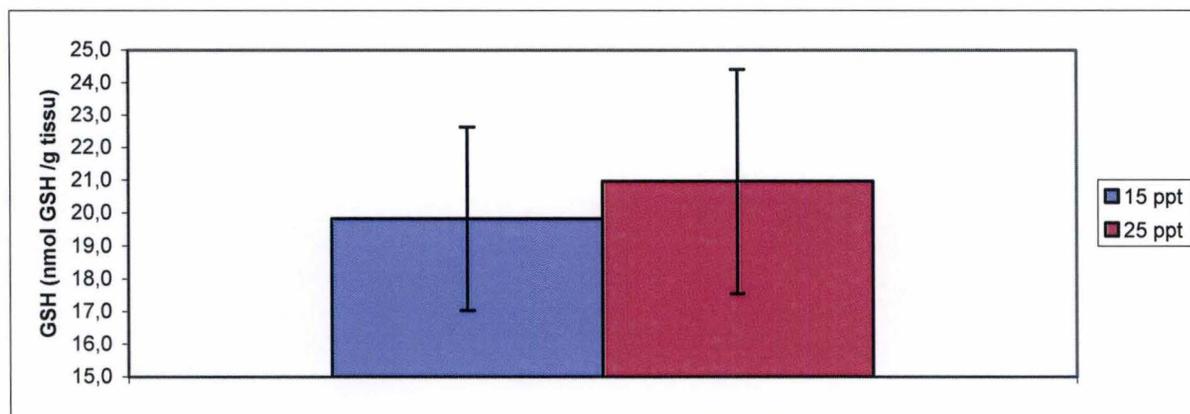


Figure 25 : Effet de la salinité sur la concentration en GSH (nmol GSH/g tissu) dans les branchies

Effet de la présence de pesticide :

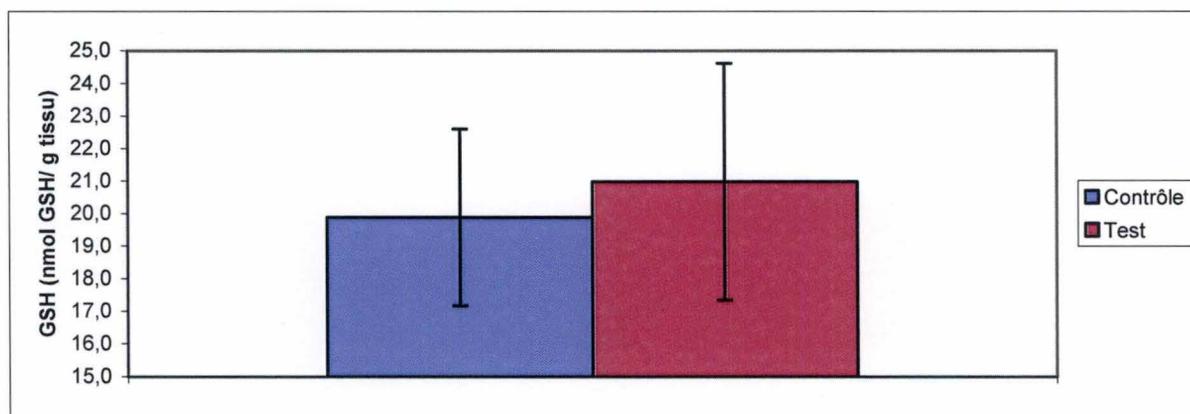


Figure 26 : Effet de la présence de pesticide sur la concentration en GSH (nmol GSH /g tissu) dans les branchies

Effet du temps :

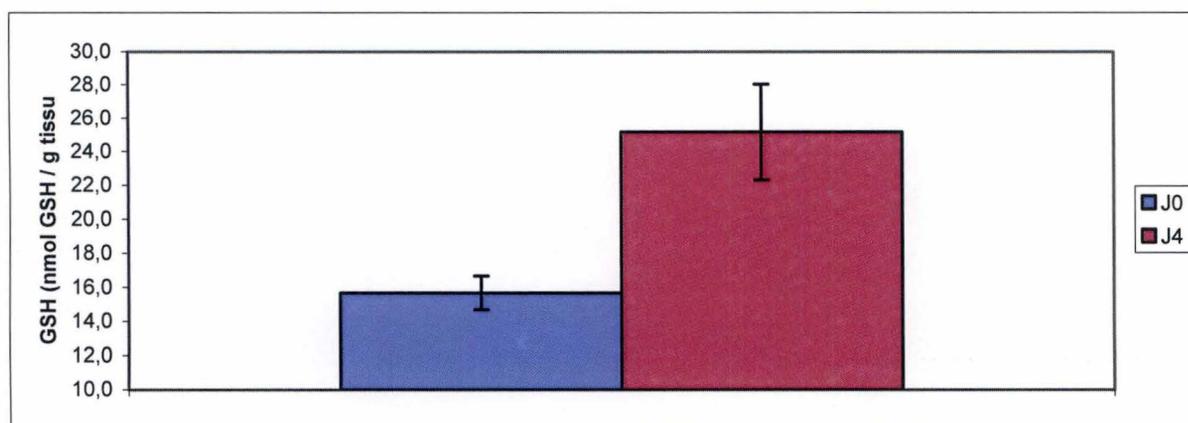


Figure 27 : Effet du temps sur la concentration en GSH (nmol GSH/g tissu) dans les branchies

On observe donc de nombreuses modifications de la concentration en GSH dans les tissus après exposition à la deltaméthrine. L'effet du pesticide est ici présent, contrairement à la majorité des autres biomarqueurs étudiés. Cela rejoint les conclusions de l'article de Atif *et al*

(2004), qui montre une augmentation de la concentration en GSH a la fois dans les branchies et dans le foie de poissons *Channa punctatus* exposés à une dose de 0,45 ppb pendant 48 h (à comparer avec l'exposition réalisée ici de 0,1 ppm pendant 4 jours). Les résultats de Sayeed *et al* (2003) montrent une tendance similaire, avec une dose plus importante de 0,75 µg/l pendant 48 h.

L'interaction entre température, la présence de pesticide et le temps est ici significative ($p=0,04$), ce qui indique une modulation par la température de l'effet du pesticide, vraisemblablement par modification du taux de pénétration du polluant mais aussi du métabolisme général de l'organisme.

3.3.5 : Activité de la catalase (CAT)

L'activité de la catalase est mesurée dans les branchies et l'hépatopancréas.

a) Catalase dans les branchies :

L'activité de la catalase est, en moyenne, de $0,039 \pm 0,02$ U/mg prot. Les analyses statistiques n'ont montré aucun effet des différents paramètres séparément. En revanche, il existe des interactions entre les paramètres. On observe une interaction entre la salinité et la température ($p=0,04$). L'interaction entre la présence de pesticide, la salinité et le temps, très hautement significative, est intéressante : en effet, cette interaction montre la modulation de la salinité sur l'effet du pesticide au cours du temps ($p=0,005$). L'effet combiné de la température, de la présence de pesticide et du temps est très significatif ($p=0,02$). Cet effet montre quand a lui un impact de la température sur l'effet du pesticide au cours du temps.

b) Catalase dans l'HP

L'activité de la catalase dans l'hépatopancréas est influencée par le temps (figure 28) (moyennes (U/ mg prot) : $0,012 \pm 0,04$ au jour 0 et $0,008 \pm 0,003$ au jour 4). Cet effet est significatif ($p=0,02$). Un effet très hautement significatif de l'interaction entre les 4 paramètres ($p=0,01$) est également détecté.

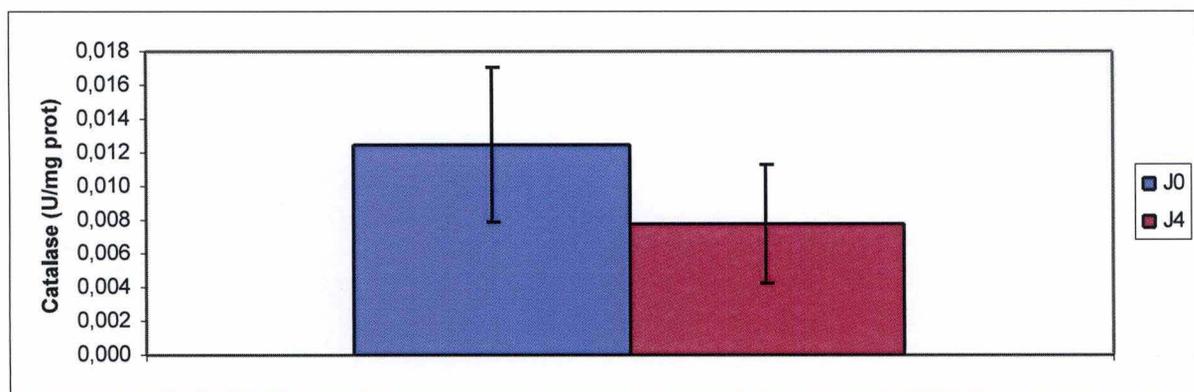


Figure 28 : Effet du temps sur l'activité de la catalase (U/mg prot) dans l'hépatopancréas

L'observation de ces résultats indique que le pesticide n'a pas d'effet sur l'activité de cette enzyme, de même que la salinité et la température, contrairement aux résultats donnés dans la littérature. Par exemple, Sayeed *et al* (2003) montrent des effets très significatifs de la

deltaméthrine sur l'activité de la catalase dans les branchies et les reins du poisson *Channa punctatus*, en diminuant celle-ci de parfois 45%.

3.3.6 : Activité de la glutathion peroxydase (Gpx)

L'activité de la glutathion peroxydase a été mesurée sur l'hémolymphe et sur l'HP.

a) Gpx dans l'hémolymphe :

L'activité de la Gpx dans l'hémolymphe est influencée par le temps (figure 29) (les moyennes vont de ($\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg prot}$) 1066 ± 451 au jour 0 à 993 ± 579 au jour 4).

Statistiquement, l'effet du temps est très hautement significatif ($p=2.10^{-9}$) et on observe des interactions entre les paramètres : entre la salinité et la température ($p=0,04$), entre la température et le temps ($p=0,01$), entre la présence de pesticide et la durée ($p=0,05$).

On repère ici aussi une interaction entre la température, la présence de pesticide et le temps significative ($p=0,04$). On observe donc un impact positif de la température sur l'effet du pesticide.

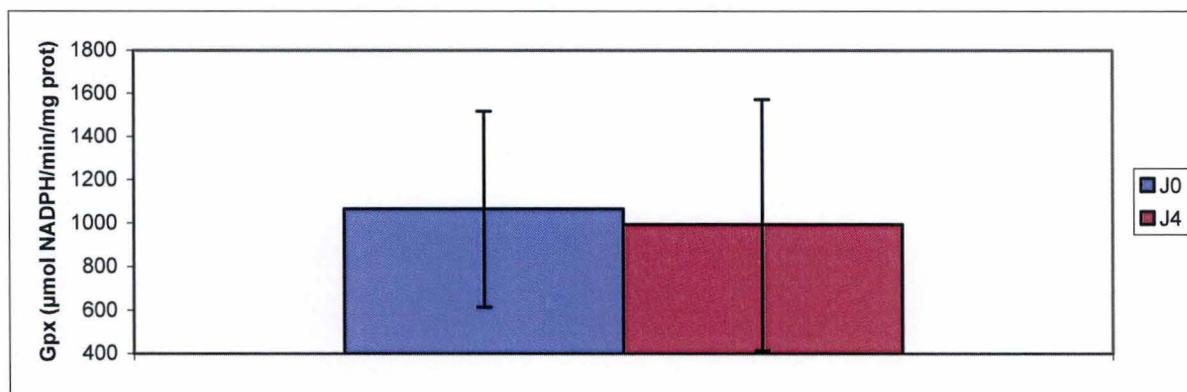


Figure 29 : Activité de la Gpx ($\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg prot}$) en fonction du temps dans l'hémolymphe

b) Gpx dans l'hépatopancréas :

Dans l'hépatopancréas, l'activité de la Gpx varie en fonction du temps (figure 30) (moyennes : 379 ± 68 au jour 0 et 207 ± 39 au jour 4 ($\mu\text{mol NADPH}/\text{min}/\text{mg prot}$)). L'ANOVA 3 a permis de mettre en évidence des effets du temps ($p=2,9.10^{-9}$) très hautement significatifs. Des interactions significatives entre la température et la salinité ($p=0,04$), entre la température et le temps ($p=0,01$) et entre la température, la présence de pesticide et le temps ($p=0,04$) ont également été détectées.

On observe également une interaction entre la température, la présence de pesticide et le temps dans l'hépatopancréas. Cet effet montre donc également l'effet modulateur positif de la température sur celui du pesticide.

Activité de la Gpx en fonction du temps :

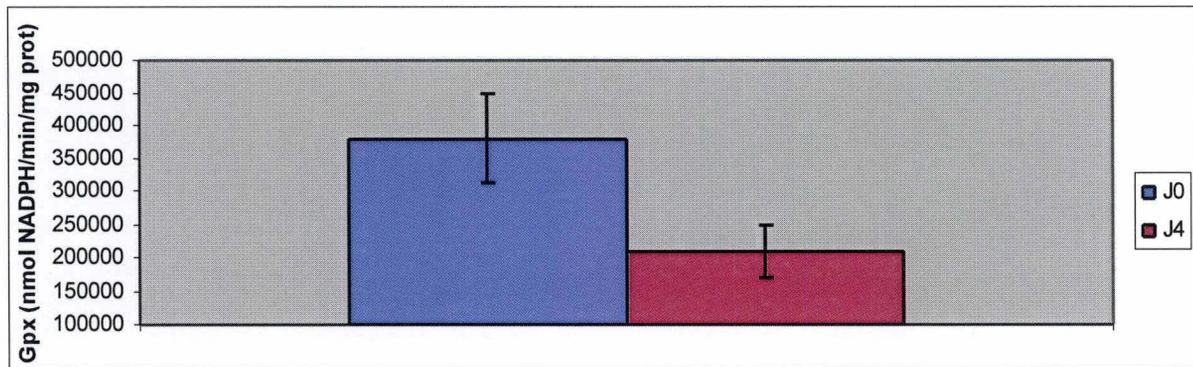


Figure 30 : Activité de la Gpx (nmol NADPH/min/mg prot) en fonction du temps dans l'hépatopancréas

Dans la littérature, l'activité de la glutathion peroxydase est fortement influencée par la présence de deltaméthrine et ce, dans tous les organes testés. Les résultats de Atif *et al* sur le poisson *Channa punctatus* montrent une diminution de l'activité de la Gpx par la deltaméthrine dans les branchies aussi bien que dans le foie et le rein. Chez la souris, Rehman *et al* (2006) montrent également une diminution significative de l'activité, dans les reins et le foie.

3.3.7 : Activité de l'acétylcholine estérase (AChE) :

L'AChE est une enzyme qu'on utilise comme biomarqueur du pouvoir insecticide. Nous avons mesuré son activité dans les muscles et dans les branchies.

a) AChE dans les branchies :

L'AChE dans les branchies est influencée par la température (figure 31) (moyennes : 24°C : 584 ± 61 ; 29°C : 731 ± 89 ; 34°C : 639 ± 77 (nmol/min/mg prot)). Le temps a aussi un effet (figure 32) (moyennes : jour 0 : 751 ± 74 ; jour 4 : 579 ± 65 (nmol/min/mg prot)). L'analyse statistique a mis en évidence des effets très significatifs de la température ($p=0,005$) et du temps ($p=1.10^{-6}$) sur l'activité de l'AChE, ainsi qu'une interaction significative ($p=0,02$) entre ces deux paramètres.

Effet de la température :

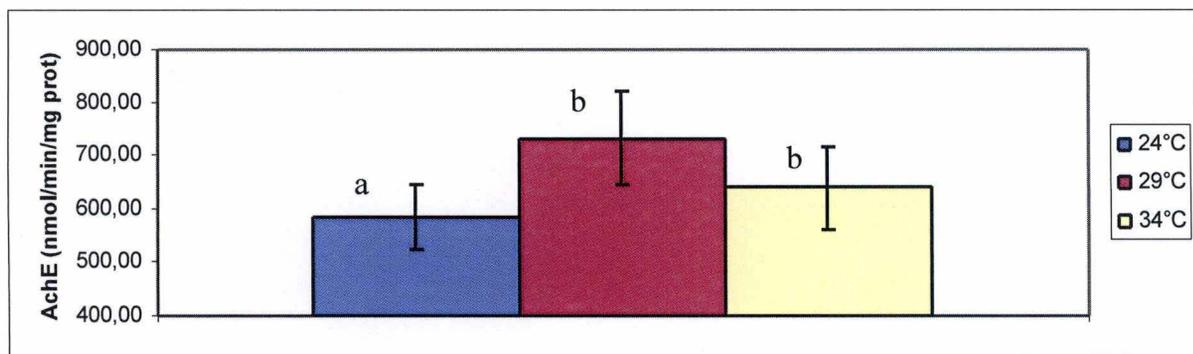


Figure 31 : Activité de l'acétylcholine estérase (nmol/min/mg prot) en fonction de la température dans les branchies

Le test LSD montre que les mesures correspondant à la température de 24°C sont différentes des deux autres ($p=0,0014$ entre 24 et 29°C, $p= 0,026$ entre 24 et 34 °C). Les valeurs mesurées à 29 et 34°C ne sont pas statistiquement différentes.

Effet du temps :

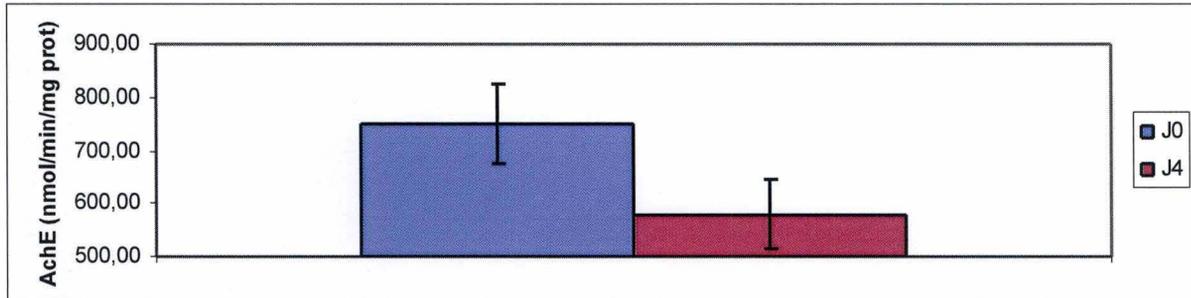


Figure 32 : Effet du temps sur l'activité de l'acétylcholine estérase (nmol/min/mg prot) dans les branchies

b) AChE dans les muscles

L'AChE dans les muscles est influencée par la présence de pesticide (figure 33) (moyennes : contrôle : 3010 ± 181 ; test : 2708 ± 344 (nmol/min/mg prot)). Le temps joue également un rôle (figure 34) (moyennes : J0 : 3276 ± 136 ; J4 : 2442 ± 234 (nmol/min/mg prot)). L'analyse statistique a permis de montrer des effets très hautement significatifs de la présence de pesticide ($p=0,001$) et du temps ($p=5.10^{-15}$), ainsi qu'une interaction très hautement significative entre ces deux paramètres ($p=8.10^{-9}$).

Effet du pesticide :

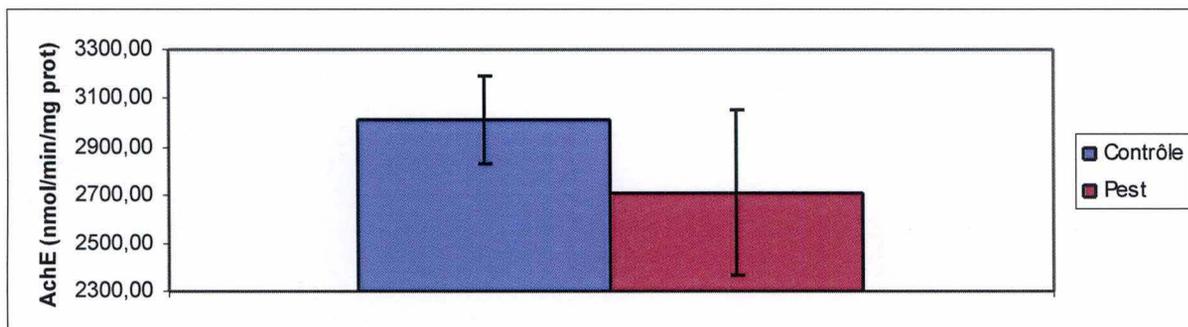


Figure 33 : Effet de la présence de pesticide sur l'activité de l'AChE (nmol/min/mg prot) dans les muscles

Effet du temps :

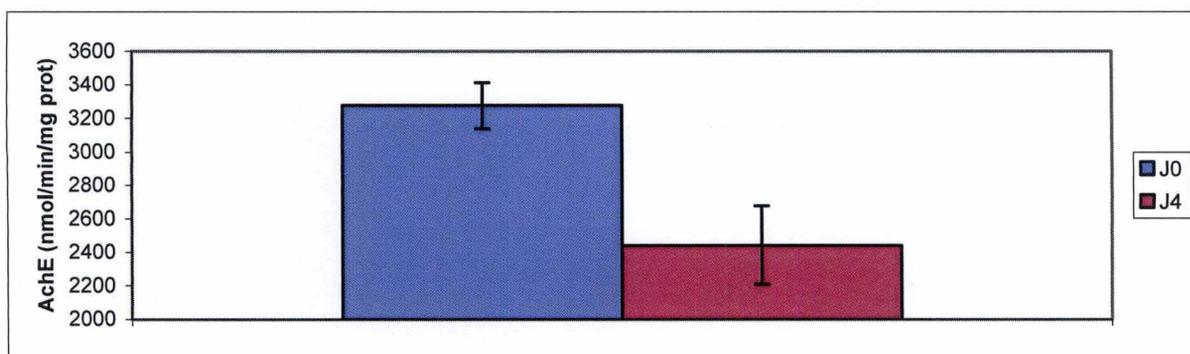


Figure 34 : Activité de l'AChE (nmol/min/mg prot) en fonction du temps dans les muscles

On observe donc une diminution importante de l'activité de l'AChE dans les muscles, prouvant par la l'effet de la deltaméthrine sur les neurones des plaques motrices notamment.

Le graphe ci-dessous permet de visualiser l'interaction entre la présence de pesticide et le temps :

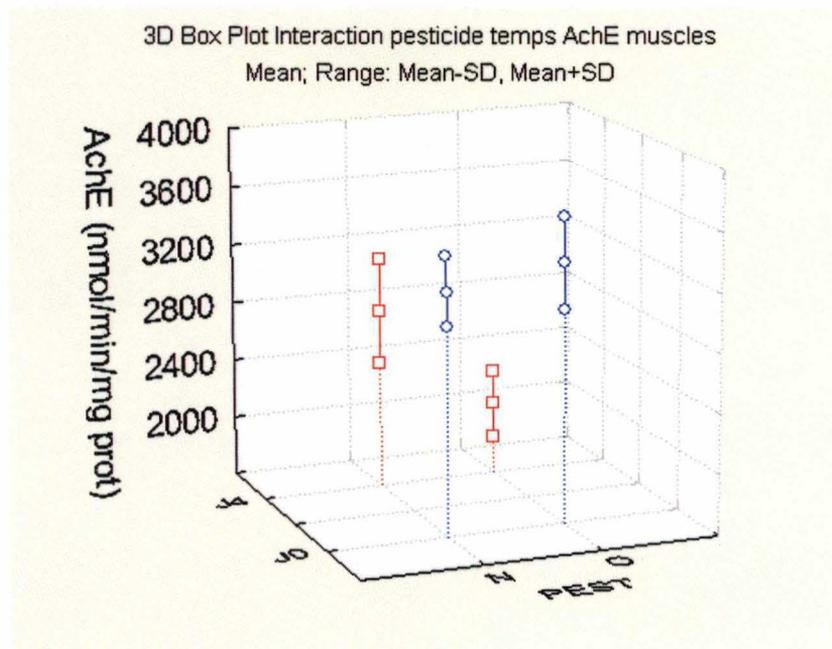


Figure 35: Interaction entre la présence de pesticide et le temps sur l'activité de l'AChE dans les muscles

Ce graphe illustre encore l'importance de la durée d'exposition dans la manifestation d'une toxicité. On observe un effet du pesticide au jour 4, ce qui signifie que les modifications enzymatiques effectuées par la deltaméthrine ne sont pas instantanées.

Yousef *et al* (2006) ont expliqué la diminution d'activité de l'AChE par le fait que la deltaméthrine a un effet inhibiteur sur le métabolisme des neurones et en particulier sur la synthèse de l'AChE.

4. Discussion

4. Discussion

4.1 : Effet du pesticide

L'effet du pesticide se manifeste au cours du temps principalement. L'influence du temps, souvent importante, détectée dans les résultats est une manifestation de l'effet de la deltaméthrine. En effet, au jour 0, le pesticide est ajouté après les prélèvements ; ainsi, les différences observées entre le jour 0 et le jour 4 sont dues à l'effet du pesticide. Pour plusieurs biomarqueurs testés (acétylcholine estérase (AChE) dans les muscles, glutathion peroxydase (Gpx) dans l'hémolymphe et dans l'hépatopancréas ainsi que la concentration en glutathion (GSH) dans l'hépatopancréas), on voit une corrélation entre le temps et la présence de pesticide.

On observe que la deltaméthrine, pour une concentration de $0,1\mu\text{g/l}$ et une durée d'exposition de 4 jours, a pour effet de diminuer l'activité de la glutathion peroxydase (Gpx), dans l'hémolymphe et dans l'hépatopancréas, ainsi que celle de l'acétylcholine estérase (AChE). On parvient néanmoins à observer l'effet du pesticide seul : sur l'AChE dans les muscles et sur la concentration en GSH dans l'hépatopancréas et dans les branchies.

L'AChE est une enzyme qui participe au phénomène qui est la cible principale de la deltaméthrine : la conduction de l'influx nerveux. Plus précisément, le pesticide ralentit la conduction des potentiels d'action en ralentissant la fermeture des canaux sodium de la membrane des axones. Des études (Yousef *et al* 2006) ont montré que la diminution de l'activité de l'AChE est due à un effet généralisé du pesticide sur la cellule neuronale. L'effet intrinsèque est l'ouverture plus longue d'un canal ionique, ce qui modifie les équilibres osmotiques de la cellule et donc le métabolisme complet de celle-ci. Le gradient de concentration et de pH de part et d'autre de la membrane de la cellule, nécessaire au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire est perturbé. Il est également suggéré dans l'article de Yousef *et al* que la deltaméthrine a un effet inhibiteur directement sur la synthèse de l'AChE. Enfin, une des manifestations du stress oxydant est la peroxydation lipidique, s'attaquant aux membranes biologiques en grande partie, ce qui contribue encore à modifier négativement le métabolisme des neurones contaminés.

Concernant les enzymes du stress oxydant, on constate un effet du pesticide sur l'activité de la Gpx mais aussi sur la concentration en GSH. On peut émettre l'hypothèse que la deltaméthrine, au cours de sa détoxification, génère des ROS sous la forme de H_2O_2 principalement. L'excès de cette molécule est directement pris en charge par la Gpx, en utilisant 2 molécules de GSH pour une molécule de H_2O_2 .

L'activité de la catalase, dans tous les cas, ne change pas en fonction de la présence de pesticide seulement. On peut donc avancer que la dose de deltaméthrine dans les organes étudiés était telle que les ROS résultant de sa décomposition sont en relativement faible concentration et sont pris en charge uniquement par la Gpx. La concentration en GSH augmente pour couvrir les besoins de la Gpx.

En 2006, J. Dorts a mesuré l'effet de la deltaméthrine sur les paramètres suivants : LPO, catalase, GSH, Gpx et GST, à la même concentration et pendant la même période de contamination. Ses résultats montrent une augmentation de la LPO dans les branchies, une

augmentation de l'activité de la Gpx dans les branchies, ainsi qu'une diminution de la catalase dans les branchies.

De plus, A.-E. Tyberghien a effectué en 2006 une analyse protéomique sur les mêmes échantillons. Elle a montré que la deltaméthrine a un effet positif sur la carbonylation des protéines. Ces résultats sont en accord avec ceux de Parvez *et al* (2005), qui ont mesuré le taux de carbonylation des protéines dans les branchies, les reins et le foie du poisson d'eau douce *Channa punctata* en réponse à une contamination à la deltaméthrine (0,75 µg/l, 48 h d'exposition). Ils ont montré que la deltaméthrine induit la carbonylation des protéines de manière très hautement significative (passage de $0,68 \pm 0,06$ nmol DNPH/mg prot en conditions contrôles dans les branchies à $1,75 \pm 1,09$ nmol DNPH/mg prot en conditions test, $p < 0,001$).

4.2 : Effet de la température

On remarque souvent des interactions entre la présence de pesticide et les autres paramètres (ex : catalase dans les branchies : interaction entre le pesticide, la température et le temps ; GSH dans les branchies : interaction entre le pesticide et la température ; LPO dans les branchies : interaction entre la salinité et le pesticide ; ...).

On peut expliquer cela par le fait que la température et la salinité de l'eau modifient le taux d'absorption du pesticide. Des études menées par Li *et al* (2006) ont montré que la deltaméthrine a une toxicité corrélée positivement à la température sur le papillon *Chilo suppressalis* (Walker), ce qui suggère effectivement une absorption facilitée avec la température.

Il ne faut cependant pas perdre de vue que la température a également un impact direct sur les enzymes du stress oxydant : Kaur *et al* (2005) ont montré que la concentration en GSH ainsi que l'activité de la catalase (CAT), de la glutathion S-transférase (GST) et d'autres diminuait fortement après que l'animal ait subi un choc de température. Dans cette expérience, tout a été fait pour limiter ce choc au maximum mais cela n'empêche pas que la température influence l'activité de ces enzymes.

Nous constatons des effets directs de la température sur la peroxydation lipidique (LPO) dans les branchies, sur l'activité de la GST dans les branchies et l'HP et sur la concentration en GSH dans l'HP et les branchies. Cet effet est presque toujours positif : une augmentation de la température entraîne une augmentation du paramètre mesuré sauf pour l'activité de la GST.

Dans la littérature, l'influence de la température sur l'activité de la GST est discutée: Menezes *et al* (2006) ont évalué l'effet de la température sur la réponse biologique des crevettes grises *Crangon crangon*. Ses résultats montrent que la température n'a aucun effet sur l'activité de la GST. Cependant, Kaur *et al* (2005) ont montré que l'activité de la GST diminuait significativement après un stress de température de 3 h, sur le poisson d'eau douce *Channa punctata*.

On retire de ces observations que l'activité de la GST est influencée par la température et que la température a une influence sur la toxicité de la deltaméthrine. Cependant, cette influence est relativement limitée et l'effet de l'interaction entre celle-ci et la présence de pesticide est plus important.

4.3. Effet de la salinité

La salinité joue aussi un rôle dans la toxicité de la deltaméthrine : on trouve des résultats significatifs dans les mesures de LPO dans l'HP, de GST dans l'HP et de GSH dans les branchies. On trouve aussi de nombreuses interactions entre la salinité et un autre paramètre, à savoir une interaction avec le pesticide sur la LPO dans les branchies et une interaction avec la température pour les mesures suivantes : la catalase dans les branchies, la GST dans l'HP, le GSH dans les branchies et la Gpx dans l'hémolymphe et l'HP.

La crevette *Penaeus monodon* est connue pour être très euryhaline, on s'attend donc à ce que la salinité n'ait pas ou peu d'effet sur le stress d'un individu, comme l'ont démontré Gaudy *et al* (1981). L'étude réalisée par Chien *et al* (2002) montre que la salinité est un paramètre qui influence peu les crevettes : ils ont soumis les organismes à une chute de température et de salinité importante (de 27 à 5 °C et de 32 à 0 ‰) séparément pendant 5 minutes. Le taux de récupération était de 29 et 78 % respectivement.

Ces résultats montrent que la crevette *Penaeus monodon* est effectivement peu sensible à la modification de la salinité de son milieu, confirmant sa réputation d'organisme très euryhalin.

On avance donc l'hypothèse que tous les changements liés à la salinité sont dus à une modification du taux d'absorption de la deltaméthrine, par modification de la perméabilité des épithélia branchiaux. On peut donc établir une corrélation entre la salinité de l'eau et la toxicité potentielle de la deltaméthrine, visualisée dans les interactions entre la salinité et le pesticide détectées ici.

Cette analyse est étayée par les résultats de Wang *et al* (2006), qui ont étudié l'effet de la salinité sur la réponse immunitaire de *Penaeus monodon*. Leurs conclusions indiquent que la salinité a une influence sur le taux de pénétration dans l'organisme des virus et autre particules exogènes (comme les pesticides) mais pas sur l'activité intrinsèque des enzymes étudiées.

De plus, durant l'expérience, nous avons constaté *de visu* que les crevettes placées dans la salinité la plus élevée (25 ‰) étaient plus stressées. Nous avons constaté des changements de couleur (une pigmentation foncée est signe de bon état général, ici les crevettes étaient sensiblement plus claires), ainsi qu'une apathie plus importante de ces organismes.

4.4. Modulation de l'effet du pesticide par la salinité et la température

Nous observons ces modulations dans les résultats des mesures de l'activité de la Gpx, celle de la catalase dans les branchies ainsi que sur la concentration en GSH dans les branchies.

Nous constatons un effet positif de la température sur l'impact du pesticide sur toutes ces mesures et un effet positif de la salinité sur le pesticide également. Ces effets démontrent la modulation des paramètres abiotiques sur la toxicité de la deltaméthrine et mettent en évidence l'importance du contrôle de ces conditions sur la qualité des crevettes. Il faut notamment modifier la façon dont les producteurs administrent la deltaméthrine au cours de l'année, pour éviter l'augmentation de la toxicité de la deltaméthrine corrélée à l'augmentation de température de l'eau au cours de la saison sèche.

5. Conclusions et perspectives

5. Conclusions et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons tenté de mettre en évidence l'effet de la deltaméthrine sur la réponse biologique de la crevette géante tigrée *Penaeus monodon*, ainsi que sa modulation par la salinité et la température de l'eau. L'analyse des résultats de cette expérience confirme l'effet du pesticide sur les enzymes du stress oxydant et on constate que cet effet est fortement dépendant du temps et des conditions abiotiques de l'environnement.

Les résultats sur l'activité de l'acétylcholine estérase confirment l'effet pesticide de la deltaméthrine sur sa cible principale, la conduction de l'influx nerveux dans les neurones et plus précisément les canaux membranaires de transport du Na^+ . Nos résultats indiquent également une forte dépendance de cet effet au temps. Par ailleurs, les données de dégradation de la deltaméthrine dans l'environnement mais aussi dans les systèmes biologiques montrent que la durée de vie de la molécule est relativement faible, ce qui incline à penser que l'effet en conditions naturelles est modeste, n'ayant pas le temps de se manifester fortement avant sa dégradation. De plus, les campagnes de pulvérisation du pesticide dans sa région d'application sont assez espacées dans le temps, ce qui réduit les risques de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire de ces écosystèmes (H. Berg, 2001).

L'étude de l'effet de la deltaméthrine sur les enzymes du stress oxydant a permis de confirmer l'effet générateur de ROS de cette molécule, ainsi que la modulation de cet effet par la salinité et la température. Cependant, peu de nos mesures ont permis de mettre en évidence cet effet. L'étude d'autres biomarqueurs (concentration en acide ascorbique (Sayeed *et al*, 2003), taux de carbonylation des protéines (Parvez *et al*, 2005)), ou d'autres enzymes impliquées dans la gestion du stress oxydant (super oxyde dismutase, cytochromes P 450,...) pourrait permettre de mettre mieux en évidence l'effet de la deltaméthrine mais aussi de préciser les voies métaboliques de sa dégradation dans un organisme vivant.

L'étude des effets des paramètres abiotiques montre que la température et, à moindre mesure, la salinité, influencent le taux de pénétration du pesticide dans l'organisme, modifiant ainsi sa toxicité. Cependant, les effets de ces paramètres séparés restent faibles.

De nouvelles méthodes d'analyse pourraient permettre de mettre en évidence l'effet du pesticide sur d'autres enzymes ou molécules. Nous avons tenté de mettre en évidence ces effets en effectuant des études du protéome de la fraction microsomale des branchies de crevettes. Nous sommes parvenus à des résultats positifs mais par manque de temps nous n'avons pas pu faire les analyses de ces résultats. Ces analyses permettraient de mettre en évidence des protéines subissant de façon plus importante l'effet de la deltaméthrine et même de développer une nouvelle méthode de diagnostic basée sur cette protéine. Des études histologiques des branchies dans les différentes conditions pourraient nous renseigner sur les modifications de la structure des branchies et, partant, les modifications du taux de pénétration de la deltaméthrine.

En gardant à l'esprit le but de l'étude dans laquelle s'inscrit ce mémoire, qui est de mettre au point une technique rapide et peu onéreuse de diagnostic de la présence de deltaméthrine en particulier mais aussi d'améliorer la qualité des crevettes produites au sud Vietnam, nous pouvons énoncer que la deltaméthrine n'a pas un effet négatif très important sur les crevettes *Penaeus monodon* et que cet effet est fortement modulé par les paramètres abiotiques du milieu dans lequel elles sont élevées. Malgré l'utilisation de ce produit dans ces régions, son

impact sur la santé publique semble négligeable. Par ailleurs, l'utilisation de la deltaméthrine dans les programmes de contrôles de maladies à vecteurs insectes (ex : la malaria) est un bénéfice pour les populations concernées.

6. Bibliographie

6. Bibliographie

1. Abdollahi M., Ranjbar A., Shadnia S., Nikfar S. & Rezaie A. Pesticide and oxidative stress: a review. *MedSciMonit* **10**(6), 141-147. (2004).
2. Ahsanullah M. & Ying W. Toxic effects of dissolved copper on *Penaeus merguensis* and *Penaeus monodon*. *Environmental contamination and toxicology* **55**, 81-88. (1995).
3. Alongi D.M., Dixon P., Johnston D.J., Van Tien D. & Thanh Xuan T. Pelagic processes in extensive shrimp ponds of the Mekong delta, Vietnam. *Aquaculture* **175**, 121-141. (1999).
4. Arnold S.J., Sellars M.J., Crocos P.J. & oman G.J. Intensive production of juveniles tiger shrimps *Penaeus monodon*: an evaluation of stocking density and artificial substrates . *Aquaculture* **261**, 890-896. (2006).
5. Arun S. & Subramanian P. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology* **121**, 273-277. (1998).
6. Arun S., Krishnamoorthy P. & Subramanian P. Properties of glutathione peroxidase from the hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsii*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **31**, 725-732. (1999).
7. Atif F. *et al.* Modulatory effects of Cadmium exposure on Deltamethin-induced oxidative stress in *Channa punctatus* Bloch. *Environmental contamination and toxicology* **49**, 371-377. (2005).
8. Berg H. Pesticide use in rice and rice-fish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Crop Protection* **20**, 897-905. (2001).
9. Berlett B.S. & Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* **272**(33), 20313-20316. (1997).
10. Boyd C.E. & Massaut L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquacultural Engineering* **20**, 113-132. (1999).
11. Bray W.A. & Lawrence A.D. Succesfull reproduction of *Penaeus monodon* following hypersaline culture. *Aquaculture* **159**, 275-282. (2007).
12. Cajaraville M.P. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *The science of Total Environment* **247**, 295-311. (2000).
13. Cengiz E.I. & Unlu E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gills, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **21**, 246-253. (2006).
14. Cheng W. & Chen J.C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology* **10**, 387-391 (2000).

15. Chien Y.-H., Pan C.-H. & Hunter B. The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with Astaxanthin. *Aquaculture* **216**, 177-191. (2003).
16. Correia A.D., Costa M.H., Luis O.J. & Livingstone D.R. Age-related changes in antioxidant enzymes activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of experimental marine biology and ecology* **289**, 83-101. (2003).
17. da Silva Vaz jr I, Imamura S, Ohashi K & Onuma M. Cloning, expression and partial characterization of *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. *Insect Molecular Biology* **13**(3), 329-335. (2004).
18. Damiens G, His E, Gnassia- Barelli M, Quiniou F & Romeo M. Evolution of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* **138**, 121-128. (2004).
19. Dandapat J., Chainy G.B.N. & Rao K.V.R. Lipid peroxidation and antioxidant defenses status during larval development and metamorphosis of the giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **135**, 221-233. (2002).
20. Dias Bairy A.C. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* **191**, 163-168. (2000).
21. Dorts J. Evaluation du stress oxydant chez la crevette tigrée *Penaeus monodon* suite à l'utilisation de pesticides dans les élevages au Vietnam. (2006).
22. Doyotte A., Cossu C., Jacquin M.-C., Babut M. & Vasseur P. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* **39**, 93-110. (1997).
23. Duda Jr.T.F. & Palumbi S.R. Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Marine biology* **134**, 705-710. (1999).
24. Dung N.H. & Dung T.T.T. Economic and Health Consequences of Pesticide use in Paddy Production in the Mekong Delta, Vietnam. (2003). Ottawa, Canada,
25. FAO. Cultured Aquatic Species Information Programme *Penaeus monodon*. (2007).
26. Farzanfar A. The use of probiotics in shrimp aquaculture. *Federation of European Microbiological Societies* **48**, 149-158. (2006).
27. Fatima M., Ahmad I., Sayeed I., Athar M. & Raisuddin S. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxide damages in fish tissues. *Aquatic Toxicology* **49**, 243-250. (2000).
28. Ferraris R.P., Parado-Esteva F.D., de Jesus E.G. & Ladja J.M. Osmotic and chloride regulation in the hemolymph of the tiger prawn *Penaeus monodon* during molting using different salinities. *Marine biology* **95**, 377-385. (1987).

29. Flegel T.W. Review: Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand. *Aquaculture* **258**, 1-33. (2006).
30. Gaudy R. & Sloane L. Effect of salinity on oxygen consumption in postlarvae of the penaeid shrimps *Penaeus monodon* and *P. stylirostris* without and with acclimatation. *Marine biology* **65**, 297-301. (1981).
31. Gowland B.T.G., Moffat C.F., Stagg R.M., Houlihan D.F. & Davies I.M. Cypermethrin induces glutathione S-Transferase activity in the shore crab *Carcinus meanas*. *Marine Environmental Research* **54**, 169-177. (2002).
32. Gräslund S. & Bengtsson B.-E. Chemical and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment - a review. *The science of Total Environment* **280**, 93-131. (2001).
33. Gräslund S., Holmström K. & Wahlström A. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Marine Pollution Bulletin* **46**, 81-90. (2003).
34. Kale M., Rathore N., John S. & Bathnagar D. Lipid peroxidative damage on Pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in Rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicology Letters* **105**, 197-205. (1999).
35. Kaur M., Atif F., Ali M., Rehman H. & Raisuddin S. Heat stress-induced alterations of antioxidants in the freshwater fish *Channa punctatus* Bloch. *Journal of Fish Biology* **67**, 1653-1665. (2005).
36. Key P.B., Fulton M.H., Harman-Fetcho J.A. & McConnel J.J. Acetylcholinesterase activity in grass shrimp and aqueous pesticide levels from south Florida drainage canals. *Environmental contamination and toxicology* **45**, 371-377. (2003).
37. Köprükü K. & Aydın R. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **80**, 47-53. (2007).
38. Köprükü S.S., Köprükü K. & Ural M.S. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to fingerlings european catfish, *Silurus glanis* L. *Environmental contamination and toxicology* **76**, 59-65. (2006).
39. Kurmaly K., Yule A.B. & Jones D.A. Effects of body size and temperature on the metabolic rate of *Penaeus monodon*. *Marine biology* **103**, 25-30. (1989).
40. Laria Lamela R.E., Coffigny R.S., Quintana Y.C. & Martinez M. Phenoloxidase and Peroxidase activity in the shrimp *Litopenaeus schmitti*, Perez-Farfante and Kensley (1997) exposed to low salinity. *Aquaculture research* **36**, 1293-1297. (2005).
41. Le Moullac G. & Haffner P. Environmental Factors affecting immune response in Crustacea. *Aquaculture* **191**, 121-131. (2000).
42. Li H. *et al.* Effect of temperature on toxicity of pyrethroid and endosulfan, activity of mitochondrial Na⁺ - K⁺ - ATPase and Ca²⁺ - Mg²⁺ - ATPase in *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **86**, 151-156. (2006).

43. Lightner D.V. & Redman R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**, 201-220. (1998).
44. Livingstone D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damages in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* **42**(8), 656-666. (2001).
45. Livingstone D.R. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue médecine vétérinaire* **154**, 427-430. (2003).
46. Lopes I *et al.* In-situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Chemosphere* **67**, 2250-2256. (2007).
47. Mary J. *et al.* Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized protein. *Experimental Gerontology* **39**, 1117-1123. (2004).
48. Menezes S, Soares A.MVM, Guilhermino L & Peck M.R. Biomarker responses of the estuary brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects. *Journal of experimental marine biology and ecology* **335**, 114-122. (2006).
49. Pandey S. *et al.* Biomarkers of oxidative stress: a comparative study on river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Sch.). *The science of Total Environment* **309**, 105-115. (2003).
50. Parihar M.S., Javeri T., Hemnani T., Dubey A.K. & Prakash P. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology* **22**(2), 151-156. (1997).
51. Parvez S. & Raisuddin S. Protein carbonyls: novel biomarker of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20**, 112-117. (2005).
52. Parvez S. & Raisuddin S. Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctatus* Bloch exposed to deltamethrin. *Chemosphere* **62**, 1324-1332. (2006).
53. Pimpao CT, Zamprônio AR & Silva de Assis HC. Effects of deltamethrin on hematological parameters and enzymatic activity in *Ancistrus multispinis* (Pisces, Teleostei). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **88**, 122-127. (2006).
54. Ray D.E. & Fry J.R. A reassessment of the neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology and Therapeutics* **111**, 174-193. (2006).
55. Rehman H. *et al.* The modulatory effects of deltamethrin on antioxidants in mice. *Clinica Chimica Acta* **369**, 61-65. (2006).
56. Sayeed I. *et al.* Oxidative stress biomarkers of exposure to Deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 295-301. (2003).
57. Shiau S.-Y. Nutrient requirement of penaeid shrimp. *Aquaculture* **164**, 77-93. (1998).

58. Smith D.M., Burford M.A., Tabrett S.J., Irvin S.J. & Ward L. The effect of feeding frequency on water quality and growth rate of the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* **207**, 125-136. (2002).
59. Soderlund D.M. *et al.* Mechanisms of pyrethroid toxicity: implications for cumulative-risk assessment. *Toxicology* **171**, 3-59. (2003).
60. Tantulo U. & Fotedar R. Comparison of growth, osmoregulatory capacity, ionic regulation and organosomatic indices of black tiger prawn (*Penaeus monodon*) juveniles reared in potassium fortified inland saline water and ocean water at different salinities. *Aquaculture* **258**, 594-605. (2006).
61. Tsai S-J & Chen J-C. Acute toxicity of nitrate on *Penaeus monodon* juveniles at different salinity levels. *Aquaculture* **213**, 163-170. (2002).
62. Tyberghien A.-E. Induction des HSP60, 70 et 90 chez la crevette tigrée géante *Penaeus monodon* des crevetticultures vietnamiennes suite à l'utilisation d'endosulfan et de deltaméthrine. (2006).
63. Ural M.S. & Saglam N. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **83**, 124-131. (2005).
64. Valavanidis A., Vlahogianni T., Dassenakis M. & Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**, 178-189. (2006).
65. Velisek J *et al.* Effects of deltamethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **23**, 297-301. (2006).
66. Viran R., Ercoç F.Ü., Polat H. & Koçak O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies *Poecilia reticulata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**, 82-85. (2003).
67. Wang F.-I. & Chen J.-C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Fish and shellfish immunology* **20**, 671-681. (2006).
68. Wang, W.N. *et al.* Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture* **256**, 624-630 (2006).
69. World Health Organisation. International program on chemical safety, Deltamethrin. World Health Organisation. **97**. (1990). *Environmental Health Criteria*.
70. Yousef M.I., Awad T.I. & Mohamed E.H. Deltamethrin-induced oxidative damage and biochemical alterations in rat and its attenuation by Vitamin E. *Toxicology* **227**, 240-247. (2006).

7. Annexes

7. Annexes: protocoles *in extenso*

1 : Homogénéisation

Tampon d'homogénéisation : KH_2PO_4 0,005 M pH 7,5

Rapport tissu/homogénat :

Hépatopancréas : 1/5

Branchies, muscle : 1/10

Inhibiteur de protéase : Cocktail protease inhibitor Sigma, dilution 100 X final

2. Dosage des protéines

Technique de Lowry :

0,5 ml homogénat (5 μl + H_2O)

+ 0,5 ml NaOH 1 N (Dénaturation des protéines)

Incubation entre 30 min et 2 h

+ 5 ml du MIX A : Na_2CO_3 2 %, CuSO_4 1%, tartrate solico-potassique 1% (rapport 100 :1 :1)

Incubation 15 min

+ 0,5 ml du réactif de Folin dilué 2X dans H_2O

Incubation 30 min

Lecture à 660 nm (bleu)

Droite étalonnage : On part d'un étalon BSA 10 mg / ml

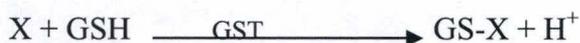
On utilise les quantités suivantes :

| | |
|------------------|----------------------|
| 0 μl | 0 $\mu\text{g/ml}$ |
| 5 μl | 50 $\mu\text{g/ml}$ |
| 10 μl | 100 $\mu\text{g/ml}$ |
| 20 μl | 200 $\mu\text{g/ml}$ |
| 50 μl | 500 $\mu\text{g/ml}$ |

Pour réaliser se dosage, on peut utiliser les restes d'homogénat des autres mesures.

3. GST (Glutathione S-transferase)

GSH utilizes GSH to scavenge electrophilic xenobiotics as part of an organism's defense against the deleterious effects of such compounds. Due to its activity in detoxifying xenobiotics, GST plays an important role in the well-being of all living systems. Moreover, because it interacts with GSH, and because its implication relative to removal of oxidatively generated harmful substances, it is a key to evaluate the oxidative stress status of an organism.



The technique was described by Habig *et al* (1974)

Principle

The assay is based on the conjugation of GSH with 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) via the GST activity

Experimental procedure

| | Test (µl) | Blank (µl) | 1 Blank (µl) | 2 |
|--|-----------|------------|--------------|---|
| Hepes buffer pH 7,5 33 mM (23 mM final) | 700 | 700 | 700 | |
| CDNB 1,5 mM final (in ethanol) | 15 | 15 | 15 | |
| GSH 1,5 mM final | 10 | 10 | | |
| H ₂ O | 255 | 275 | 265 | |
| Sample | 20 | | 20 | |
| read at 340 nm for 3 min | | | | |

The overall reaction is started by adding 20µl of sample. The increase of absorption at 340 nm is monitored for 3 min at 25 °C.

The blank 1 is used as zero since there is an activity due to direct reaction of GSH with CDNB. The blank 2 is optional.

The activity is expressed as nmol of CDNB conjugate formed per min per mg of prot using a molar extinction coefficient of $9,6 \times 10^3 / \text{M cm}$. CDNB is diluted in absolute ethanol; GSH in Hepes buffer.

4. Catalase

Catalase serves as one of the body's defence against H_2O_2 , a strong oxidant that can cause intracellular damage. Each unit of catalase decompose 1 μmol of H_2O_2 per min at 25 °C and pH 7.



Principle

The common method for the determination of its activity involves measuring the change in absorbance at 240 nm. Criticisms of the method include interference from non-specific UV absorbing materials and the requirement of quartz cuvettes. Because of this, we tested a colorimetric method. The titanium oxisulfate (TiOSO_4) reacts with H_2O_2 that was not reduced by catalase after 6 min (Baudhuin *et al*, 1964).

Experimental procedure

- First, prepare a stock solution called BC (blanc mixture) containing 1g BSA; 100 ml Imidazol buffer 0,2 M pH 7; 900 ml/l H_2O .
- Prepare a stock solution of TiOSO_4 : 1,7 g TiOSO_4 in 500 ml H_2SO_4 2N. Boil for 10 min and let the solution till the day after
- Then, we need to adjust the quantity of H_2O_2 to be added to BC. Try adding 40 μl of H_2O_2 30 % to 250 ml BC (solution called SC or sample mixture). Then, add 0,75 ml of TiOSO_4 to 1,3 ml of SC. Read at 420 nm. The absorbance must be comprised between 0,75 and 0,95 and is the maximum absorbance possible (with no reduction of H_2O_2 by catalases). If not, try again with other volumes of H_2O_2
- Then, proceed as in the table below:

| | Test (μl) | Blank 1 (μl) | Blank 2 (μl) |
|----------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------|
| SC | 1250 | | |
| BC | | 1250 | 1250 |
| Triton X-100 0,02 % | 25 | 25 | 25 |
| Phosphate buffer | | 25 | |
| sample | 25 | | 25 |
| 6 min at 0°C | | | |
| TiOSO4 | 750 | 750 | 750 |
| read at 420 nm after 5 to 10 min | | | |

Remarks: One unit of activity is defined as the amount of enzyme causing the destruction of 90% of the substrate in 1 min in a volume of 50 ml under the assay condition.

The blank 1 absorbance (without H_2O_2) is taken as a zero. The blank 2 absorbance is subtracted from the sample's. It corresponds to the sample intrinsic reaction with TiOSO_4 .

5. LPO

Lipid peroxidation, which is associated with oxidative stress, contributes to several pathological processes. Oxidation of polyunsaturated lipids involves an allylic hydrogen abstraction, insertion of molecular oxygen and subsequent abstraction of hydrogen by the resulting hydroperoxyl radicals to form lipid peroxides (LOOH). LOOHs generate malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxyalkenals (HAE) upon decomposition.

Principle

The measurement of LOOHs are extensively used as an indicator of the LPO reaction. One of the most widely employed techniques consists to add Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) to the sample. TBARS react with MDA and the product is read spectrophotometrically at 535 nm (Fatima *et al*, 2000). A calibration curve with increasing MDA values allows the calculation of LPO which is expressed in nmol MDA equivalent / g tissue.

Experimental procedure

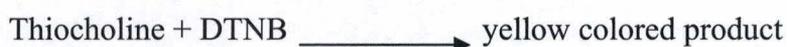
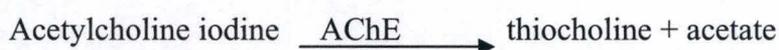
- Mix 500 μ l homogenate directly with TCA 5% (trichloroacetic acid) in a ratio 1:1 (TCA in H_2O).
- Incubate on ice for 15 min.
- Mix the solution with TBA (thiobarbituric acid) 0,67% in a ratio 2:1 (67 mg TBA in 1ml DMSO + 9ml H_2O)
- Centrifuge at 3000 rpm (2200 x g) for 10 min at 4 °C
- Boil whole supernatant for 10 min
- Refresh at room temperature and obscurity
- Read absorbance at 535 nm

The calibration curve is obtained with increasing quantities of 1,1,2,3 methylmalonaldehyde (TMOP). Prepare a stock solution 500 μ M (4 μ l TMOP in 1ml ethanol + 49 ml H_2O). Dilute in H_2O to obtain final concentration of 10 - 5 - 2,5 - 1,25 - 0,0625 μ M.

6. Assay of Acetylcholinesterase (AChE)

Principle

The activity of AChE will be measured according to a method developed by Ellman *et al* (1961). This method employs acetylcholine iodine (ATChI) as a synthetic substrate for AChE. ATChI is broken down to thiocholine and acetate by AChE and thiocholine is reacted with dithiobisnitrobenzoate (DTNB) to produce a yellow color. The quantity of yellow color which develops over time is a measure of the activity of AChE and can be measured using a spectrophotometer. Ellman's reagent, 5,5'-dithio-2-nitrobenzoic acid (DTNB, Sigma), reacts with sulphhydryl groups under slightly alkaline conditions to release the chromogenic compound 5-thio-2-nitrobenzoate, which absorbs at 412 nm with an absorption coefficient of $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. These coupled reactions are represented by the following equations:



Note

- Products of the reaction are 2-nitrobenzoate-5 mercaptothiocholine and 5-thio-2-nitrobenzoate (the latter is the yellow colored product)
- The activity of an enzyme is generally expressed as a rate: the quantity of substrate (in moles) which is broken down by a known amount of enzyme per unit time. In this case, it will be the amount of ATChI which is broken down by AChE per minute.

Reagent preparation

50mM phosphate buffer $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,4

50 mM sodium phosphate $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,4

167 μM DTNB (dilution in sodium phosphate)

Procedure

| | Blank (μl) | Test (μl) |
|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| DTNB | 900 | 900 |
| sodium phosphate 50mM | 50 | |
| sample | | 50 |
| substrate (1,5 mM final) | 50 | 50 |

Read absorbance at 412 nm during 10 min.

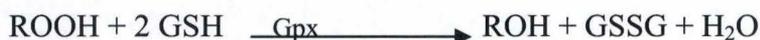
Calculation

$R = \text{Abs} * \text{dilution} / \text{volume sample (ml)} * 13600 (\text{nmol}^{-1} \text{cm}^{-1}) * \text{protein (mg/ml)}$

R = in mole substrate hydrolyzed/min/mg prot

7. Gpx (glutathione peroxidase)

Gpx function is to detoxify peroxides in the cell. Since peroxides decompose to form highly reactive radicals, the Gpx enzymes play a critical role in protecting the cell from free radicals damages. Gpx catalyzes the reduction of H₂O₂ to water and organic peroxides (ROOH) to the corresponding stable alcohol (ROH) using glutathion as source of reducing equivalents.



The technique tested here was described by Flohé and Günzler (1984) and modified by Mohandas *et al* (1984).

Principle

GSSG formed during Gpx reaction is instantly and continuously reduced by an excess of glutathione reductase activity providing a constant level of GSH. The concomitant oxidation of NADPH is monitored photometrically.

Experimental procedure was determined as below:

| | Test (µl) | Blank (µl) |
|--|----------------------------|------------|
| Phosphate buffer 50 mM EDTA 1mM; NaN ₃ 1mM pH 7 | 550 | 550 |
| GR 2 U/ ml final | 100 | 100 |
| GSH 2 mM final | 100 | 100 |
| NADPH 0,2 mM final | 100 | 100 |
| homogenizing buffer | | 50 |
| sample | 50 | |
| | 10 min at room temperature | |
| H ₂ O ₂ 0,5 mM final | 100 | 100 |
| | Read at 340 nm for 5 min | |

The overall reaction is started by adding 100 µl of H₂O₂ and the decrease of absorption at 340 nm is monitored for 5 min. The activity is expressed as nmol of NADPH oxidized per min per mg of protein.

The blank (with NADPH and H₂O₂ but without sample) has an initial absorbance of about 1,2 and a decrease rate of -0,017 dA/min (likely due to direct oxidation of GSH per H₂O₂). We can use this blank only as zero.

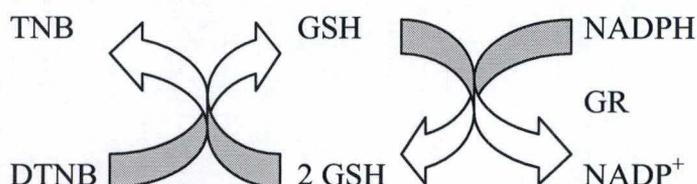
We should take care about the initial absorbance of the sample that should not exceed the initial absorbance of the blank. Otherwise, it means that there is interference between opacity of the sample due to low dilution. In this case, we should dilute more the sample.

8. Concentration en GSH total

Glutathione (gamma-glutamylcysteinylglycine or GSH) is a naturally occurring tripeptide whose reducing properties play a central role in metabolic pathways, as well as in the antioxidant system of most aerobic cells. GSH plays a critical role as a coenzyme with a variety of enzymes including glutathione peroxidase, glutathion S-transferase and thiol transferase. It is also crucial to a variety of life processes, including maintenance of the -SH level of the protein.

Principle

In order to evaluate the total GSH content in shrimp tissues, we used the reaction of reduced GSH with DTNB (5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) which can be read spectrophotometrically at 412 nm. The oxidized form of glutathione (GSSG) must be reduced to GSH with the enzyme glutathione reductase (GR) in presence of NADPH.



Experimental procedure consist to:

| | Blank (µl) | Test (µl) |
|--------------------|------------|-----------|
| Phosphate buffer | 740 | 740 |
| NADPH 0,2 mM final | 100 | 100 |
| DTNB 0,15 mM final | 100 | 100 |
| Sample | | 20 |
| SSA 2,5 % | 20 | |
| GR 2 U/ml final | 40 | 40 |

Where the solutions are:

- Phosphate buffer: KH_2PO_4 200 µM; EDTA 0,1 mM, pH 7,5
- NADPH 0,2 mM final (in water)
- DTNB 0,15 mM final (in water)
- SSA (5-sulphosalicylic acid); 5 g diluted in 100 ml water
- GR 2 U/ml final (in phosphate buffer)

Remarks

GR must be added lastly. Shake well the solution before reading at 412 nm for 5 min. The sample, after homogenisation in phosphate buffer must be diluted in SSA 5 % in a ration 1:1 and centrifuged at 10 000 x g for 10 min.

The concentration of GSH is calculated with a calibration curve obtained with increasing concentrations of purified GSH.

| | 0 pmol (blank) | 60 pmol | 120 pmol | 180 pmol | 240 pmol | 300 pmol |
|---------------------|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Phosphate buffer | 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 15 μ M | 0 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| GR | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |

GSH is diluted is SSA 1 % to obtain a final concentration of 15 μ M. New solution should be prepared each month and all samples from an experiment should be proceeded with the same standard curve.