



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Evaluation du stress oxydant chez la crevette tigrée *Penaeus monodon* suite à l'utilisation de pesticides dans les élevages au Vietnam

Dorts, Jennifer

Award date:
2006

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**EVALUATION DU STRESS OXYDANT CHEZ LA CREVETTE TIGREE *PENAEUS MONODON*
SUITE A L'UTILISATION DE PESTICIDES DANS LES ELEVAGES AU VIETNAM**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Dorts Jennifer
Août 2006

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

Evaluation du stress oxydant chez la crevette tigrée *Penaeus monodon* suite à l'utilisation de pesticides dans les élevages au Vietnam

DORTS Jennifer

Résumé

L'utilisation de pesticides est très répandue dans les élevages de crevettes au Vietnam. Toutefois, l'impact potentiel sur les crevettes elles-mêmes reste à ce jour peu connu. Dans ce travail, des crevettes *Penaeus monodon* ont été exposées à trois concentrations nominales d'endosulfan (0,01 µg/l ; 0,1 µg/l et 1 µg/l) et de deltaméthrine (0,001 µg/l ; 0,01 µg/l et 0,1 µg/l) pendant quatre jours. Une période de décontamination de 7 jours a également été réalisée après contamination. L'hépatopancréas, les branchies et l'hémolymphe des crevettes ont été récoltés au jour 0, au jour 4, et au jour 4+7, soit 7 jours après la phase de contamination. Une augmentation significative ($P=0,0001$) de la peroxydation lipidique LPO a été observée dans les branchies après une exposition de 4 jours à 0,1 µg/l de deltaméthrine ($64,3 \pm 3,2$ nmol MDA/g tissu) par rapport au jour 0 ($34,2 \pm 5,3$ nmol MDA/g tissu). A cette même concentration, une augmentation significative ($P=0,027$) des contenus en glutathion total GSH (à J0 : $27,8 \pm 17,3$ nmol de GSH/g tissu ; à J4+7 : $79,7 \pm 42,2$ nmol de GSH/g tissu) et une augmentation significative ($P=0,016$) de l'activité de la glutathion peroxydase GPx (à J0 : $2,7 \pm 1,6$ nmol NADPH/min/mg prot; à J4+7 : $8,8 \pm 1,7$ nmol NADPH/min/mg prot) furent observées dans les branchies au cours du temps. Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour d'autres systèmes antioxydants au niveau des branchies : glutathion S-transférase GST, catalase CAT et glucose 6-phosphate déshydrogénase G6PDH. De plus aucune différence significative des biomarqueurs testés (LPO, GSH, GST, GPx, CAT et G6PDH) n'a été décelée lors de l'expérimentation avec la deltaméthrine dans l'hépatopancréas et lors de l'expérimentation avec l'endosulfan au niveau des branchies et de l'hépatopancréas. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé l'analyse protéomique dans le but de déceler un éventuel état d'oxydation des protéines par la méthodologie des gels d'électrophorèse en deux dimensions. Les groupements carbonyles des protéines oxydées ont été détectés après dérivatisation au DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) par un procédé immunologique. Nous avons observé que le degré de carbonylation des protéines au niveau des branchies, n'est pas plus élevé après une exposition de quatre jours à 0,1 µg/l de deltaméthrine qu'au jour 0 avant contamination. Nous avons également pu observer une modification qualitative de l'état d'oxydation du protéome. Ainsi, nous avons pu montrer que ces deux pesticides ont peu d'effet sur les biomarqueurs du stress oxydant. Toutefois, l'utilisation de la LPO, du GSH, de la GPx et de l'état de carbonylation des protéines au niveau des branchies en tant que biomarqueur de la deltaméthrine est envisageable afin d'évaluer l'état de stress des crevettes géantes tigrées dans les élevages.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2006

Promoteur : P. Kestemont

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

Oxidative stress in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following the use of pesticides in Vietnamese farms

DORTS Jennifer

Abstract

In recent year, the use of pesticides has increased in shrimp farming. However, the potential effect on the health of cultured shrimps is largely unknown. In this report, *Penaeus monodon* were exposed to 3 nominal concentrations of endosulfan (0,01 µg/l ; 0,1 µg/l et 1 µg/l) and deltamethrin (0,001 µg/l ; 0,01 µg/l et 0,1 µg/l) for 4 days. A decontamination period of 7 days was performed after the contamination phase. Hepatopancreas, hemolymph and gills were collected at day 0, day 4 and day 4+7, in other words 7 days after the end of contamination. Exposure to 0,1 µg/l of deltamethrin significantly ($P=0,0001$) increased lipid peroxidation LPO in gills with value of $64,3 \pm 3,2$ nmol MDA/g tissue compared to the day 0 ($34,2 \pm 5,3$ nmol MDA/g tissue). Along with the induction of LPO, total glutathione GSH (at D0 : $27,8 \pm 17,3$ nmol GSH/g tissue ; at D4+7 : $79,7 \pm 42,2$ nmol GSH/g tissue) and activity of glutathione peroxidase GPx (at D0 : $2,7 \pm 1,6$ nmol NADPH/min/mg prot; at D4+7 : $8,8 \pm 1,7$ nmol NADPH/min/mg prot) increased significantly ($P=0,016$; $P=0,027$ respectively) in gills. On the other hand, no significant differences were found for the other studied antioxidant systems in gills: glutathione S-transferase GST, catalase CAT and glucose 6-phosphate dehydrogenase G6PDH. In addition, the tested biomarkers (LPO, GSH, GST, GPx, CAT and G6PDH) in hepatopancreas were not altered by any of the two pesticides. Furthermore, we were unable to detect an effect of endosulfan treatment on the tested biomarkers in gills. Secondly, proteomic analysis was used to detect a potential protein carbonyl induction using two-dimensional gel electrophoresis. Carbonyls derivatives were detected following conjugation with DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) which can be achieved by immunochemical assay. After an exposition for 4 days to 0,1 µg/l of deltamethrin, we observed a carbonylation degree in gills not higher compared to the day 0. We were also able to observe a qualitative modification of the proteome oxidation status. Consequently, the present study showed a slight effect of endosulfan and deltamethin on the oxidative stress biomarkers studied. However, the use of LPO, GSH, GPx and the protein carbonylation status in gills as biomarker of deltamethrin exposure is conceivable in order to evaluate the stress status of the cultivated giant tiger shrimps.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Août 2006

Promoteur : P. Kestemont

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- 2D = gel d'électrophorèse en deux dimensions
ADN = acide désoxyribonucléique
ARN = acide ribonucléique
APS = ammonium persulfate
BSA = albumine de sérum bovin
CAT = catalase
CDNB = 1-chloro-2,4-dinitrobenzène
CHAPS = 3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanesulfonate
cm = centimètre
cm² = centimètre carré
CL50 = concentration létale moyenne
Cu = cuivre
DDT = dichloro-diphényl-trichloréthane
DL50 = dose létale moyenne
DMSO = diméthylsulfoxyde
DNPH = 2,4-dinitrophenylhydrazine
DTNB = acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)
DTT = dithiothreitol
EDTA = acide tétraacétique éthylène diamine
ESI = *electrospray ionization*
Fe = fer
g = gramme
GABA = acide gamma amino butyrique
G6PDH = glucose 6-phosphate déshydrogénase
GPx = glutathion peroxydase
GR = glutathion réductase
GSH = glutathion, forme réduite
GSSG = glutathion, forme oxydée
GST = glutathione S-transférase
h = heure
ha = hectare
HAPs = hydrocarbures aromatiques polycycliques
H₂O = eau
H₂O₂ = peroxyde d'hydrogène
HSP = protéine de stress (*Heat Shock Protein*)
IEF = focalisation isoélectrique (*Isoelectric focusing*)
IPG = gradient de pH immobilisé
kg = kilogramme
km² = kilomètre carré
Km = constante de Michaelis Menten
l = litre
LOO· = hydroperoxyde lipidique
LOOH = hydroperoxyde lipidique
LPO = peroxydation lipidique
µg = microgramme
µl = microlitre
µM = micromolaire
µm = micromètre

Abréviations

M = molaire

m = mètre

m³ = mètre cube

mA = milliampère

MALDI = *matrix assisted desorption ionization*

MDA = malondialdéhyde

mg = milligramme

min = minute

ml = millilitre

mM= millimolaire

mm = millimètre

Mn = manganèse

MS = spectromètre de masse

NADP⁺ = nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite

NBT = nitrobleu tétrazolium

ng = nanogramme

nmol = nanomole

nm = nanomètre

O₂ = oxygène moléculaire

O₂⁻ = anion superoxyde

OH[°] = radical hydroxyle

PBS= phosphate buffer saline

PCB = polychlorobiphényles

ppb = *parts per billion* (µg/l)

ppm = *parts per million* (mg/l)

ppt = *parts per thousand* (g/l)

Q-TOF = *quadrupole-time of flight*

ROS = espèces réactives de l'oxygène

SDS = sodium dodécyl sulfate

SDS-PAGE = *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SEP = signature d'expression protéique

SOD = superoxyde dismutase

SSA = acide 5-sulphosalicylique

TBA = acide thiobarbiturique

TBARS = substances réactives à l'acide thiobarbiturique

TCA = acide trichloroacétique

TEMED = tétraméthylène diamine

TiOSO₄ = oxysulfate de titane

TMOP = 1,1,2,3 methylmalondialdéhyde

Tris = Tris-(hydroxyméthylamino-méthane)

U : unité

w/v : Poids/volume

Le voyage réalisé dans le cadre du présent travail a été rendu possible grâce à l'intervention financière du Conseil interuniversitaire de la Communauté française de Belgique – Commission universitaire pour le Développement – Rue de Namur, 72-74, 1000 Bruxelles – <http://cud.ciuf.be>

Arrivée au terme de ce mémoire, je voudrais remercier toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait pas été ce qu'il est...

Je tiens d'abord à remercier mon promoteur, le Professeur Patrick Kestemont de m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche et d'avoir cru en moi pour la réalisation de ce mémoire

Je remercie le Professeur Nguyen Thanh Phuong pour m'avoir accueillie dans son département d'aquaculture et pêcheries (Can Tho, Vietnam) et Madame Huynh Thi Tú pour son aide bienvenue dans le laboratoire du Collège d'aquaculture et pêcheries de Can Tho

Je remercie chaleureusement Frédéric Silvestre d'avoir accepté d'être tuteur officiel de ce mémoire

Merci pour ton aide Frédéric, et pour tout ce que tu as fait pour m'aider durant ce mémoire. Merci d'avoir été à l'écoute de mes nombreuses interrogations durant ce mémoire. Merci pour ton soutien, tes encouragements, tes conseils précieux, ta disponibilité, tes nombreuses compétences scientifiques, ta gentillesse et pour les bons moments de discussion et de sympathie passés avec toi... encore merci pour tout

Merci Marie-Claire pour votre savoir-faire, vos compétences scientifiques durant ce travail en laboratoire. Vous m'avez appris beaucoup... Mais à côté de cet aspect travail, je tiens également à vous remercier pour votre sympathie et pour les nombreux moments de discussion...

Je remercie Raphy, Auré, Valoche, Clo pour leur soutien mais également pour les nombreux moments partagés ensemble durant ces quatre années d'étude ... Merci à Annerick, Marie-Aline, Nath, Caro, Lor, Greg, Piwi pour votre sympathie et pour ces deux dernières années passées en votre compagnie... Merci à toi Annerick pour ta sympathie et les moments enrichissants passés en ta compagnie, ton écoute et tes conseils lors de ce séjour au Vietnam... Merci Dan, An, Chris pour les nombreux bons moments passés en votre compagnie au Vietnam...

Je n'oublie pas non plus mes autres condisciples de biologie Delphine, Séverine, Blandine,... et les bons moments passés en votre compagnie

Merci à toi So, de m'avoir toujours soutenue depuis toujours et pour avoir toujours cru en moi... merci pour cette belle amitié...

Merci à Soph, Claire... mes amies de toujours, d'avoir toujours été là...

Enfin, je remercie mes parents de m'avoir permis de réaliser ces quatre années d'études et ce séjour inoubliable au Vietnam. Merci pour votre amour, votre soutien et la confiance que vous m'avez toujours témoignée. Merci à Aly, ma sœur et à Ju, mon frère d'avoir toujours été là pour moi...

Table des matières

I. Introduction	1
1. La crevetticulture au Vietnam	1
1.1. Principales espèces cultivées	1
1.2. Différentes méthodes de culture de crevettes.....	2
1.3. Principales maladies rencontrées dans les élevages de crevettes	3
1.4. Effets de l'aquaculture sur l'environnement	3
1.4.1. <i>Utilisation de produits chimiques et biologiques</i>	4
1.4.2. <i>Destruction de la mangrove</i>	4
2. Les Pesticides	5
2.1. Introduction	5
2.2. Les Pesticides dans l'environnement	5
2.3. Utilisation des pesticides au Vietnam	6
2.4. Les pesticides étudiés.....	7
2.4.1. <i>La deltaméthrine, un pyréthroïde</i>	7
2.4.1. <i>L'endosulfan, un organochloré</i>	9
3. Notion de stress oxydant	10
3.1. Les espèces réactives de l'oxygène.....	11
3.2. Les systèmes de défense antioxydants.....	12
3.2.1. <i>Système enzymatique</i>	12
3.2.2. <i>Système non enzymatique</i>	13
3.2.3. <i>Etude des systèmes antioxydants chez différentes espèces de crevettes</i>	14
3.3. Les biomarqueurs de stress oxydant chez les organismes aquatiques	14
3.3.1. <i>Introduction générale</i>	14
3.3.2. <i>Réponse des animaux aquatiques au stress oxydant induit par divers contaminants de l'environnement</i>	15
4. Les pesticides en tant qu'inducteur d'un stress oxydant	16
4.1. Les pyréthroïdes et le stress oxydant	17
4.2. Les organochlorés et le stress oxydant.....	17
5. Objectifs	18
II. Matériel et méthodes	20
1. Les animaux	20
2. Conditions expérimentales	20
3. Dosage des biomarqueurs de stress oxydant	21
3.1. Préparation des échantillons	21
3.2. Dosage de la peroxydation des lipides (LPO)	21
3.3. Dosage du glutathion total (GSH)	22
3.4. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)	22
3.5. Dosage de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH).....	22
3.6. Dosage de la glutathion S-transférase (GST).....	23

3.7. Dosage de la catalase (CAT)	23
3.8. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry	23
4. Mise en évidence des protéines carbonylées en analyse protéomique	23
4.1. Préparation des échantillons	24
4.2. Electrophorèse en IEF (<i>IsoElectric focusing</i>).....	24
4.3. Electrophorèse SDS-PAGE (<i>Sodium Dodecyl Sulfate- PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)	24
4.4. Western blot.....	25
4.5. Marquage aux anticorps anti-DNP/HRP et révélation.....	25
4.6. Coloration à l'argent	25
4.7. Scanner	26
5. Traitement statistique des données	26
III. Résultats	27
1. Rappel du protocole expérimental	27
2. Dosage des biomarqueurs de stress oxydant	27
2.1 Dosage de la peroxydation lipidique (LPO).....	27
2.2. Dosage du glutathion total (GSH)	29
2.3. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	31
2.4. Dosage de l'activité de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)	33
2.5. Dosage de la glutathion S-transférase (GST)	35
2.6. Dosage de l'activité de la catalase (CAT).....	37
3. L'analyse protéomique	39
IV. Discussion et perspectives	41
V. Conclusions	53
Bibliographie	54

INTRODUCTION



Figure 1: A bar chart showing the distribution of data across eight categories. The x-axis is labeled 'Category' and the y-axis is labeled 'Frequency'. The bars are colored in shades of purple and blue. The legend indicates four data series: 'Series 1 (Red)', 'Series 2 (Green)', 'Series 3 (Blue)', and 'Series 4 (Yellow)'. The bars show a general downward trend from left to right.

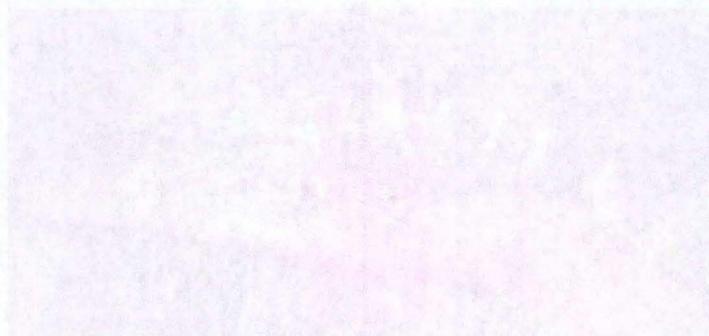


Figure 2: A large, dark, rectangular area, possibly a placeholder for a figure or a very dark image.

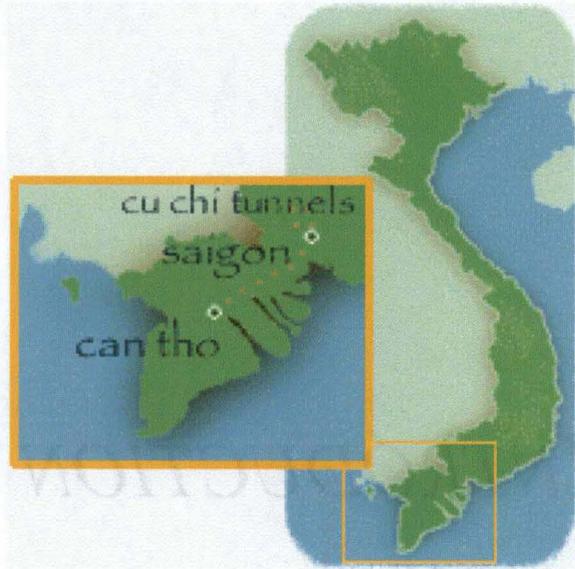


Figure 1 : Localisation du Delta du Mékong.

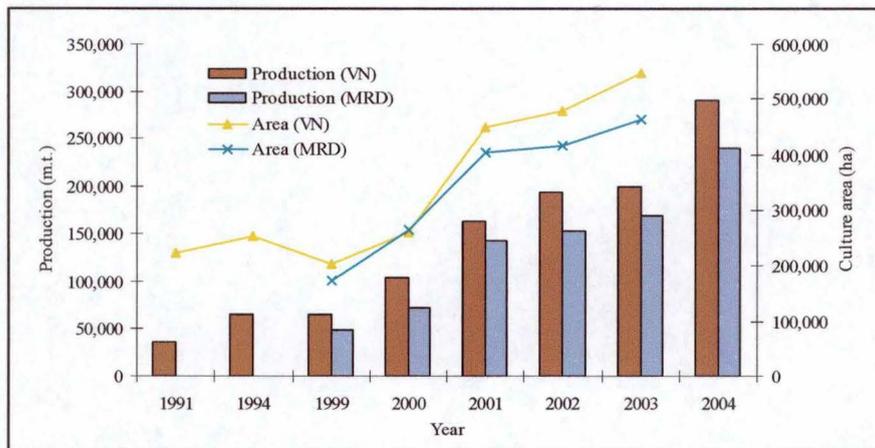


Figure 2 : Evolution des productions de crevettes et des surfaces occupées par la crevetteculture au Vietnam (VN) et dans le Delta du Mékong (MRD).



Figure 3 : *Penaeus monodon*.

INTRODUCTION

La production commerciale de crevettes d'élevage a commencé dans les années 1970 et a connu une croissance très rapide au cours des dernières décennies. Plus de cinquante pays, essentiellement en zone tropicale, sont impliqués dans cette activité. Le continent asiatique produit à lui seul plus de 75 % des crevettes commercialisées dans le monde, le reste étant fourni en grande partie par l'Amérique latine. La crevetticulture moderne ne concerne qu'un nombre limité d'espèces dont les plus intéressantes sont *Penaeus monodon* en Asie et *Penaeus Vannamei* en Amérique latine.

Une aquaculture extensive traditionnelle existe depuis longtemps en Asie du sud-est, mais l'aquaculture moderne semi-intensive et intensive s'est véritablement développée depuis les années 80. Cependant dès 1988 l'activité a rencontré de grosses difficultés liées à l'apparition de maladies d'origine principalement virale et à une dégradation des conditions environnementales (notamment la destruction des mangroves).

En effet, pour produire autant de crevettes que possible et conserver des populations en surnombre, de grandes quantités d'alimentation artificielle et d'additifs chimiques sont employées. Le malathion, le parathion, le paraquat et d'autres pesticides sont également pulvérisés sur les bassins. Hormis les produits chimiques, plusieurs types d'antibiotiques sont aussi utilisés à forte dose pour éviter que les crevettes ne développent des maladies.

Hélas, en plus de son effet néfaste sur les écosystèmes environnants, ce cocktail de substances est connu pour avoir un impact négatif sur la santé des crevettes cultivées (Boyd et Massaut, 1999 ; Gräslund *et al.*, 2003). L'exposition à ces produits peut augmenter le niveau de stress des crevettes et dès lors diminuer leur croissance et/ou augmenter leur sensibilité aux infections (Reyes *et al.*, 1999 ; Le Moullac et Haffner, 2000). Ceci pose évidemment des problèmes de qualité et de sécurité alimentaires.

C'est dans ce contexte général que nous allons évaluer l'éventuel stress oxydant subi par la crevette tigrée *Penaeus monodon* suite à une exposition à deux pesticides régulièrement utilisés dans les élevages au Vietnam, l'endosulfan (organochloré) et la deltaméthrine (pyréthroïde).

1. La crevetticulture au Vietnam

Le secteur de la pêche et de l'aquaculture constitue actuellement le troisième secteur d'exportation du Vietnam, après les produits oléagineux et le textile. La production aquacole de ce pays connaît, depuis une vingtaine d'années, une croissance impressionnante, soit 10 à 15 % par an. D'une superficie de 39 000 km², le delta du Mékong (Figure 1) domine la production aquacole du pays.

Parmi les différents types de production aquacole, l'élevage de crevettes constitue une activité prédominante, avec une production de plus de 290 000 tonnes en 2004 (Figure 2).

1.1. Principales espèces cultivées

Les espèces de crevettes les plus cultivées sont la crevette géante tigrée, *Penaeus monodon*, la crevette blanche du Pacifique, *Litopenaeus vannamei* et la crevette blanche chinoise, *Fenneropenaeus chinensis*.

La crevette géante tigrée, *Penaeus monodon*, se reconnaît aisément par son corps tigré gris-vert avec des bandes jaunes et noires sur la carapace et des pléiopodes bleus et jaunes (Figure 3).

Sa classification se résume comme suit :

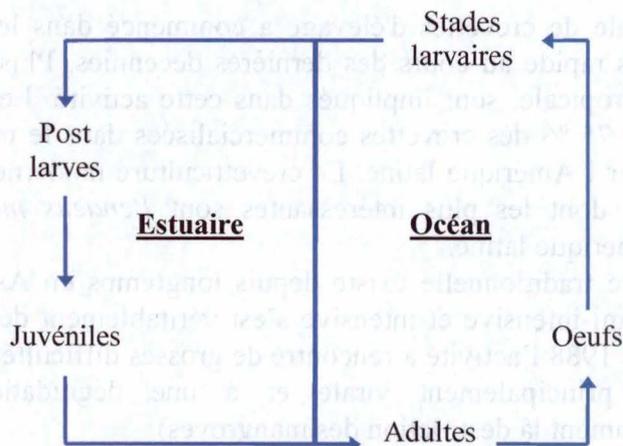


Figure 4 : Cycle de vie de *Penaeus monodon*.

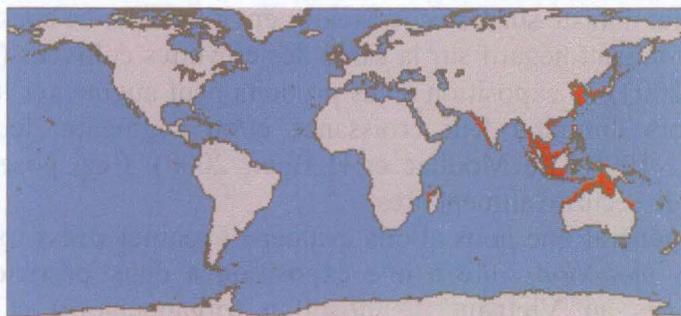


Figure 5 : Répartition géographique de la crevette géante tigrée, *Penaeus monodon*. (http://kosfic.yosu.ac.kr/kos_home/ocean_gis/FAO/mapbrief.html)

Tableau 1 : Quelques caractéristiques des différents systèmes de culture de crevettes (Groth, 1997 ; Gräslund, 2001 ; van de Braak, 2002).

	Extensif	Semi-intensif	Intensif
Surface des étangs (ha)	1-10	1-2	0,1-1
Profondeur des étangs (cm)	30-100	80-150	120-150
Densité (juvéniles/ha)	10 000-30 000	30 000-100 000	100 000-500 000
Nourriture	Naturelle	Naturelle et artificielle	Artificielle
Production (kg/ha/an)	600-1500	2000-6000	7000-15 000
Changement d'eau	Naturel	Naturel et mécanique	Mécanique
Aération	Non	Parfois	Nécessaire

Phylum : arthropodes
Sous-phylum : crustacés
Classe : malacostracés
Ordre : décapodes
Super-famille : penaeoïdés
Famille : penaeidés
Genre : *Penaeus*
Espèce : *monodon*

La crevette géante tigrée fait partie des espèces commercialement les plus importantes. Elle mesure habituellement entre 150 et 300 mm de long. Il s'agit d'une espèce très intéressante pour la culture car elle possède un taux de croissance élevé. En effet, les individus atteignent une taille commerciale de 25 à 30 g en 3 à 4 mois. De plus, elle tolère une large gamme de salinité.

Elle présente un cycle de vie similaire à celui des autres pénaéidés (Figure 4). Les juvéniles préfèrent les eaux peu profondes des estuaires tandis que les adultes migrent au large vers des eaux profondes et salées. Les adultes frayent en mer à des profondeurs comprises entre 20 et 160 m. Le nombre d'œufs (0,29 mm de diamètre) par ponte varie selon l'état de la femelle. Cependant, il est généralement compris entre 248 000 et 811 000.

Les larves planctoniques restent en mer pendant environ 3 semaines et leur développement passe par 6 stades nauplius, 3 stades protozoé et 3 stades mysis. Après les stades mysis, suivent plusieurs stades mégalope ou post-larve. Seules les post-larves atteignant l'estuaire, deviennent des juvéniles et continuent à grandir.

La durée de vie de la crevette géant tigrée est de 1 an et demi pour le mâle et de 2 ans pour la femelle.

La crevette géante tigrée est omnivore. Environ 85 % de la nourriture ingérée est composée d'algues, de mollusques, de petits poissons, et de crustacés. Les individus peuvent également devenir cannibales lorsque la quantité et/ou la qualité de la nourriture disponible diminuent (van de Braak, 2002).

On la retrouve à l'état sauvage entre 30 et 155° de longitude Est et entre 35° de latitude Nord et 35° de latitude Sud, c'est-à-dire à partir de l'est et du sud-est de l'Afrique et du Pakistan, jusqu'au Japon et Taiwan. La crevette tigrée est également présente dans le nord de l'Australie (Figure 5).

La crevette géante tigrée représente 58 % de la production mondiale de crevettes. Au Vietnam, pratiqué sur plus de 550 000 ha dont 80 % dans le Delta du Mékong, l'élevage de la crevette géante tigrée représente à lui seul 70 à 80 % de la production totale de crustacés.

1.2. Différentes méthodes de culture de crevettes

Actuellement, il existe 3 principales méthodes de culture de crevettes (Groth, 1997 ; Shang, 1998) (Tableau 1) :

- Les fermes extensives sont caractérisées par une faible densité et de faibles apports extérieurs. Elles rejettent généralement des quantités insignifiantes de nutriments ou de matières organiques dans les écosystèmes environnants. Ce système repose principalement sur la productivité naturelle de l'étang bien que, occasionnellement, des fertilisants y soient ajoutés pour favoriser le développement algal comme nourriture naturelle.
- Les fermes intensives sont petites et sont caractérisées par une densité élevée. La production repose sur un nourrissage conséquent. L'aération est continue et

Tableau 2 : Intensité d'élevage dans les principaux pays asiatiques producteurs de crevettes (d'après Gräslund et Bengtsson, 2001).

	Extensif (%)	Semi-intensif (%)	Intensif (%)	Année	Références
Thaïlande	5	10	85	1994	Kongkeo, 1997
	5	70	25	1999	Rosenberry, 1999
Philippines	35	50	15	1994	Kongkeo, 1997
	30	60	10	1999	Rosenberry, 1999
Indonésie	80	10	10	1994	Kongkeo, 1997
	50	25	25	1999	Rosenberry, 1999
Vietnam	90	/	/	1992	Weidner et Rossenberry, 1992
	80	15	5	1998	Rossenberry, 1998

Tableau 3 : Principales maladies infectieuses et non infectieuses touchant *Penaeus monodon* (traduit d'après Lightner et Redman, 1998).

Maladies virales	Maladies bactériennes et mycosiques	Autres maladies
.Groupe des points blancs .Virus de la tête jaune .Groupe des <i>Monodon baculovirus</i> .Virus responsables d'infections hypodémales et de nécroses hématopoïétiques .Parvovirus hépatopancréatique	.Vibrioses: -nécrose infectée -vibriose lumineuse -vibriose touchant les nurseries .Mycoses larvaires .Riketsia .Fusariosis	.Parasites internes .Parasites externes .Déséquilibre nutritionnel .Syndromes toxiques .Syndromes environnementaux

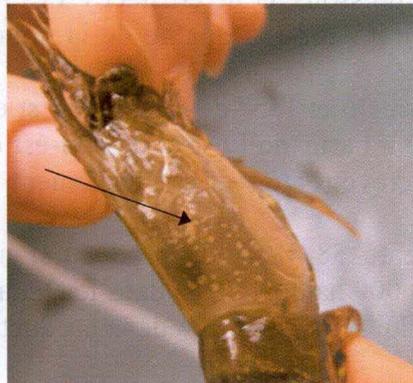


Figure 6: Maladie des points blancs (*White spot disease*).

automatisée, le renouvellement d'eau (30 % par jour) se fait par pompage. Les coûts de production sont assez élevés.

- Enfin, la culture semi-intensive est un intermédiaire entre les cultures intensive et extensive. Les fermes semi-intensives comprennent des étangs de taille moyenne. La nourriture est naturelle et/ou artificielle. L'échange d'eau se fait par les marées et par pompage, ce qui permet un renouvellement de 5 à 10 % de l'eau par jour. L'aération est occasionnelle.

Des produits chimiques et biologiques sont utilisés dans les fermes intensives et semi-intensives afin d'en augmenter la production.

Parmi les principaux pays asiatiques producteurs de crevettes, plus de 90 % des élevages ont recours à un système extensif et semi-intensif, à l'exception de la Thaïlande (Shang, 1998).

En effet, durant les années 1990, le système intensif était utilisé dans la majorité des élevages thaïlandais de crevettes. Cependant, selon Rosenberry (1999 in Gräslund et Bengtsson, 2001), le système semi-intensif devient de plus en plus fréquent alors que la proportion de fermes intensives diminue.

Aux Philippines, le système semi-intensif domine alors qu'en Indonésie et au Vietnam, on retrouve principalement des fermes extensives (Tableau 2).

La culture en cages, la polyculture avec des poissons herbivores (carpes) ou encore l'élevage de crevettes en rotation avec la culture de riz sont d'autres possibilités de crevetticulture.

1.3. Principales maladies rencontrées dans les élevages de crevettes

L'émergence de maladies constitue une contrainte sérieuse pour la production aquacole et le commerce et est considérée comme un facteur important et limitant dans l'élevage de crevettes.

Parmi les nombreux facteurs responsables de cet essor, on peut citer : des densités d'élevage excessives, des fluctuations importantes de facteurs abiotiques (oxygène, température, pH), une dégradation de la qualité de l'eau, une contamination par des pesticides et autres polluants (Kautsky *et al.*, 2000).

Les maladies rencontrées peuvent être réparties en différents groupes selon l'agent responsable de la maladie. On distingue les maladies virales, bactériennes, mycosiques, parasitaires et non infectieuses (Brkic, 2003) (Tableau 3).

En Asie, des virus tels que *Monodon baculovirus*, virus de la tête jaune et des points blancs (Figure 6) ont causé d'importantes pertes économiques dans de nombreux pays.

Des infections bactériennes ont également eu de sévères conséquences. L'espèce *Vibrio* est le plus commun et le plus sérieux des pathogènes touchant *Penaeus monodon*. La vibriose (*luminous vibriosis*) causé par la bactérie *Vibrio harveyi* fut responsable d'importantes pertes aux Philippines (Barg et Lavilla-Pitoga, 1996) et dans d'autres pays d'Asie du sud-est.

Des maladies non infectieuses telles que la maladie des branchies noires (*black gill disease*) représentent une menace sérieuse pour l'industrie de la crevette et sont généralement associées à une détérioration de l'environnement et à un éventuel déséquilibre alimentaire (Lightner et Redman, 1998).

1.4. Effets de l'aquaculture sur l'environnement

L'expansion rapide de la crevetticulture au Vietnam pose de nombreux problèmes plus particulièrement en terme de développement durable. En effet, bien que l'important développement de la crevetticulture au Vietnam ait permis la création de nouveaux emplois et la réduction de la pauvreté locale, et ait joué un rôle crucial dans la croissance économique

du pays, cette rapide expansion a engendré une réduction de la superficie occupée par la mangrove et une dégradation de l'environnement dans le delta du Mékong (de Graaf et Xuan, 1998 ; Johnston *et al.*, 2000 ; Ela, 2005).

1.4.1. Utilisation de produits chimiques et biologiques

De nombreux produits chimiques et biologiques sont utilisés dans les élevages de crevettes en Asie. Les principales raisons de l'utilisation de ces produits sont liées aux problèmes engendrés par l'augmentation des densités d'élevage, et par conséquent à la détérioration de la qualité de l'eau et au risque élevé de maladies. Parmi ces produits, on retrouve les fertilisants, désinfectants, antibiotiques, pesticides et probiotiques.

Une attention plus particulière a été consacrée aux impacts potentiels de ces produits sur l'environnement aquatique, les écosystèmes terrestres adjacents, la santé humaine et la sécurité alimentaire. Il existe trois principaux groupes de substances utilisés dans les fermes de crevettes qui peuvent affecter l'environnement de différentes manières (Gräslund et Bengtsson, 2001) :

- Suite à leur utilisation en aquaculture, les produits chimiques présents dans l'environnement, peuvent être très toxiques, mutagènes ou avoir d'autres effets négatifs sur la faune et la flore sauvage.
Les pesticides et désinfectants sont utilisés pour leurs propriétés toxiques et beaucoup d'entre eux ont un impact négatif sur l'environnement. Ces derniers peuvent persister ou laisser des résidus toxiques dans les étangs, résidus qui seront évacués dans les écosystèmes avoisinants.
- La dispersion des antibiotiques peut engendrer des résistances parmi les pathogènes et un changement dans la composition des microorganismes de l'environnement aquatique.
- Les effluents contenant des concentrations en nutriments et en matières organiques élevées peuvent causer une eutrophisation locale ou régionale.

Les produits chimiques et biologiques utilisés ont également un impact négatif sur la santé des crevettes cultivées (Gräslund *et al.*, 2003). L'exposition à ces produits peut augmenter le niveau de stress des crevettes et dès lors diminuer leur croissance et/ou augmenter leur sensibilité aux infections (Reyes *et al.*, 1999 ; Le Moullac et Haffner, 2000). Selon Bainy (2000), les désinfectants, antibiotiques, pesticides, fertilisants et autres sont tous capables d'engendrer des effets toxiques sur les crevettes cultivées.

Des polluants en provenance d'activités industrielles et agricoles, de décharges et d'habitations implantées à proximité des fermes de crevettes peuvent avoir un impact négatif sur la santé des celles-ci. Des insecticides, des métaux lourds, des combustibles ou encore des lubrifiants peuvent être présents dans les étangs suite à des contaminations non intentionnelles (Boyd et Massaut, 1999).

1.4.2. Destruction de la mangrove

La mangrove, forêt de palétuviers caractéristiques des régions littorales en zones tropicales, est un des écosystèmes les plus productifs de la planète. Elle joue un rôle important dans la protection des zones littorales, dans le maintien des zones de refuge, de reproduction et de nurserie pour de nombreuses espèces aquatiques (Groth, 1997).

Actuellement, elle est progressivement remplacée dans la plupart des pays producteurs de crevettes par des systèmes semi-intensifs ou intensifs. Sur les 200 000 ha qu'elle occupait en 1975 dans le delta du Mékong, la mangrove est aujourd'hui réduite à 60 000 ha (Ela, 2005).

En plus de cette expansion, les pressions de la population ont provoqué le déboisement pour l'agriculture (particulièrement pour la culture du riz), le pâturage, le développement urbain, la coupe de bois de chauffage et pour satisfaire à la demande de matériel de construction (Johnston *et al.*, 2000).

2. Les pesticides

2.1. Introduction

Les pesticides sont des substances chimiques minérales ou organiques destinées à la destruction d'organismes animaux ou végétaux considérés comme indésirables ou nuisibles. Etant destinés à tuer des organismes vivants, tous les pesticides, même les moins nocifs, présentent une toxicité plus ou moins grande envers les écosystèmes, avec souvent des effets délétères sur des organismes non visés, y compris sur l'être humain. Leur impact dépend à la fois de leur mode d'action, de leur persistance dans le temps et de leurs sous-produits de dégradation, lesquels sont parfois plus toxiques et se dégradent moins vite que le composé initial. Au-delà du fait qu'il est synthétisé dans le but d'être toxique, chaque pesticide possède des caractéristiques physiques et chimiques propres, rendant pratiquement impossible toute généralisation. Ainsi, même si les récents pesticides sont de plus en plus solubles dans l'eau, des critères tels que le taux de toxicité, la dégradation, la biotransformation ou l'accumulation varient d'un pesticide à l'autre.

Les pesticides sont utilisés depuis longtemps mais leur utilisation généralisée a suivi les progrès de la chimie minérale. Au 19^{ième} siècle, les traitements fongicides sont à base de sulfate de cuivre ou à base de mercure ; les insecticides tels l'arsénite de cuivre, l'acétoarsénite de cuivre, l'arséniate de plomb font leur apparition. Le pyrèthre, une poudre provenant de fleurs du genre *Chrysanthemum*, est introduit comme insecticide à cette époque. Ensuite, les pesticides profitent très largement du développement de la chimie organique déjà avant la guerre 39-45 ; mais c'est surtout après cette guerre que naît un nombre élevé de molécules. Dans les années 50, des insecticides comme le DDD et le DDT sont utilisés en grandes quantités en médecine préventive (pour détruire le moustique vecteur de la malaria) et en agriculture (élimination du doryphore). D'autres biocides sont mis au point pour l'industrie textile et du bois, pour l'usage domestique (aérosols tue-mouches), pour l'entretien des routes et pour une utilisation en médecine.

L'usage des pesticides a connu un fort développement au cours des décennies passées. Cet usage est maintenant tellement répandu dans notre société que nous avons tendance à oublier que ces produits sont d'abord élaborés pour détruire et contrôler des organismes jugés indésirables ou nuisibles.

2.2. Les pesticides dans l'environnement

C'est dans les années 40 que les premiers pesticides de synthèse sont apparus sur le marché, avec des résultats très positifs quant à l'augmentation des rendements agricoles. Vingt ans plus tard, les premières accusations d'atteinte à la santé des gens et à l'environnement se firent entendre. Le débat sur les risques encourus et les bénéfices recueillis de la lutte chimique s'est prolongé depuis si bien que l'on ait consacré de très nombreux travaux de recherche à mieux connaître l'impact des pesticides sur l'environnement.

On estime que plusieurs millions de tonnes de pesticides sont appliqués chaque année sur les cultures de la planète. La part qui entre en contact avec les organismes indésirables cibles est minime. La plupart des chercheurs l'évaluent à moins de 10 %, ce qui signifie que 90 % des substances déversées se dispersent dans l'environnement (Mansour, 2004). Comme la lutte

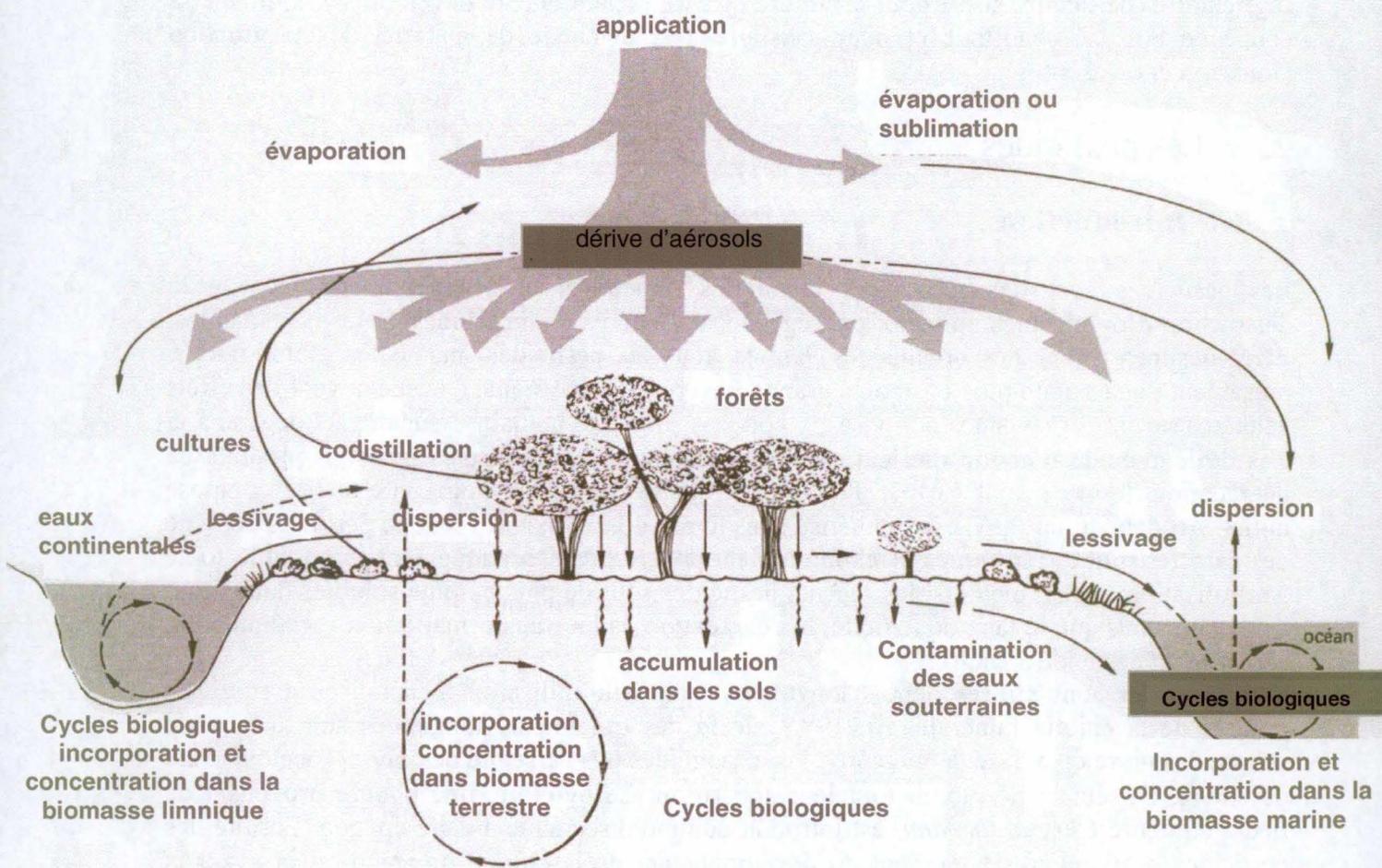


Figure 7 : Principales modalités de pollution des écosystèmes terrestres et aquatiques par les traitements pesticides (Kestemont, 2005).

chimique expose inévitablement aux traitements des organismes non-cibles, des effets secondaires indésirables peuvent se manifester sur des espèces, des communautés ou des écosystèmes entiers.

Loin d'être instantanément dégradées, les molécules se retrouvent un peu partout dans notre environnement. Dès qu'ils ont atteint le sol ou la plante, les pesticides commencent à disparaître : ils sont dégradés ou sont dispersés. Les matières actives peuvent se volatiliser, ruisseler ou être lessivées et atteindre les eaux de surface ou souterraines, être absorbées par des plantes ou des organismes du sol ou rester dans le sol (Figure 7). Les pesticides persistants se retrouvant dans les rivières et lacs peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire aquatique entraînant ainsi de sérieux dommages à la vie aquatique (Mansour, 2004).

C'est le manque de sélectivité des pesticides vis-à-vis de leur cible qui provoque la plupart des effets nocifs pour l'environnement. Les animaux absorbent les pesticides via la nourriture ou l'eau d'alimentation, via l'air respiré ou au travers de leur peau ou de leur cuticule. Ayant franchi diverses barrières, le composé toxique atteint les sites du métabolisme ou est stocké (van der Werf, 1996).

Pour ce qui est de l'impact sur l'homme, on doit prendre en compte, outre la toxicité proprement dite, les effets carcinogènes, immunodépresseurs, mutagènes, neurotoxiques et tératogènes (Hayes, 1991 in van der Werf, 1996). On a montré que les pesticides étaient capables d'endommager le système immunitaire ou de perturber les régulations hormonales, tant chez l'homme que chez l'animal, provoquant des symptômes variés (van der Werf, 1996).

2.3. Utilisation des pesticides au Vietnam

Le Vietnam ainsi que d'autres pays émergents, font face à de nombreux problèmes liés à l'emploi de pesticides. Les fermiers et autres utilisateurs ignorent d'ordinaire les risques, les instructions de sécurité et les mesures de protection essentielles (Nguyen Him Huan et Dao Trong Anh, 2001).

Les pesticides sont largement utilisés au Vietnam depuis les années 1970. Les efforts pour nourrir une population grandissante et pour augmenter les exportations de denrées alimentaires reposent sur 20 000 tonnes de pesticides par an dont 80 % sont des insecticides (Pham Bhin Quyen *et al.*, 1995).

Le riz est l'une des principales productions agricoles du Vietnam. La production de riz a fortement augmenté dans le pays depuis 1989, celui-ci étant devenu le troisième exportateur mondial de riz depuis le début des années 90. Le delta du Mékong est considéré comme le grenier à riz de ce pays. Toutefois, plus la production de riz est importante, plus l'utilisation de pesticides et autres produits chimiques est élevée entraînant ainsi une détérioration de l'environnement et des impacts négatifs sur la santé des fermiers (Dang Minh Phuong, 2002). De nombreux fermiers considèrent les pesticides comme des produits à vertu médicinale qui 'soignent' leurs cultures. Suite à cette idée, certains pulvérisent des pesticides aveuglément.

Une étude menée en 1996/1997 dans le delta du Mékong dénombre 17 herbicides, 30 insecticides et 28 fongicides régulièrement utilisés par les fermiers (Nguyen Huu Dung et Tran Thi Thanh Dung, 1997) (Tableau 4).

Les agriculteurs font face aux infestations de parasites par l'emploi d'insecticides. Les insecticides ne tuent pas seulement les insectes nuisibles, mais aussi ceux qui sont bénéfiques, ce qui a pour résultat de réduire tant la diversité des espèces que la capacité du riz à lutter contre les attaques d'autres parasites. Un autre problème inévitable relatif à l'utilisation abondante d'insecticides est le développement de résistance chez les insectes.

Malgré l'usage restreint d'un certain nombre d'insecticides comme l'endosulfan, le méthylparathion, le méthamidophos, le carbofuran et le benfuracarb, de nombreux fermiers du

Tableau 4 : Insecticides, herbicides et fongicides utilisés dans le delta du Mékong (Nguyen Huu Dung et Tran Thi Thanh Dung, 1997).

Insecticides		Herbicides	Fongicides
Groupe	Agent actif	Agent actif	Agent actif
Organochlorés	Endosulfan	Paraquat	Tricyclazole
Organophosphorés	Diazinon	Butachlor+Propanil	Propiconazole
	Fenitrothion	MCPA+Fenxaprop-P ethyl+2,4D	Iprobenphos
	Methyl parathion	2,4 D	Copper Oxychloride
	Methamidophos	Propanil	Triadimenol
Carbamates	Fenobucarb	Metsulfuron Methy	Isoprothiolane
	Fenobucarb+Phenthoate	Butachlor	MAFA
	Carbofuran	Pyrazosulfuron Ethyl	Validamycine
	Benfuracarb	Metsulfuron Methyl+Bensulfuron	Zineb
Pyréthroïdes	Alpha-cypermethrin	Pretilachlor	Hexacodazole
	Deltamethrin	Oxadiazon	Carbendazim
	Fenvalerate+Dimethoate	Fenxaprop-P-ethyl	Benomyl
	Lambda-cyhalothrin		Captan
	Cypermethrin		Zineb+Bordeaux+Benomyl
	Esfanvalerate		Mancozeb
Autres	Metaldéhyde		Benomyl
	Cartap		Thalide+Kasugamycin
	Fipronil		Pencycuron
	Buprofezin		Thiophanate-Methyl
	Etofenprox		Iprodione
			Validamycine

Tableau 5 : Les 20 principaux pesticides utilisés en riziculture et en rizipisciculture dans les provinces de Tien Giang et Can Tho en 1999 (Berg, 2001).

Insecticides	Herbicides	Fongicides
Fenobucarb	2,4 D	Validamycin A
Cartap hydrochloride	Pretilachlor, Fenclorim	Propiconazol
Lambdacyhalothrin	Fenoxaprop-P-Ethyl, 2,4	Hexaconazol
Deltamethrin	D, MCPA	Isoprothiolane
Buprofezin, Isoprocarb	Fenoxaprop-P-Ethyl	Iprodione
Alpha-cypermethrin	Pyrazosulfuron Ethyl	Cyprocozol
Fipronil	Butachlor, Propanil	
Etofenprox		

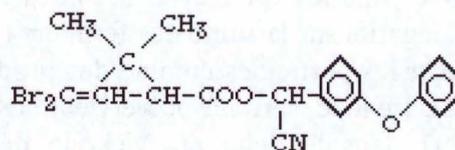


Figure 8 : Formule et structure chimique de la deltaméthrine (WHO, 1990).

delta du Mékong (3 % ; 4,5 % ; 19,1 % ; 3 % et 1 % respectivement) continuent à les employer. En plus des pesticides organochlorés, organophosphorés et des carbamates, environ 60 % des fermiers utilisent des insecticides appartenant au groupe des pyréthroïdes.

Un autre problème fréquent dans les rizières est la croissance de 'mauvaises' herbes. Les agriculteurs l'ont aisément résolue en les enlevant massivement à la main ou bien en appliquant des herbicides. Le 2,4-D, le butachlor et le fenxaprop-P-ethyl figurent parmi les herbicides les plus utilisés.

Un autre groupe de pesticides utilisé par les fermiers afin de contrôler les maladies est le groupe des fongicides. Les principaux fongicides employés sont le propiconazole, l'iprodione, la validamicine, et le zineb.

Quelques années plus tard, Berg (2001) identifie 64 pesticides différents dont 50 % d'insecticides, 25 % d'herbicides et 25 % de fongicides. Parmi les principaux insecticides utilisés figurent les pyréthroïdes (42 %) et les carbamates (23 %) (Tableau 5). Il a également démontré que les fermiers élevant des poissons dans leurs rizières utilisaient moins de pesticides que ceux cultivant uniquement du riz, les pesticides ayant un impact négatif sur la pisciculture.

De nombreux pesticides et autres produits chimiques sont utilisés dans les élevages de crevettes. La plupart des fermiers utilisent au moins une sorte de pesticide ou désinfectant dans leur élevage (Gräslund *et al.*, 2003). Certains pesticides employés, par exemple l'endosulfan, peuvent se retrouver dans les crevettes et poser des problèmes en terme de sécurité alimentaire (Reyes *et al.*, 1999). Parmi ces pesticides, on retrouve l'endosulfan, l'azinphos-éthyl, le diazinon, le dichlorvos, le malathion,.... Il est à noter que les pesticides organophosphorés sont largement utilisés en aquaculture suite à leur dégradation plus rapide que les organochlorés (Gräslund *et al.*, 2001).

2.4. Les pesticides étudiés

2.4.1. La deltaméthrine, un pyréthroïde

La deltaméthrine de la famille chimique des pyréthroïdes de synthèse, est une substance active présente dans certains insecticides. Le groupe des pyréthroïdes de synthèse est apparu récemment, au début des années 1970, même si la source naturelle de ce composé, le pyrèthre, est utilisée par l'homme depuis des siècles. Les pyréthroïdes synthétiques sont plus stables à la lumière que les autres groupes et possèdent une activité insecticide plus forte. La stabilité et l'efficacité des pyréthroïdes synthétiques expliquent leur utilisation de plus en plus répandue depuis 20 ans.

La deltaméthrine a été synthétisée en 1974 et commercialisée pour la première fois en 1977. Sur le plan chimique, c'est un ester de l'analogie dibromé de l'acide chrysanthémique (acide diméthyl-2,2(dimbromo-2,2 vinyl)-3 cyclopropanecarboxylique) (Br₂CA) et de l'alcool alpha-cyano-phénoxy-3 benzylique (Figure 8); plus précisément, c'est l'isomère [1R, cis; alpha S] parmi les huit stéréoisomères que compte cet ester (WHO, 1990).

Ce pyréthroïde se présente sous la forme d'une poudre blanche inodore dont le point de fusion est de 98 - 101 °C. Insoluble dans l'eau, il est en revanche soluble dans des solvants organiques tels que l'acétone, la cyclohexanone et le xylène. Il est stable à la lumière, à la chaleur et à l'air, mais instable en milieu alcalin.

On l'utilise essentiellement pour traiter le coton ainsi que pour les cultures telles que le café, le maïs, les céréales, les fruits, les légumes, le houblon et les produits stockés. On l'utilise aussi pour l'hygiène des animaux, la lutte contre les vecteurs ainsi qu'à des fins de santé publique.

Au niveau environnemental, la deltaméthrine disparaît dans le sol en 1 à 2 semaines et en une dizaine de jours sur la végétation (Exttoxnet, 1995)¹. Plusieurs études ont démontré que la deltaméthrine est facilement et rapidement dégradée dans le sol. Le temps de demi vie du composé dépend aussi bien de la nature du sol que de sa température. Il est compris entre 11 et 72 jours en condition aérobique. La dégradation de la deltaméthrine est plus lente en conditions anaérobique ou stérile, démontrant ainsi l'importance des microorganismes et autres processus biologiques (WHO, 1990).

La deltaméthrine ne se déplace pas dans l'environnement du fait qu'elle est fortement adsorbée sur les particules et possède donc une bonne résistance au lessivage en cas de fortes pluies.

Administrée par voie orale, ce composé lipophile est facilement absorbé par le tractus gastro-intestinal; l'absorption est moindre par la voie percutanée bien que sa vitesse dépende fortement du véhicule ou du solvant utilisé. Malgré son caractère lipophile, la deltaméthrine s'accumule peu dans les tissus riches en lipides car elle est rapidement métabolisée et excrétée (WHO, 1990 ; Soderlund *et al.*, 2002).

On a administré à des rats par voie orale, à raison de 0,64 à 1,60 mg/kg, de la deltaméthrine marquée au carbone-14 au niveau des fonctions acide, alcool et nitrile; le radiocarbone provenant de la fraction acide et de la fraction alcoolique a été complètement éliminé en l'espace de 2 à 4 jours (Ruzo *et al.*, 1978 in WHO, 1990). Les taux de résidus tissulaires étaient généralement faibles sauf dans les graisses où ils étaient un peu plus élevés. Cependant, le reste nitrile a été excrété plus lentement, le taux global de récupération étant de 79 % en huit jours. Les principales réactions métaboliques étaient l'oxydation (au niveau du méthyl- trans, du cycle cyclopropane et des positions 2', 4' et 5' du reste alcoolique), le clivage de l'ester et la conversion du nitrile en thiocyanate. Les acides carboxyliques et les phénols résultants étaient conjugués à l'acide sulfurique, à la glycine et à l'acide glucuronique.

La deltaméthrine est extrêmement toxique pour les poissons, la CL50 à 96 heures allant de 0,4 à 2,0 µg/litre (WHO, 1990). Cette toxicité élevée chez les poissons peut s'expliquer par un taux d'absorption branchial élevé suite au caractère lipophile du composé et par une déficience dans le système enzymatique des poissons à hydrolyser les pyréthroïdes (Viran *et al.*, 2003). Köprücü *et al.* (2006) ont observé une mortalité de 20 % chez des *fingerlings* du poisson chat *Silurus glanis* après une exposition de 96h à 0,50 µg/l de deltaméthrine et de 94 % après une heure d'exposition à 4 µg/l. De plus, des modifications du comportement (mouvements branchiaux rapides, nage irrégulière, immobilité dans le fond de l'aquarium, perte de l'équilibre et nage à la surface de l'eau) furent observés 20 minutes après une exposition à 0,75 ; 1 ; 2 ; 3 et 4 µg/l. Une mortalité progressive fut également observée par Ural et Saglam (2005) chez des fretins de truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss* exposés à des concentrations croissantes de deltaméthrine (0,50 à 12 µg/l). Cet insecticide a un effet défavorable sur la reproduction et le développement de la carpe *Cyprinus carpio* (Köprücü et Aydin, 2004) et est responsable de dommages histologiques au niveau des branchies et du foie de cette dernière (Cengiz, 2006a). De tels dommages ont également été rapportés dans les branchies, le foie et l'intestin du *mosquitofish* *Gambusia affinis* (Cengiz et Unlu, 2006b). Elle est également très toxique pour les invertébrés aquatiques; pour la daphnie, la CL50 à 48 heures est de 5 µg/litre. On a observé sur le terrain une certaine mortalité parmi les invertébrés aquatiques mais les populations se reconstituent généralement assez vite. Au laboratoire, la deltaméthrine est toxique pour l'abeille, avec une DL50 de 0,051 µg/abeille (WHO 1990). Chez l'abeille *Apis mellifera*, les études faites sur les effets sublétaux de cet insecticide concerne principalement la diminution de la capacité d'orientation (Vandame *et al.*, 1995).

¹ <http://exttoxnet.orst.edu/pips/deltamet.htm>

La deltaméthrine appartient à la classe des pyréthroïdes de type II (présence du groupe cyan-3- phenoxybenzylique) et intervient au niveau du système nerveux en interférant avec les canaux sodium des membranes neuronales (Figure 9).

Les effets insecticides et toxiques de la deltaméthrine résultent de son action sur les échanges transmembranaires impliqués dans la neurotransmission. Elle prolonge l'influx de sodium entraînant ainsi un retard dans la fermeture des canaux sodium ce qui conduit à un état d'hyperexcitabilité cellulaire (Brown, 2005).

En plus de son action sur les canaux sodiques, elle agit sur les récepteurs GABAnergiques et modifie les réponses postsynaptiques à l'acétylcholine (Soderlund *et al.*, 2002).

2.4.2. L'endosulfan, un organochloré

L'endosulfan de la famille chimique des organochlorés cyclodiènes est une substance active présente dans certains insecticides et acaricides. Synthétisés et utilisés à partir des années 40, les pesticides organochlorés sont des composés organiques de synthèse obtenus par chloration de divers hydrocarbures insaturés. Les organochlorés sont aujourd'hui strictement interdits dans de nombreux pays industrialisés, certains depuis les années 70. En effet, les insectes ont rapidement développé une résistance contre ces molécules, et des doses considérables de ces pesticides ont alors été répandues afin d'effectuer des traitements efficaces des cultures. Difficilement biodégradables et fortement persistants dans l'environnement, ils restent encore aujourd'hui de redoutables polluants des sols et des milieux aquatiques.

L'endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-méthano-2,4,3-benzodioxathiepin 3-oxide) (Figure 10) se compose d'un mélange de deux isomères, l'isomère alpha et bêta. La proportion des ces deux isomères est variable, allant de 4 :1 à 7 :3 (WHO, 1984).

Ce composé organochloré se présente sous forme d'une substance cristalline brune avec une odeur de terpène. Son point de fusion est de 79-100°C. Il est peu soluble dans l'eau mais est soluble dans la plupart des solvants organiques comme le toluène et l'hexane.

On a commencé à utiliser cet insecticide au cours des années 1950. Même s'il peut aussi servir d'agent de conservation du bois, on l'utilise surtout pour protéger une grande variété de cultures alimentaires, notamment le thé, le café, les fruits et les légumes, ainsi que le riz, les céréales, le maïs, le sorgho, etc. Il est également utilisé pour contrôler les insectes dans les cultures non alimentaires telles que les cultures de tabac et de coton.

Les deux isomères sont assez résistants à la photolyse alors que les métabolites endosulfan sulfate et endosulfan diol y sont sensibles. La demi vie de l'endosulfan dans l'eau est estimée à 4 jours. Néanmoins, des conditions anaérobiques et/ou de faible pH peuvent allonger cette demi vie. Dans l'eau, l'endosulfan est principalement dégradé en endosulfan diol (WHO, 1984). Dans le sol, il est plus ou moins persistant avec une demi vie moyenne de 50 jours (Wauchope *et al.*, 1992 in Exttoxnet, 1996)². Les deux isomères ont des temps de dégradation différents dans le sol, l'isomère α se dissipant plus rapidement que l'isomère β . Ces deux isomères persisteront plus longtemps en condition acide. L'endosulfan sulfate est le principal produit de dégradation dans le sol.

L'endosulfan se volatilise facilement après application et peut être transporté à des endroits éloignés du point d'application³.

Il présente une solubilité dans l'eau (0,32 mg/l) supérieure à la majorité des autres organochlorés. Il n'a donc pas la même affinité pour les lipides. En conséquence, la

² <http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm>

³ <http://www.abcbirds.org/pesticides/Profiles/endosulfan.htm>

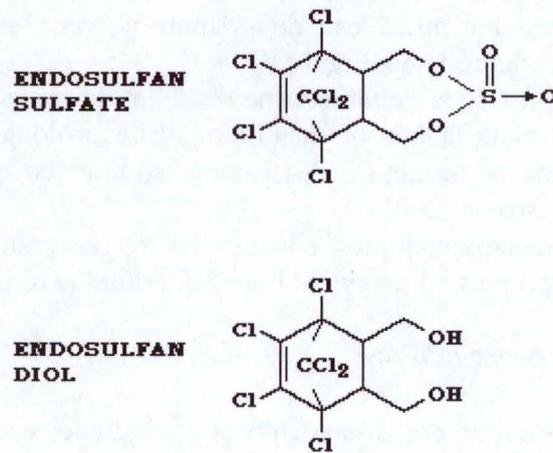


Figure 11 : Principaux métabolites de l'endosulfan (WHO, 1984).

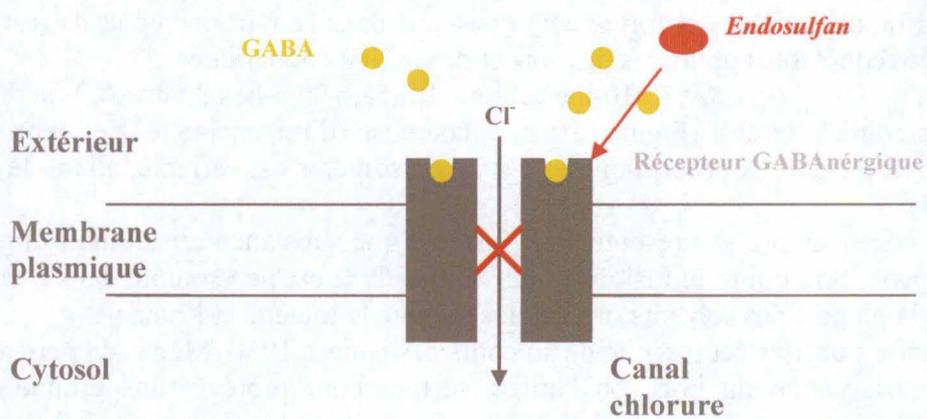


Figure 12 : Action de l'endosulfan sur les récepteurs GABAnergiques.
(GABA: acide gamma-aminobutyric; Cl⁻ : ion chlorure).

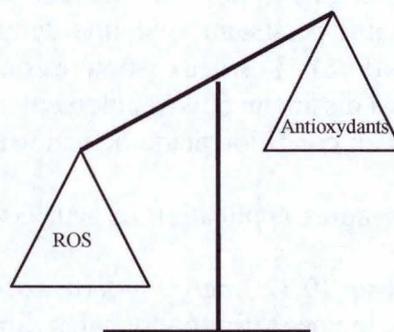


Figure 13 : Déséquilibre de la balance entre antioxydants et prooxydants (ROS : espèces réactives à l'oxygène).

bioamplification et l'accumulation de l'endosulfan dans la chaîne alimentaire sont peu courantes. La réponse typique des organismes exposés à des concentrations non létales d'endosulfan est d'accumuler le composé jusqu'à atteindre un plateau et ensuite, lorsque la source de contamination s'éloigne, d'éliminer les résidus assez rapidement (WHO, 1984).

Ce xénobiotique peut être absorbé par ingestion, inhalation et par contact cutané. Suite à une administration orale ou parentérale, l'endosulfan est rapidement excrété via les fèces et les urines. Les principaux métabolites sont l'endosulfan sulfate et diol (Figure 11).

Les valeurs de DL50 varient fortement selon le mode d'administration, l'espèce, le véhicule et le sexe. Chez le rat, les valeurs de DL50 par voie orale vont de 18 à 355 mg/kg. Les signes cliniques d'intoxication aiguë comprennent des manifestations neurologiques telles que l'hyperactivité, la contraction musculaire, la convulsion et parfois la mort.

L'endosulfan est fortement toxique pour certaines espèces aquatiques, principalement pour les poissons (CL50 à 96 heures allant de 0,67 à 4,8 µg/l) (Exttoxnet, 1996)⁴. Chez la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*, les CL50 à 24h, 48h, 72h et 96h sont de 19,78 ; 8,89 ; 5,28 et 1,75 µg/l respectivement. Les premiers poissons meurent 4h après une exposition à 26,3 µg/l d'endosulfan. Néanmoins, la survie des poissons augmente significativement avec un accroissement de la taille des individus. Des lésions au niveau des branchies, des reins et du foie sont également observées (Capkin *et al.*, 2005). Il est à noter que la qualité de l'eau, alcalinité et température, modifie la toxicité de l'endosulfan envers la truite arc-en-ciel. Il est également toxique pour les invertébrés aquatiques. Les crustacés sont particulièrement sensibles à l'endosulfan. L'espèce la plus sensible semble être la crevette rose, *Penaeus duorarum*, avec une CL50 à 96h de 0,04 µg/l (Schimmel *et al.*, 1977 in Wirth *et al.* 2001). Pour *Palaemonetes pugio*, une CL50 de 1,31 µg/l en condition de laboratoire est rapportée alors qu'*in situ*, la CL50 est de 0,25 µg/l (Scott *et al.*, 1992 in Wirth *et al.* 2001). Wirth *et al.* (2001) ont déterminé une CL50 à 96h de 0,92 µg/l pour des mâles et de 1,99 µg/l pour des femelles de crevettes *Palaemonetes pugio*, les mâles étant dès lors deux fois plus sensibles à l'endosulfan que les femelles. Ils ont également observé un léger retard de l'éclosion des œufs entre ceux de femelles non exposées (8,76 jours) et ceux de femelles exposées à 200 ng/l d'endosulfan (9,72 jours). Un an plus tard, ils ont observé une diminution de 31 % et 39 % du nombre de femelles gravides après une exposition de 43 jours, respectivement, à 200 ng/l et 400 ng/l d'endosulfan (Wirth *et al.*, 2002). Lombardi *et al.* (2001) ont déterminé une CL50 à 24h allant de 1,64 à 2,08 µg/l et une CL50 à 96h allant de 0,20 à 0,93 µg/l chez la crevette d'eau douce *Macrobrachium rosenbergii*.

Cet insecticide, composé cyclodiène, est un antagoniste du neurotransmetteur GABA (acide gamma amino butyrique). La fixation de GABA sur son récepteur provoque l'ouverture d'un canal chlorure, qui, laissant passer les ions Cl⁻, produit l'hyperpolarisation de la cellule cible (Figure 12). Les récepteurs GABA sont majoritairement postsynaptiques ; leur activation est responsable de potentiels postsynaptiques inhibiteurs classiques. Ainsi, la liaison de GABA sur les récepteurs GABAergiques entraîne une inhibition de la neurotransmission.

L'endosulfan agit sur les canaux chlorures en inhibant les récepteurs GABAergiques. La liaison de l'endosulfan au récepteur interdit l'influx des ions chlore et bloque la fonction inhibitrice de ce type de récepteur. Le résultat final consiste en une stimulation du système nerveux (Brown, 2005).

3. Notion de stress oxydant

Le stress oxydant a été défini par Sies (1991) comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et est source d'effets toxiques potentiels

⁴ <http://exttoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm>

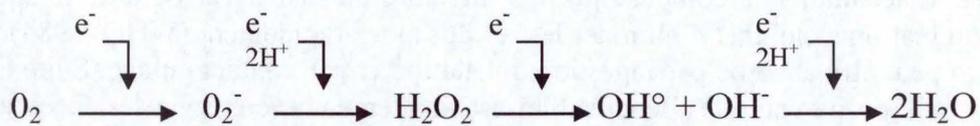


Figure 14 : Réduction de l'oxygène moléculaire O_2 en eau H_2O (Nordberg *et al.*, 2001, Scandalios, 2002).
 O_2 : oxygène moléculaire ; O_2^- : anion superoxyde ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; OH^\bullet : radical hydroxyle ;
 H_2O : eau ; e^- : électron ; H^+ : proton

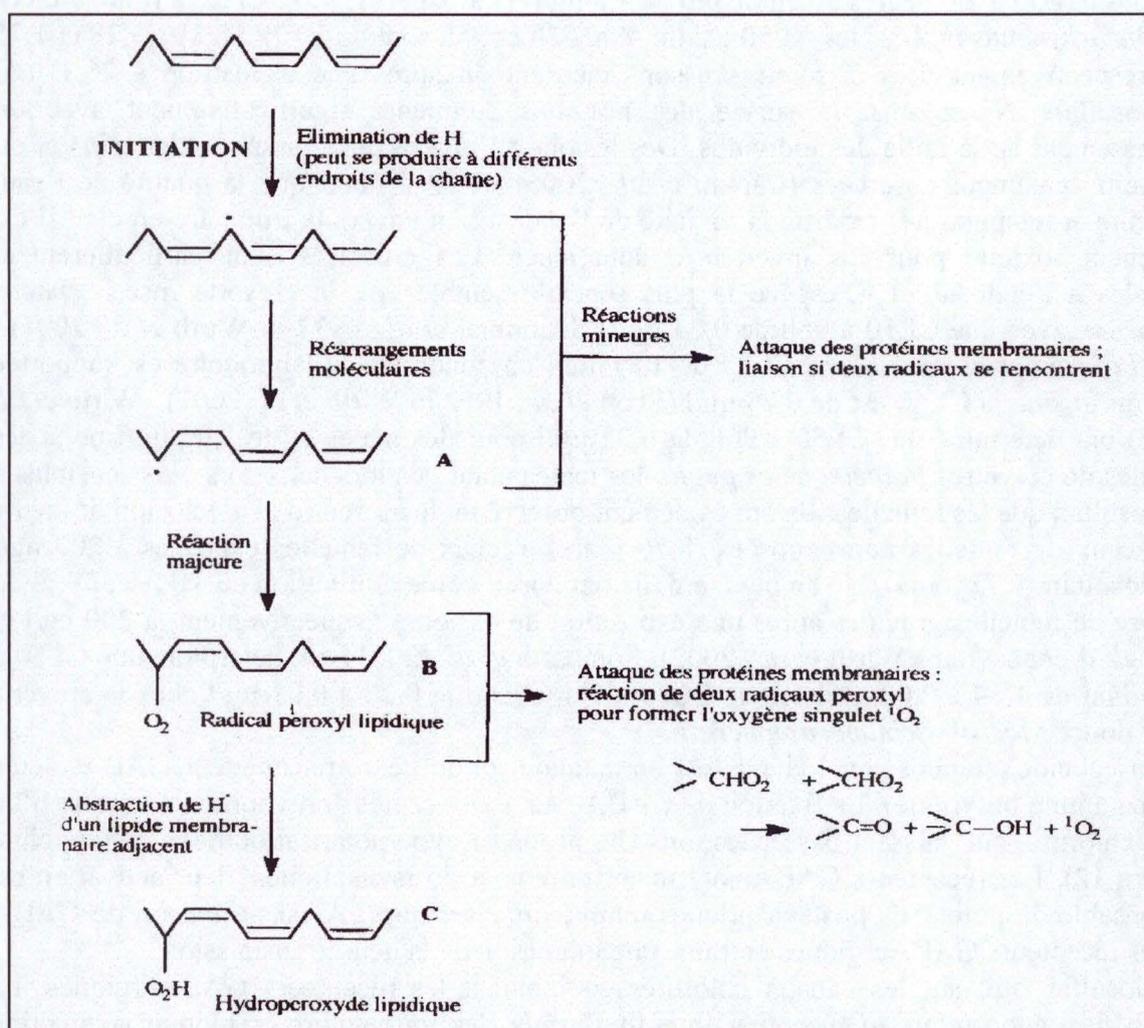


Figure 15 : Mécanisme de la lipoperoxydation (d'après Gutteridge et Halliwell, 1990 dans Lagadic *et al.*, 1997)
 La peroxydation des lipides membranaires peut être initiée par l'attaque des acides gras insaturés des phospholipides par toute molécule suffisamment réactive pour leur arracher un atome d'hydrogène d'une double liaison. Le départ de l'hydrogène, entité à un électron, laisse un carbone avec un électron impair. Ce radical carboné des acides gras polyinsaturés tend à se stabiliser par réarrangement interne en donnant un diène conjugué qui réagira avec O_2 pour donner un radical hydroperoxyl.

(Figure 13). Pour Halliwell (1987), le stress oxydant implique la production d'espèces réactives de l'oxygène et est synonyme de dommages (Sies, 1991 et Halliwell, 1987 dans Lagadic *et al.*, 1997).

Le stress oxydant est susceptible d'être provoqué par des polluants, des variations environnementales ainsi que des facteurs endogènes notamment des taux élevés en acide gras polyinsaturés et teneurs élevées en oxygène. Cependant beaucoup d'organismes semblent dotés de systèmes antioxydants qui se mettent en activité lors d'un stress oxydant. Plusieurs travaux ont montré que des activités antioxydantes sont induites par des polluants organiques (HAP, PCB, pesticides...) ou des métaux lourds (Pellerin, 2005a). Ce stress a aussi des effets mutagènes et de peroxydation lipidique.

3.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Le terme d'espèces réactives de l'oxygène (appelées ROS) inclut les différentes formes actives de l'oxygène et les hydroperoxydes, ainsi que les espèces radicalaires. Les espèces radicalaires sont des atomes ou des molécules présentant un ou plusieurs électrons célibataires. Ces électrons sont facteurs d'instabilité et de réactivité, l'espèce radicalaire ayant tendance, soit à capter un électron d'une autre molécule pour appairier son électron célibataire, soit à céder ce dernier.

Les ROS sont formées à la suite de réactions impliquant l'oxygène moléculaire, O_2 . Fondamentalement, ce dernier est un biradical avec deux électrons non appariés de spins parallèles sur son orbite externe. Une telle configuration est très stable car elle prévient l'addition d'une paire d'électrons. Cependant, lorsque la molécule acquiert assez d'énergie, elle peut facilement se trouver un électron supplémentaire. Il s'ensuivra alors toute une suite de réactions (Figure 14).

L'oxygène peut se présenter sous des formes plus ou moins réactives (Lagadic *et al.*, 1997) :

- L'oxygène singulet 1O_2 : par sa durée de vie relativement longue et son caractère diffusible, peut être responsable de graves dommages cellulaires en particulier à l'ADN.
- L'anion superoxyde O_2^- : résulte de la capture d'un électron par la molécule d' O_2 lors de réactions endergoniques. Il est formé dans plusieurs processus physiologiques, par exemple chez les animaux par des cellules phagocytaires pour la destruction des particules étrangères. Très stable en milieu hydrophobe, l'anion superoxyde contribue à la destruction des phospholipides membranaires par attaque nucléophile des liaisons esters entre les acides gras et le glycérol. Il se dismute en donnant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; cette réaction de dismutation est fortement accélérée en présence d'enzymes particulières, les superoxydes dismutases (Nordberg et Arnér, 2001).
- Le peroxyde d'hydrogène, H_2O_2 : est formé par dismutation de l'anion superoxyde et par addition d'un second électron sur l'anion superoxyde en donnant l'ion peroxyde O_2^{2-} . Cet ion, qui n'est pas un radical, est protoné immédiatement en H_2O_2 dans les conditions de pH physiologique. Il est modérément réactif mais est très diffusible et franchit les barrières membranaires (Nordberg et Arnér, 2001).
- Le radical hydroxyle OH^\bullet : est très réactif et réagit avec les premières cibles rencontrées. Il peut attaquer tous les types de constituants cellulaires.
- Les hydroperoxy radicaux : sont produits lors de la lipoperoxydation. Ainsi formés, ils pourront eux-mêmes arracher l'hydrogène d'autres molécules lipidiques, qui radicalisées à leur tour, réagiront de proche en proche et propageront le processus de la lipoperoxydation (Figure 15).

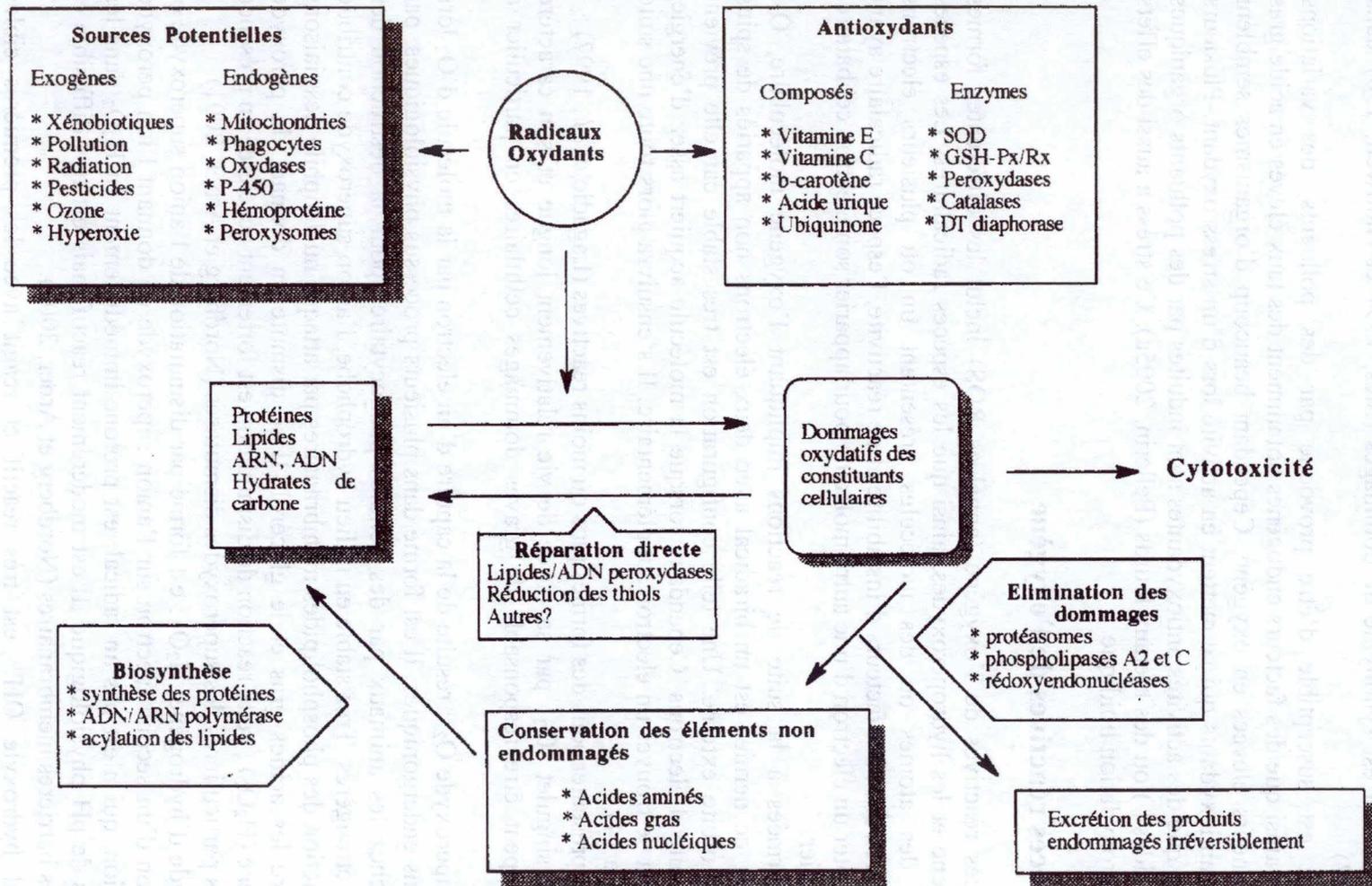


Figure 16 : Principaux effets biologiques des espèces réactives et systèmes de défense antioxydants (Lagadic *et al.*, 1997).

Ces ROS sont produites par divers mécanismes physiologiques car elles sont utiles pour l'organisme à des doses raisonnables (Scandalios, 2002). En effet, les réactions radicalaires jouent un rôle important dans les systèmes biologiques car elles interviennent dans les réactions métaboliques normales et dans la production d'énergie. Dans d'autres cas, la formation d'espèces réactives est consécutive à la métabolisation de substances exogènes et à l'autooxydation spontanée des métabolites réduits (Livingstone, 2001).

Dans les systèmes biologiques, les espèces réactives, lorsqu'elles sont générées en des quantités qui excèdent les capacités des systèmes de protection et de réparation, peuvent attaquer les constituants cellulaires (protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques) et entraîner une destruction et un dysfonctionnement des systèmes au niveau desquels ils interviennent (Figure 16).

Les protéines sont très sensibles à l'attaque des radicaux libres. Ces derniers, à taux élevés, engendrent des modifications réversibles et irréversibles au sein de protéines spécifiques. Parmi ces modifications, on retrouve la fragmentation du peptide, le 'pontage' entre protéines, la modification de certains acides aminés ou encore l'oxydation d'acides aminés (Berlett et Stadtman, 1997 ; Conrad *et al.*, 2000).

Les acides aminés les plus sensibles à l'oxydation sont les acides aminés sulfurés (cystéine et méthionine) mais ils sont les seuls pour lesquels les produits d'oxydation peuvent être réparés via de systèmes enzymatiques spécifiques (Mary *et al.*, 2004). Les protéines modifiées par oxydation perdent leurs propriétés biologiques et deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et notamment du protéasome (Mary *et al.*, 2004).

Les acides aminés de la chaîne latérale peuvent être modifiés irréversiblement en cétones ou en aldéhydes engendrant ainsi l'agrégation, l'inactivation ou la dégradation de la protéine. Ce processus est appelé la carbonylation (McDonagh *et al.*, 2005). Il existe une corrélation entre l'augmentation du nombre de groupements carbonyles d'une protéine et l'importance des dommages causés par le stress oxydant sur cette même protéine (Conrad *et al.*, 2001). Les groupements carbonyles peuvent être introduits à divers endroits via différents mécanismes. La carbonylation des protéines peut se faire via oxydation directe du squelette de la protéine engendrant la formation de fragments protéiques; via oxydation de certains acides aminés (histidines, arginines et lysines) de la chaîne latérale en cétones ou en aldéhydes; par réaction avec des produits de la peroxydation des lipides ou encore par conjugaison soit avec des sucres réducteurs soit avec les produits d'oxydation de ces sucres (Ghezzi *et al.*, 2003).

Le contenu en groupements carbonyles est souvent utilisé pour quantifier l'oxydation des protéines. La réaction du groupement carbonyle avec le DNPH (2,4-dinitrophenylhydrazine) engendre la formation d'une hydrazone liée à une protéine. Cette hydrazone peut être détectée par une réaction immunospécifique (Talent *et al.*, 1998).

3.2. Les systèmes de défense antioxydants

Pour se protéger contre l'effet toxique de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense qui permettent de réguler la production des ROS.

3.2.1. Système enzymatique

Une des stratégies utilisées est de nature enzymatique et vise à détruire les superoxydes et les peroxydes. Trois types d'enzymes antioxydantes majeures sont mis en œuvre pour la destruction des espèces réactives de l'oxygène : les superoxyde dismutases (SOD), les peroxydases et les catalases (Figure 17).

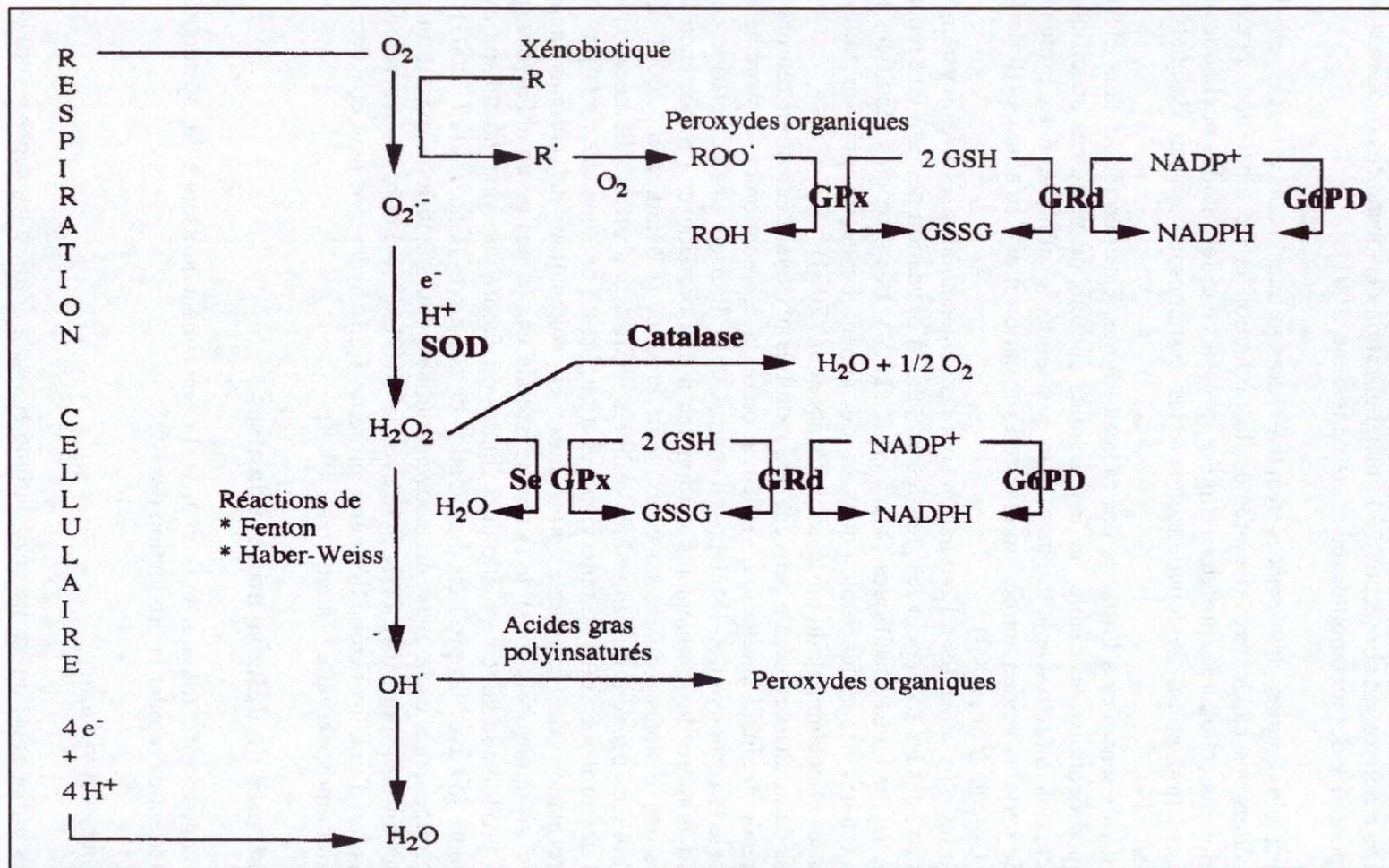


Figure 17 : Intervention des systèmes antioxydants dans la neutralisation des espèces réactives d'origine exogène et endogène dans les cellules animales (Lagadic *et al.*, 1997).

Ainsi, les superoxydes dismutases (SOD) sont capables d'éliminer l'anion superoxyde par réaction de dismutation, formant avec deux superoxydes une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène. Elles comportent un métal de transition (Fe, Mn ou Cu) au niveau de leur site actif. Dans la réaction de dismutation, l'ion métallique capte un électron de l'anion superoxyde et le transfère au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif. La nature de l'ion métallique permettra de distinguer les superoxydes dismutases à manganèse (MnSOD) protégeant la mitochondrie, les superoxydes dismutases à cuivre-zinc (CuZn-SOD) présentes dans le compartiment cytosolique et détectées dans les peroxysomes, les lysosomes et le noyau des cellules eucaryotes et les superoxydes dismutases à fer (Fe-SOD).

Les principales enzymes capables de détruire le peroxyde d'hydrogène sont les glutathions peroxydases et les catalases. Les glutathions peroxydases sélénium-dépendante catalysent la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes, allant du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques. Il existe également une glutathion peroxydase sélénium-indépendante qui ne peut réduire que les peroxydes organiques (Arun *et al*, 1998).

Le maintien d'une activité glutathion peroxydasique implique le recyclage NADPH-dépendant du glutathion réduit (GSH) par une glutathion réductase, le NADPH étant produit par la voie des pentoses phosphates.

Certaines enzymes comme la glucose 6-phosphate déshydrogénase catalysent des réactions impliquant la réduction du NADP⁺ et interviennent elles aussi dans le maintien d'un système de défense cellulaire efficace. La G6PDH régénère le NADP⁺ formé par la GR en NADPH via la première étape de la voie des pentoses phosphates.

La catalase est une hémoprotéine tétramérique avec un atome de fer par sous unité. Chez les animaux, sa localisation peroxysomale en fait une enzyme antioxydante complémentaire de la SeGPx contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène. Chez *Panaeus vannamei*, Tavares- Sánchez *et al.* (2004) ont confirmé sa localisation peroxysomale et ont montré que le taux d'ARN messenger pour la catalase est plus élevé dans l'hépatopancréas que dans les branchies et est non détectable dans les muscles.

3.2.2. Système non enzymatique

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

Des composés comme l' α -tocophérol (vitamine E), l'acide ascorbique (vitamine C), le β -carotène (vitamine A) et l'ubiquinol existent au sein de membranes biologiques et agissent en piégeant les espèces radicalaires dès leur formation, en interrompant les réactions en chaîne et en empêchant la lipoperoxydation. Ce type d'antioxydant est appelé piègeur ou éboueurs (*scavenger*). De plus, il existe des composés endogènes synthétisés par les cellules et jouant le même rôle ; le plus important est le glutathion. Il s'agit du thiol le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules. Il agit comme donneur d'électrons permettant de désactiver les espèces réactives mais surtout comme substrat des glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes. Il intervient aussi dans la conjugaison des substances électrophiles, laquelle est catalysée par des glutathion-transférases (van der Oost *et al.*, 2002).

Un stress oxydant pourra être induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse.

3.2.3. Etude des systèmes antioxydants chez différentes espèces de crevettes

Les systèmes de défense antioxydants semblent bien plus importants chez les invertébrés que chez les vertébrés. En effet, les invertébrés ne possèdent pas de système immunitaire spécifique et la lutte contre les micro-organismes se réalise essentiellement via la phagocytose. Or, la phagocytose est associée à une production d'espèces réactives de l'oxygène (Tavarez- Sánchez *et al.*, 2004).

De nombreuses études existent sur les systèmes antioxydants chez les vertébrés et invertébrés mais peu ont été menées chez les crevettes.

Les œufs et larves des organismes aquatiques sont fragiles et très sensibles aux changements environnementaux. De ce fait, ils devraient posséder des mécanismes intrinsèques pour surmonter ces changements. Un des plus importants systèmes de défense est le système antioxydant, comprenant enzymes et 'éboueurs' de faibles poids moléculaires. Arun et Subramanian (1998) ont montré que le passage de la vie embryonnaire à la vie adulte chez la crevette d'eau douce, *Macrobrachium malcolmsonii*, s'accompagne d'une augmentation progressive des activités enzymatiques SOD, CAT, GST et GPx. Ils ont également analysé l'activité de ces enzymes dans l'hépatopancréas, les branchies et les muscles chez des sub-adultes. De cette analyse, il ressort une activité nettement supérieure au niveau de l'hépatopancréas. Ce résultat est en accord avec l'idée selon laquelle l'hépatopancréas est le principal centre de production de ROS chez les crustacés. Un an plus tard, Rudneva (1999) a également mis en évidence la présence d'enzymes antioxydantes dans des œufs de mollusques, crustacés, élasmodermes et téléostéens de la Mer Noire ainsi qu'une augmentation de leur activité durant le développement embryonnaire et larvaire. Quelques années plus tard, Dandapat *et al.* (2003) ont tenté de quantifier le stress oxydant durant le développement larvaire chez la crevette géante d'eau douce, *Macrobrachium rosenbergii*. La comparaison des teneurs en TBA (acide thiobarbiturique) à différents stades du développement indique que les stades zoé I et II font face à un stress oxydant important. Cela peut être aussi bien dû à l'exposition directe de ces larves à l'oxygène ambiant de l'eau qu'à leur faible potentiel antioxydant. Cependant, durant la progression larvaire, le stress oxydant est atténué suite à une augmentation des systèmes antioxydants.

De l'étude de Dandapat *et al.* (2000), il ressort que l'administration de vitamine E réduit le niveau de peroxydation lipidique et module l'activité des systèmes antioxydants chez la crevette géante d'eau douce, *Macrobrachium rosenbergii*. Néanmoins, la réponse à cette administration dépend considérablement du tissu considéré.

Une étude réalisée par Mourente et Diaz-Salvago (1999) a permis de montrer des différences au niveau des systèmes antioxydants et du statut oxydant dans le cerveau d'*Aristeus antennatus* selon différentes classes de taille. Ils ont observé que le niveau de vitamine E dans le cerveau ne montre pas de différence entre les différentes classes d'âge et présente une protection antioxydante suffisante des membranes lipidiques. Dès lors, ils ont conclu que l'accumulation de dommages oxydatifs avec l'âge est plutôt due à une augmentation des taux d'oxydants qu'à une diminution des défenses antioxydantes.

3.3. Les biomarqueurs du stress oxydant chez les organismes aquatiques

3.3.1. Introduction générale

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic *et al.* 1997). Selon Cajarville *et al.* (2000), un biomarqueur peut être défini comme un indicateur à

Tableau 6 : Réponse des systèmes antioxydants d'organismes aquatiques à différents contaminants de l'environnement.

Espèce étudiée	Conditions d'exposition	Effets observés	Références
<i>Wallago attu</i>	Poissons récoltés dans deux sites (Panipat et Agra) localisés le long de la rivière Yamuna en Inde. Panipat est confronté à une activité industrielle et agricole intense. Agra est considéré comme site de référence.	Les différents biomarqueurs du stress oxydant étudiés (SOD, GR, G6PDH, GSH et LPO) sont tous plus élevés chez les poissons du site Panipat. Réponse variable de l'activité des enzymes GPx et CAT : <ul style="list-style-type: none"> • Activité GPx élevée dans les branchies et les reins des poissons collectés au site Panipat mais activité GPx faible dans le foie des poissons de Panipat comparé à ceux du site Agra. • Activité CAT plus faible dans les trois organes des poissons du site Panipat. 	Pandey <i>et al.</i> , 2003
<i>Oreochromis niloticus</i>	Poissons récoltés dans un site pollué recevant les effluents domestiques et industriels de la métropole de Sao Paulo. Des poissons d'élevage sont utilisés comme groupe de référence.	<p>Dans les érythrocytes des poissons :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité de la SOD (125 %), de l'activité de la GPx (62 %) et de l'activité de la G6PDH (135 %), • Diminution de 17 % de l'activité de la CAT et de 78 % du contenu en GSH. <p>Dans les branchies des poissons :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pas de différence dans l'activité des enzymes SOD, GPx et GR ainsi que du contenu en GSH, • Diminution de l'activité de la CAT et de la G6PDH de respectivement 17 et 61 %. <p>Dans le foie des poissons :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de 242 % de l'activité de la SOD, • Diminution de l'activité de la CAT, GPx, GR, G6DH et du contenu en GSH. <p>Dans les reins de poissons :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de 137 % de l'activité de la SOD, • Diminution de l'activité des enzymes CAT (70 %), GR (21 %) et G6PDH (39 %) et du contenu en GSH (91 %), • Pas de changement de l'activité de la GPx. 	Bainy <i>et al.</i> , 1996
<i>Heteropneustes fossilis</i>	Poissons exposés à 0,5, 1 et 2 % d'effluents d'usine à papier pendant 15, 30, 60 et 90 jours.	Activation des phagocytes (« respiratory burst ») associée à une augmentation de la LPO. Les reins et les branchies sont les tissus les plus atteints.	Fatima <i>et al.</i> , 2000

court terme d'effets biologiques à long terme. Il est classique, en écotoxicologie, de distinguer trois types de biomarqueurs : les biomarqueurs d'exposition à un xénobiotique, les biomarqueurs d'effets de l'exposition et les biomarqueurs de sensibilité aux effets provoqués par l'exposition.

Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, ils sont le résultat de l'interaction du polluant avec des molécules biologiques dans des tissus et/ou dans des liquides corporels.

Les biomarqueurs d'effets permettent de montrer que le xénobiotique est entré dans l'organisme et qu'après avoir été distribué entre les différents tissus, il a exercé un effet, toxique ou non, sur une cible critique.

Les biomarqueurs de sensibilité traduisent les variations d'origine génétique de la sensibilité. Cette variation peut être une diminution de la sensibilité. Elle est alors appelée résistance.

Le biomarqueur est un outil de gestion environnemental qui complète les méthodes d'analyses traditionnelles. Il permet le suivi de la qualité des milieux et l'état de santé des individus dans le temps et dans l'espace en évaluant les polluants biodisponibles et leurs effets (Pellerin, 2005b). En aquaculture, l'utilisation de biomarqueurs permet d'évaluer l'état de santé et/ou de stress des individus cultivés. On peut ainsi s'assurer du bien-être des individus et optimiser la production aquacole. De plus, ils donnent une vue d'ensemble de l'emploi des produits chimiques utilisés dans les élevages aquacoles.

Les biomarqueurs étant nombreux, voici quelques-uns parmi les plus utilisés de nos jours : l'induction des monooxygénases à cytochrome P450, l'induction de métallothionéines, l'inhibition de l'acétylcholinestérase, les enzymes du stress oxydant, les atteintes cytologiques et histologiques et les protéines de stress.

Plusieurs auteurs ont proposé l'emploi des biomarqueurs du stress oxydant dans les programmes de surveillance de la qualité des milieux aquatiques. De plus, Pandey *et al.* (2003) ont démontré que les antioxydants enzymatiques et non enzymatiques peuvent être d'utiles biomarqueurs de pollution. En effet, plusieurs études menées sur deux espèces de poissons d'eau douce, *Chana punctatus* Bloch et *Heteropneustes fossilis* Bloch, ont montré l'existence d'une corrélation entre l'exposition à deux polluants (endosulfan et effluent d'usine à papier) et la réponse de biomarqueurs du stress oxydant (Fatima *et al.*, 2000 ; Ahmad *et al.*, 2000 ; Pandey *et al.*, 2001). La carbonylation des protéines en tant que biomarqueur du stress oxydant a également été utilisée en laboratoire afin d'évaluer les effets toxiques de la deltaméthrine, de l'endosulfan et du paraquat sur le poisson d'eau douce *Channa punctatus* (Parvez et Raisuddin, 2005).

3.3.2. Réponses des animaux aquatiques au stress oxydant induit par divers contaminants de l'environnement

La réponse des systèmes antioxydants des organismes aquatiques aux polluants a été étudiée expérimentalement et *in situ*. Plusieurs études publiées dans la littérature sont regroupées dans le tableau 6 avec un rappel des conditions d'exposition, des paramètres contrôlés et des effets observés.

De l'ensemble de ces travaux, il ressort que les activités antioxydantes sont en général modifiées en présence de polluants, les changements d'activités pouvant être transitoires, accompagnées ou non d'effets de lipoperoxydation et qu'elles sont variables selon les espèces.

Les réponses des activités enzymatiques, SOD et catalase, présentent souvent des profils parallèles. Elles ont été observées en présence de sédiments contaminés par des HAPs et des PCBs (Di Giulio *et al.*, 1993 ; Solé *et al.*, 1995).

<i>Channa punctatus</i>	Poissons exposés à 1 % d'effluents d'usine à papier pendant 15, 30, 60 et 90 jours.	Induction et suppression de l'activité des enzymes antioxydantes et du contenu en GSH dans le foie, les branchies et les reins : Dans le foie : <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité de la GPx et de la GST jusqu'au 90^{ème} jour. • Diminution de l'activité de la CAT aux jours 15 et 30 mais augmentation de cette dernière aux jours 60 et 90. • Augmentation du contenu en GSH jusqu'au 90^{ème} jour. • Pas de changement de la concentration en TBARS. Dans les branchies et les reins : <ul style="list-style-type: none"> • Diminution de l'activité de la GPx, de la CAT, de la GST et du contenu en GSH jusqu'au jour 90. • Augmentation de la concentration en TBARS. 	Ahmad <i>et al.</i> , 2000
<i>Scylla serrata</i>	Crabes femelles traitées avec 100 mg/l de naphthalène pendant 96h.	Augmentation significative de la LPO dans l'hépatopancréas, l'hémolymphe et les ovaires. Diminution de l'activité des enzymes SOD, CAT et GPx, et du contenu des antioxydants non enzymatiques, vitamine C, E et glutathion, dans les trois tissus étudiés.	Vijayavel <i>et al.</i> , 2004
<i>Carassius auratus</i>	Poissons exposés à six différentes concentrations de 2,4-DCP pendant 40 jours. Groupe 1 : contrôle ; groupe 2 : 0,005 mg/l ; groupe 3 : 0,01 mg/l ; groupe 4 : 0,05 mg/l ; groupe 5 : 0,1 mg/l ; groupe 6 : 0,5 mg/l et groupe 7 : 1,0 mg/l L'organe d'intérêt dans cette étude est le foie.	Augmentation significative de l'activité des enzymes CAT et GPx dans tous les groupes. Augmentation de l'activité de la SOD dans le groupe 2 suivie d'une diminution progressive dans les groupes 3 à 7. Diminution de l'activité de la GR dans les groupes 2 et 3 suivie d'un retour à la normal dans le groupe 4. Augmentation significative de l'activité de la GST dans les groupes 3 et 4. Diminution significative du contenu en GSH dans les groupes 2 à 6.	Zhang <i>et al.</i> , 2004
<i>Chasmagnathus granulatus</i>	Crabes adultes mâles traités avec des extraits de <i>Microcystis aeruginosa</i> (39,2 µg/l) à intervalle de 24h pendant 48h.	Augmentation de l'activité de la GST dans les branchies postérieures des crabes traités. Pas de changement de la LPO dans les branchies antérieures et postérieures des crabes traités.	Vinagre <i>et al.</i> , 2003

LPO : lipoperoxydation ; GSH : glutathion réduit ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; GPx : glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase ; GST : glutathion S-transférase ; G6PDH : glucose -6-phosphate déshydrogénase ; TBARS : Thiobarbituric Acid Reactive Substance ; 2,4-DCP : 2,4-dichlorophénol.

Cependant, une telle relation n'est pas observée dans l'étude de Pandey *et al.* (2003). Celle-ci compare les réponses de divers biomarqueurs du stress oxydant de poissons d'eau douce *Wallago attu* récoltés dans un milieu pollué avec des individus provenant d'un site de référence. L'activité de la SOD enregistrée chez les individus du milieu pollué était élevée en comparaison à celle de la CAT. Cette activité de la SOD élevée se traduit par une production importante d'anions superoxydes, qui en excès sont reconnus pour inhiber l'activité de la CAT.

L'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes en réponse à l'exposition aux contaminants de l'environnement n'est pas un phénomène constant. Ainsi, une inhibition des SOD et catalase a été enregistrée chez des carpes exposées en laboratoire à des concentrations élevées en cuivre (25 mg/l) et en zinc (10 mg/l) (Radi et Matkovios, 1988). Cependant, l'activité de la glutathion peroxydase était au contraire augmentée, la lipoperoxydation étant de plus très élevée dans le cas des intoxications par le cuivre. Ces résultats peuvent s'expliquer par une production importante de H₂O₂ capable de stimuler les glutathion peroxydases mais aussi d'inhiber les SOD et les catalases. Ils indiquent aussi, d'une part, que la réponse des activités glutathion peroxydasiques ne va pas toujours dans le même sens que celles des deux enzymes précédentes et, d'autre part, que l'activation de la glutathion peroxydase ne suffit pas à empêcher la lipoperoxydation.

Dans certains cas, une augmentation parallèle des activités glutathion peroxydasique, catalase et SOD peut être observée, comme cela a été noté chez le bivalve marin *Mytilus galloprovincialis* contaminé par des HAP et des PCB (Solé *et al.*, 1995).

La lipoperoxydation n'exclut pas l'induction des activités antioxydantes mais elle traduit leur inefficacité à faire face au stress. Un taux en MDA (malondialdéhyde) élevé a été observé chez la moule *Mytilus edulis* lors d'exposition au CCl₄ et à la ménadione (Ribera *et al.*, 1991), chez la moule *Unio tumidus* lors d'exposition au cuivre (Doyotte *et al.*, 1997) et chez des poissons exposés à des sédiments contaminés (Di Giulio *et al.*, 1993 ; Livingstone *et al.*, 1993 in Doyotte *et al.*, 1997).

4. Les pesticides en tant qu'inducteur d'un stress oxydant

De nombreuses études ont mis en évidence l'induction d'un stress oxydant chez différentes espèces suite à une contamination par des pesticides. Nous avons regroupé quelques-uns de ces travaux dans le tableau 7.

En général, il ressort que les pesticides sont responsables d'une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation des concentrations en TBARS et MDA) et que les paramètres antioxydants sont en général modifiés (Mohammad *et al.*, 2004). Cependant, les réponses observées peuvent être transitoires et variables d'une espèce à l'autre. De plus, l'activité des enzymes antioxydantes et le taux des 'éboueurs' de faible poids moléculaire varient selon le tissu considéré et selon d'autres facteurs endogènes et exogènes (âge, saison, température, teneur en oxygène) (Livingstone, 2001 ; Nunes *et al.*, 2006) rendant ainsi l'interprétation des données difficile (Ozcan Oruc *et al.*, 2004).

Une des caractéristiques du stress oxydant est la peroxydation des lipides membranaires par des radicaux hautement réactifs. Les lipides membranaires jouent un rôle critique dans le maintien de la structure et de la fonction des membranes et de façon ultime, dans la survie des cellules. La présence d'acides gras polyinsaturés et l'augmentation de la solubilité de l'oxygène dans les lipides font des membranes des cibles particulièrement sensibles à toute attaque oxydative par quelque composé polluant, et en particulier par les pesticides. En effet, la peroxydation des lipides est un important mécanisme impliqué dans la toxicité des pesticides.

Tableau 7 : Effets des pesticides sur les systèmes antioxydants chez différentes espèces animales.

Espèce étudiée	Traitement	Effets observés	Références
Rats mâles	Expérimentation : rats traités avec une simple dose de 0,2 ml de cyperméthrine et/ou fenvalérate dissous dans 1 ml d'huile d'arachide. Les rats ont été tués aux jours 0, 1, 3, 7 et 14 et le sang fût obtenu par ponction cardiaque.	<p>Augmentation de la LPO jusqu'au troisième jour dans érythrocytes pour les deux pyréthroïdes. Augmentation plus élevée de la LPO lors de la combinaison des deux pyréthroïdes.</p> <p>Augmentation de l'activité de l'enzyme antioxydante SOD:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Traitement avec la cyperméthrine : augmentation jusqu'au quatorzième jour. • Traitement avec le fenvalérate : augmentation jusqu'au septième jour suivie d'une diminution progressive. • Traitement avec les deux pesticides : augmentation jusqu'au troisième jour suivie d'une diminution. <p>Augmentation de l'activité de l'enzyme antioxydante CAT jusqu'au troisième jour pour les deux pesticides suivie d'une diminution.</p> <p>Augmentation du contenu en GSH jusqu'au troisième jour pour les deux pesticides suivie d'une diminution.</p>	Kale <i>et al.</i> , 1998
Rats albinos mâles	Expérimentation : administration orale simple (170 mg/kg) ou répétée (75 mg/kg par jour pendant 5 jours) de cyperméthrine.	<p>Augmentation des concentrations en TBARS dans les tissus cérébraux et hépatiques avec augmentation plus importante dans le tissu hépatique. L'administration de vitamines E ou d'allopurinol dans le régime empêchait et/ou réduisait cette augmentation.</p> <p>Diminution faible mais significative du contenu en GSH dans les deux tissus mais une diminution plus importante dans le tissu hépatique est observée.</p> <p>Pas de changement dans l'activité de la GST.</p>	Giray <i>et al.</i> , 2000
Souris albinos mâles	Expérimentation : administration orale de deux doses de deltaméthrine, 5,6 et 18 mg/kg, pendant 15 jours.	<p>Augmentation significative de la LPO dans le foie et les reins pour les deux doses.</p> <p>Diminution significative de l'activité d'enzymes antioxydantes GPx, GST et CAT dans le foie et les reins.</p> <p>Diminution significative du contenu en GSH plus importante dans les reins que dans le foie.</p>	Rehman <i>et al.</i> , 2006
Rats mâles	Expérimentation : administration orale de fenvalérate (0, 250, 500 et 1000 ppm) pendant une période de 28 jours.	<p>Augmentation significative des concentrations en TBARS dans le foie, les érythrocytes, la rate et le thymus à la plus forte dose de fenvalérate.</p> <p>Altération du statut antioxydant hépatique :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diminution significative de 26 % (500 ppm) et de 35 % (1000 ppm) du contenu en GSH dans le foie. • Diminution significative de l'activité de la SOD (25 %) et de la CAT (27 %) dans le foie à la plus forte dose (1000 ppm). 	Prasanthi <i>et al.</i> , 2005

4.1. Les pyréthroïdes et le stress oxydant

Bien que la principale cible des insecticides pyréthroïdes soit le système nerveux, des études récentes menées chez les Mammifères ont mis en évidence leur capacité à induire des dommages oxydatifs dans des tissus tels que le foie, les érythrocytes et les organes lymphoïdes (Giray *et al.*, 2001). En effet, lors du métabolisme de ces insecticides, une génération d'espèces réactives de l'oxygène est possible. Ces derniers sont dès lors susceptibles d'engendrer un stress oxydant (Kale *et al.*, 1998).

Ces auteurs ont en effet observé une augmentation de la peroxydation lipidique dans des érythrocytes de rats après trois jours d'exposition à la cyperméthrine et/ou au fenvalérate ainsi qu'une augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes, SOD et CAT, et du contenu en GSH. L'augmentation de la peroxydation lipidique et l'altération du statut antioxydant suggèrent l'implication de radicaux libres dans la toxicité des pyréthroïdes. L'augmentation du contenu en GSH dans les érythrocytes pourrait correspondre à un début d'adaptation à un stress oxydant chez les individus intoxiqués (Kale *et al.*, 1998).

Une augmentation de la peroxydation des lipides dans les tissus cérébraux et hépatiques de rats mâles après une administration orale de cyperméthrine fût également mise en évidence par Giray *et al.* (2001). Ils ont également observé que l'administration de vitamine E dans le régime contaminant réduisait l'augmentation de lipoperoxydation. Ce qui confirme le rôle antioxydant de cette vitamine.

Rehman *et al.* (2006) ont observé une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution de l'activité et du contenu de divers antioxydants (GPx, GST, CAT et GSH) dans le foie et les reins de souris suite à l'administration orale de deltaméthrine. Une augmentation de la peroxydation lipidique de 13 fois dans le foie de rats suite à une exposition à la deltaméthrine (15 mg/kg pendant 30 jours) a également été observée par Manna *et al.* (2005 in Rehman *et al.*, 2006). De plus, ces auteurs ont observé une diminution significative de l'activité de la catalase et du contenu en glutathion total au niveau du foie d'animaux traités. Yarsan *et al.* (2002 in Rehman *et al.*, 2006) ont également mis en évidence une augmentation de la peroxydation lipidique dans le plasma et une diminution des activités Cu-SOD et GPx dans les érythrocytes de souris. Plusieurs études ont démontré la capacité de la deltaméthrine à induire un stress oxydant chez le poisson *Channa punctatus* Bloch (Sayeed *et al.* 2003 ; Parvez *et al.*, 2006 ; Atif *et al.*, 2005). En effet, de ces travaux, il ressort qu'une exposition de 48h à la deltaméthrine (0,75 µg/l) induit un stress oxydant et que la branchie est l'organe le plus sensible à la peroxydation lipidique. La branchie est le premier lieu d'absorption de la deltaméthrine et son potentiel antioxydant est relativement faible.

4.2. Les organochlorés et le stress oxydant

De nombreuses études ont mis en évidence l'induction d'un stress oxydant dans différents organes suite à une contamination par des pesticides organochlorés.

Hoarau *et al.* (2004) se sont intéressés à l'éventuel effet de deux pesticides organochlorés, le 4,4'DDE et le méthoxychlore, sur l'activité de la GST dans l'hépatopancréas et les branchies de la palourde *Ruditapes decussatus*. Dans l'hépatopancréas, l'activité de la GST était toujours deux à cinq fois plus faible que dans les branchies et ne semblait pas être altérée après une exposition de 48h aux deux composés organochlorés. Dans les branchies, l'activité de la GST augmentait significativement après exposition. Boryslawskyj *et al.* (1988, in Hoarau *et al.*, 2004) avaient également observé une augmentation de l'activité de la GST de 7 fois chez la moule *Sphaerium corneum* exposée à la dieldrine, un composé organochloré.

Hassoun *et al.* (1996) se sont intéressés à l'aptitude de pesticides organochlorés à induire un stress oxydant dans les tissus fœtaux et placentaires de souris gestantes suite à une

- Augmentation de l'activité de la GPx dans le foie à la plus forte dose (1000 ppm).

Altération du statut antioxydant dans les érythrocytes :

- Pas de changement de l'activité de la CAT.
- Augmentation significative de l'activité de la SOD (19 et 56 %) aux doses 500 et 1000 ppm.
- Augmentation significative de l'activité de la GR (26 et 61 %) aux doses 500 et 1000 ppm.
- Diminution significative de l'activité de la GPx (15 et 50 %) aux doses 500 et 1000 ppm.

Rats femelles

Expérimentation : rats traités oralement avec 2,25 mg/kg d'endrine, 60 mg/kg de chlordane, 300 mg/kg d'alachlore, 41 mg/kg de chlorpyrifos et 54 mg/kg de fenthion à 0h et 21h. Les rats ont été tués par décapitation à 24h.

Augmentation de la LPO de:

	Endrine	Chlordane	Alachlore	Chlorpyrifos	Fenthion
Foie	2,8 x	3,0 x	4,2 x	4,3 x	4,8 x
Cerveau	2,4 x	2,1 x	3,6 x	4,6 x	5,3 x

Bagchi *et al.*, 1995

Rats mâles

Expérimentation : rats traités oralement avec une simple dose de lindane (60 mg/kg) et sacrifiés aux jours 0 (contrôle), 1, 2, 3, 5 et 7 après traitement.

Un jour après le traitement :

- Augmentation de la concentration en TBARS dans le foie (123 %),
- Augmentation de la production microsomale de radicaux superoxydes O²⁻ (92 %),
- Induction du cytochrome P450,
- Diminution de l'activité de la SOD (32 %) et de la CAT (38 %) dans le foie.

Retour à la normal à partir du troisième jour et par la suite pour les différents paramètres étudiés suite à une diminution du contenu hépatique en lindane après deux jours.

Junqueira *et al.*, 1997

Rats mâles

Expérimentation : rats traités oralement avec 45, 75 et 90 mg/kg de diméthoate et sacrifiés après 24h.

Augmentation du cytochrome hépatique P450, de la LPO, de l'activité de la CAT, de la SOD, de la GPx et de la GR dans le foie et le cerveau aux doses 75 et 90 mg/kg.

Sharma *et al.*, 2005

Pas de modification de l'activité de la G6PDH dans le foie et le cerveau.

Pas de modification du contenu en GSH ni de l'activité de la GST dans le foie mais augmentation significative dans le cerveau à la dose 90 mg/kg.

Rats mâles

Expérimentation : rats traités oralement avec 0,6 ; 6 et 30 mg/kg de diméthoate pendant 30 jours.

Augmentation de la LPO, de l'activité de la CAT, de la SOD, de la GPx, de la GR et de la GST dans le foie et le cerveau aux doses 6 et 30 mg/kg.

Sharma *et al.*, 2005

Augmentation de l'activité de la G6PDH dans le foie à la dose 30 mg/kg.

Diminution du contenu en GSH dans le foie et le cerveau aux doses 6 et 30 mg/kg.

administration orale de 4,5 mg/kg d'endrine et 30 mg/kg de lindane. De cette étude, il ressort une augmentation significative de la peroxydation lipidique et de la production d'anions superoxydes dans les tissus fœtaux et placentaires deux jours après traitement et dans le foie des fœtus six jours après traitement.

Une diminution significative de l'activité des enzymes antioxydantes SOD, CAT, GR et GPx et une augmentation des peroxydes et de la LPO furent observées par Latchoumycandane *et al.* (2002) dans l'épididyme et le sperme épидидymal de rats adultes après quatre et sept jours de traitement au méthoxychlore. Une diminution de l'activité SOD et une augmentation de la LPO ont également été observées dans le foie mais pas dans les reins. Ces résultats indiquent que le méthoxychlore est susceptible d'induire un stress oxydant en induisant une génération d'espèces réactives à l'oxygène.

Sohn *et al.* (2004) se sont intéressés à la toxicité de l'endosulfan chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et sur des lignées cellulaires humaines. Les résultats obtenus suggèrent que l'endosulfan est responsable de dommages oxydatifs par l'intermédiaire d'une production d'espèce réactives à l'oxygène. Ils ont également conforté l'idée existante sur les effets protecteurs de l' α -tocophérol et du β -carotène.

Plusieurs études ont démontré la capacité de l'endosulfan à induire une stress oxydant chez la truite arc-en ciel *Oncorhynchus mykiss* (Dorval et Hontela, 2003 in Sohn *et al.*, 2004 ; Dorval *et al.*, 2003) et chez le poisson d'eau douce *Channa punctatus* (Pandey *et al.*, 2001). De ces études, il ressort un changement du contenu en GSH et des activités des enzymes antioxydantes.

Hincal *et al.* (1995 in Mohammad *et al.*, 2004) ont démontré qu'une simple ou une multiple dose d'endosulfan induisait une peroxydation lipidique et une altération du contenu en glutathion dans les tissus cérébraux et hépatiques chez le rat.

5. Objectifs

L'objectif général de ce mémoire est d'obtenir une vision globale de l'état de stress oxydant chez la crevette tigrée suite à une exposition à des pesticides largement employés dans les élevages de crevettes au Vietnam.

Nous savons que les pesticides peuvent être responsables de la formation de métabolites radicalaires à l'origine d'un stress oxydant. Rappelons que le stress oxydant a été défini comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et est source d'effets toxiques potentiels (peroxydation des lipides membranaires, dégradation de l'ADN, oxydation des protéines) (Lagadic *et al.*, 1997).

Nous savons également qu'il existe des systèmes de défense enzymatiques et non enzymatiques pour contrecarrer les effets néfastes de xénobiotiques au sein d'un organisme. Dès lors, nous allons étudier les effets de deux pesticides (deltaméthrine et endosulfan) sur certains de ces systèmes de défense. Dans un premier temps, nous caractériserons l'état de stress oxydant par la mesure de la quantité de TBARS (*ThioBarbituric Acid Reactive Substances*) dans l'hépatopancréas et les branchies de *Penaeus monodon*. Nous évaluerons ensuite l'activité ou la concentration de différents systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dans divers organes.

Enfin, nous savons qu'une production excessive de radicaux libres peut provoquer des lésions directes sur les molécules biologiques. L'oxydation des acides aminés, marqueur biologique principal de l'oxydation des protéines, génère des groupements hydroxyles et carbonyles sur les protéines. Parvez et Raisuddin (2005) ont utilisé la carbonylation des protéines en tant que

<i>Oreochromis niloticus</i> <i>Cyprinus carpio</i>	Expérimentation : individus exposés au 2,4-D (87 ppm), à l'azinphosméthyl (0,23 ppm) et à une combinaison des deux pesticides pendant 96h.	Augmentation de l'activité de la SOD dans les branchies des deux espèces étudiées. Augmentation de l'activité de la CAT et de la GPx dans les reins de <i>C. caprio</i> . Pas de changement de l'activité de la CAT dans les différents tissus de <i>O. niloticus</i> . Diminution de l'activité de la GPx dans le cerveau de <i>O. niloticus</i> et augmentation de cette dernière dans les reins. Augmentation de l'activité de la GST dans les reins des deux espèces étudiées. Pas de changement de la concentration en MDA dans les différents tissus des deux espèces étudiées.	Ozcan Oruc <i>et al.</i> , 2004
<i>Perna perna</i>	Expérimentation : moules exposées au paraquat (10 ppm), au plomb (1 ppm) et à une combinaison des deux composés pendant 48h.	Exposition au paraquat : <ul style="list-style-type: none"> • Augmentation de l'activité de la GR et de la G6PDH dans la glande digestive. • Diminution de l'activité de la GST dans la glande digestive. • Pas de changement de l'activité de la CAT dans la glande digestive. Exposition au plomb : pas de changement dans l'activité des différentes enzymes dans la glande digestive. Augmentation du contenu en GSH dans la glande digestive suite aux trois différents traitements.	Dafre <i>et al.</i> , 2004
<i>Ruditapes decussatus</i>	Expérimentation : exposition pendant 48h au 4,4'DDE (0,14 µM) et au méthoxychlore (0,14 µM)	Augmentation de l'activité de la GST dans les branchies de <ul style="list-style-type: none"> • 1,6 fois suite à l'exposition au 4,4'DDE, • 1,3 fois suite à l'exposition au méthoxychlore. Pas d'augmentation de l'activité de la GST dans l'hépatopancréas.	Hoarau <i>et al.</i> , 2004

LPO : lipoperoxydation ; **GSH** : glutathion réduit ; **SOD** : superoxyde dismutase ; **CAT** : catalase ; **GPx** : glutathion peroxydase ; **GR** : glutathion réductase ; **G6PDH** : glucose -6-phosphate déshydrogénase ; **GST** : glutathion S-transférase ; **MDA** : malondialdéhyde ; **TBARS** : *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*.

ppm : parties par million

2,4 D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

4,4'DDE : 2,2-bis(4-chlorophényl)-1,1-dichloroéthylène

Cyperméthrine ; Fenvalérate ; Deltaméthrine →

Endrine ; Chlordane ; Lindane ; Méthoxychlore ; 4,4'DDE →

Chlorpyrifos ; Fenthion ; Azinphosméthyle ; Diméthoate →

Alachlore ; 2,4 D ; Paraquat →

Insecticides pyréthroïdes

Insecticides organochlorés

Insecticides organophosphorés

Herbicides

Première partie : Introduction

biomarqueur du stress oxydant afin d'évaluer les effets toxiques de la deltaméthrine, de l'endosulfan et du paraquat sur le poisson d'eau douce *Channa punctatus*. Dès lors, nous tenterons de mettre en évidence par l'analyse protéomique, un éventuel état de carbonylation des protéines dans une condition sélectionnée en fonction des résultats obtenus par l'approche biochimique.

Ce travail permettra de sélectionner certains biomarqueurs du stress oxydant pouvant être utilisés dans un système multiple avec d'autres biomarqueurs, afin d'évaluer l'état de stress des crevettes géantes tigrées en élevage ou provenant des mangroves. Cet outil de gestion pourra à moyen terme être utilisé afin de faire tendre la crevetticulture vietnamienne vers un développement durable.

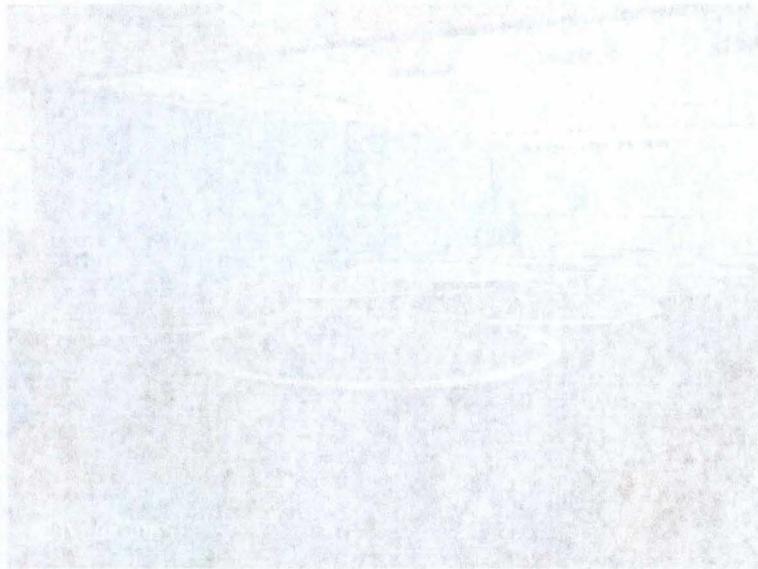
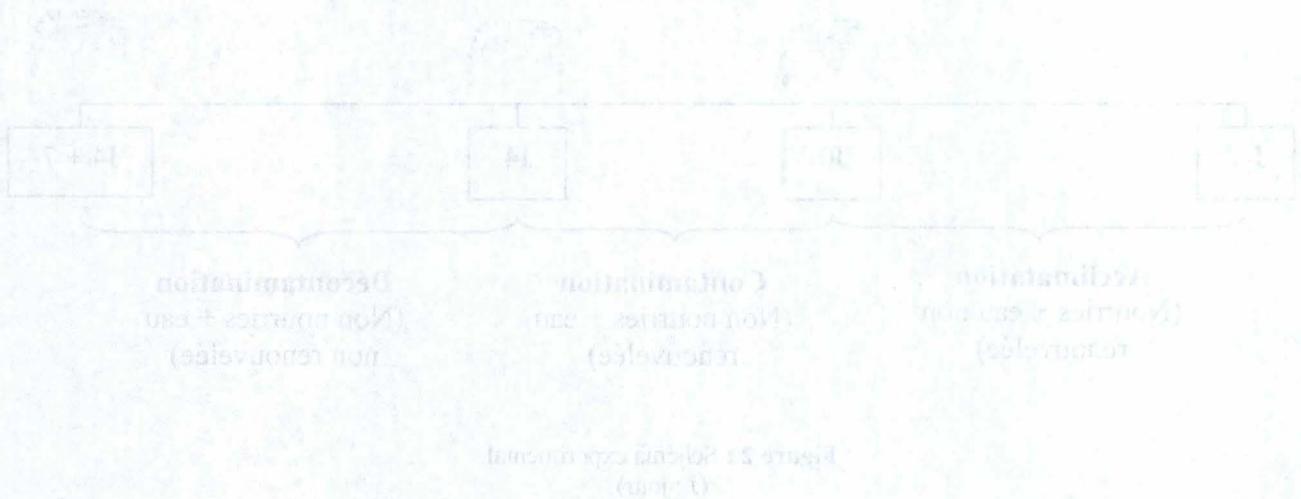


Figure 1: Les 12 paramètres étudiés

MATÉRIEL ET MÉTHODES



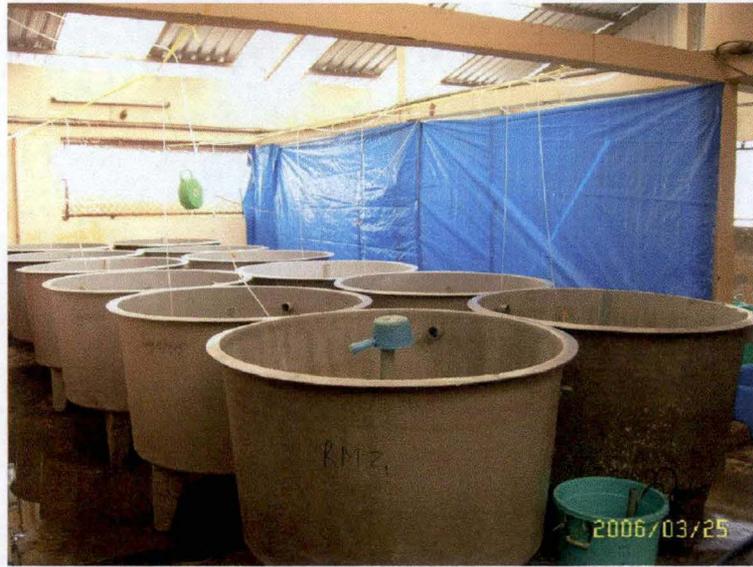


Figure 1 : Les 12 bassins expérimentaux.

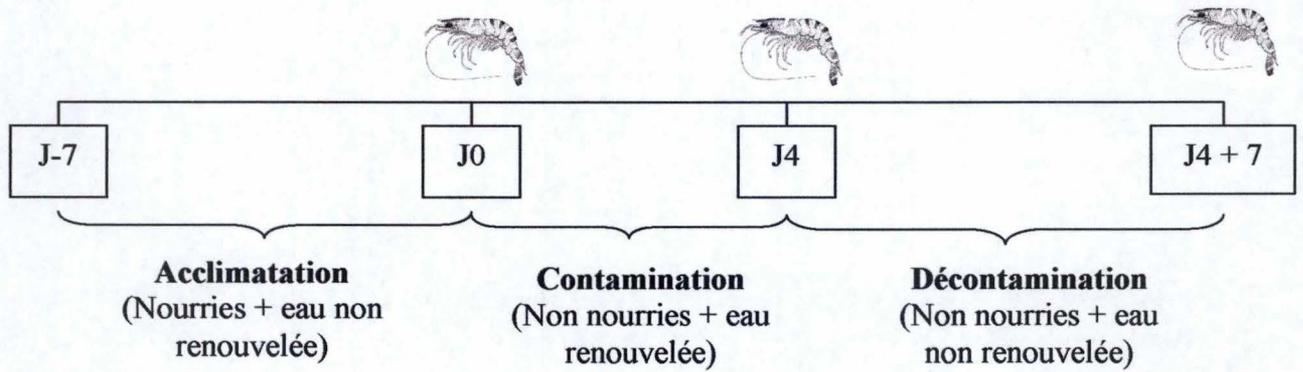


Figure 2 : Schéma expérimental.
(J : jour).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Les animaux

Notre modèle d'étude est la crevette géante tigrée *Penaeus monodon*. Les crevettes, mâles et femelles confondus, d'un poids moyen individuel de $8,5 \pm 0,4$ g proviennent d'une ferme d'élevage extensive située dans la province de Ca Mau, au sud-ouest du delta du Mékong.

A leur arrivée au laboratoire de Can Tho, les crevettes ont été réparties dans trois grands bassins de 2 m^3 contenant de l'eau de mer à 80 ppt diluée dans de l'eau de ville pour obtenir une concentration finale de 15 ppt. Les bassins ont été maintenus dans des conditions de photopériode naturelle et sous aération constante.

Après une semaine passée dans les grands bassins, les crevettes ont été réparties par lot de 25 dans 12 bassins expérimentaux de 200 litres d'eau salée (15 ppt) où une photopériode de 12h de lumière et 12h d'obscurité et une aération constante ont été maintenues (Figure 1). Les individus ont été nourris à raison de cinq fois par jour avec des granulés commerciaux, GreenfeedTM contenant 30 % de protéines (11g de granulés/jour/bassin).

2. Conditions expérimentales

Après une acclimatation de sept jours dans leur environnement expérimental, les crevettes ont été exposées à trois concentrations nominales d'endosulfan ($0,01 \mu\text{g/l}$; $0,1 \mu\text{g/l}$ et $1 \mu\text{g/l}$) pendant quatre jours. L'endosulfan a été solubilisé dans de l'acétone à raison de 1 mg de pesticide pour 10 ml d'acétone (solution stock). Une condition contrôle a également été incluse. Chaque traitement était présent en triplicat.

Durant l'expérimentation, les crevettes n'ont pas été nourries et l'eau a été renouvelée quotidiennement. Après le changement d'eau matinal, les différents bassins expérimentaux ont reçu :

- Bassins 'contrôles': 20 ml d'acétone
- Bassins ' $0,01 \mu\text{g/l}$ ': 20 μl de la solution stock + 18,98 ml d'acétone
- Bassins ' $0,1 \mu\text{g/l}$ ': 200 μl de la solution stock + 18,8 ml d'acétone
- Bassins ' $1 \mu\text{g/l}$ ': 2 ml de la solution stock + 18 ml d'acétone

Pendant les sept jours de décontamination suivants, les crevettes n'ont pas été nourries et l'eau n'a pas été renouvelée (Figure 2).

Suite à cette première contamination par un pesticide, les 12 bassins expérimentaux ont été lavés et décontaminés. Des lots de 25 crevettes en provenance des grands bassins ont de nouveau été répartis dans les 12 bassins expérimentaux. Après un jour d'acclimatation dans les petits bassins, les crevettes ont été exposées à trois concentrations nominales de deltaméthrine ($0,001 \mu\text{g/l}$; $0,01 \mu\text{g/l}$ et $0,1 \mu\text{g/l}$) pendant quatre jours. Le schéma expérimental était identique à celui décrit précédemment. Après changement d'eau, les différents bassins expérimentaux ont reçu :

- Bassins 'contrôles': 20 ml d'acétone
- Bassins ' $0,001 \mu\text{g/l}$ ': 2 μl de la solution stock + 20 ml d'acétone
- Bassins ' $0,01 \mu\text{g/l}$ ': 20 μl de la solution stock + 18,98 ml d'acétone
- Bassins ' $0,1 \mu\text{g/l}$ ': 200 μl de la solution stock + 18,8 ml d'acétone

Les crevettes ont été échantillonnées au jour 0 avant contamination, au jour 4, soit en fin de contamination et au jour 4+7, soit 7 jours après la phase de contamination.



Figure 3 : Prise de l'hémolymphe et dissection des divers organes.
A : hémolymphe ; B : branchies ; C : hépatopancréas

3. Dosage des biomarqueurs du stress oxydant¹

Nous avons caractérisé l'état de stress oxydant de l'organisme par la mesure des taux de TBARS et de glutathion total (GSH) ainsi que par les niveaux d'activité des systèmes antioxydants tels que la glutathion peroxydase (GPx), la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), la glutathion S-transférase (GST) et la catalase (CAT) sur divers organes de crevettes issues des différentes conditions.

Les principes généraux de dosage sont décrits ci-dessous. Les protocoles détaillés sont donnés en annexe. Une partie des dosages a été réalisée au laboratoire du Collège d'aquaculture et pêcheries de Can Tho au Vietnam et l'autre partie au laboratoire de biochimie de l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes des FUNDP.

3.1. Préparation des échantillons

Afin de réaliser les différents dosages, nous avons procédé à l'homogénéisation des échantillons.

Aux différents jours d'échantillonnage, 6 crevettes par bassin ont été pesées à l'aide d'une balance et tuées par décapitation. Elles ont été regroupées pour obtenir un poids minimum afin de disposer de matériel en suffisance pour le dosage des biomarqueurs.

L'hémolymphe a été prélevé dans le vaisseau ventral et mélangé à de l'anticoagulant (citrate de sodium $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 1 %) à raison de 0,3 ml d'anticoagulant par ml d'hémolymphe. L'hépatopancréas, les branchies et les muscles ont été disséqués et homogénéisés dans du tampon d'homogénéisation (KH_2PO_4 ; 50 mM ; pH 7,5) (Figure 3). Auparavant, nous avons ajouté des inhibiteurs de protéase (Sigma 2714) au tampon d'homogénéisation afin d'obtenir les concentrations finales suivantes : AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, bestatine 130 μM , E-64 14 μM , leupeptine 1 μM et aprotinine 0,3 μM .

Le mélange tissu-tampon a été homogénéisé à l'aide d'un ultraturax durant 2 x 20 secondes avec un intervalle de 10 secondes au cours duquel le tube a été refroidi au contact de la glace. Nous avons prélevé 500 μl d'homogénat pour le dosage de la LPO et 500 μl d'homogénat pour le dosage du GSH. Aux 500 μl d'homogénat destinée au dosage du GSH, nous avons ajouté 500 μl de SSA 5 % (acide 5-sulphosalicylic 5%). Ensuite, les homogénats (excepté celui destiné au dosage de la LPO) ont été centrifugés à 10 000 g durant 10 minutes à 4°C et les surnageants (fraction post-mitochondriale) ont été récoltés. Ces derniers ont été aliquotés et stockés à -80°C; ils serviront aux dosages des biomarqueurs.

3.2. Dosage de la peroxydation des lipides (LPO)

La peroxydation des lipides contribue à la formation de processus pathologiques sévères pour l'organisme considéré. L'oxydation des lipides polyinsaturés implique la soustraction d'un hydrogène allylique, l'insertion d'oxygène moléculaire, et a pour conséquence la soustraction d'hydrogène par les radicaux hydroperoxylys pour former des lipides hydroperoxydes (LOOHs). Les LOOHs génèrent du malondialdéhyde (MDA) et du 4-hydroxyalkénal sous décomposition.

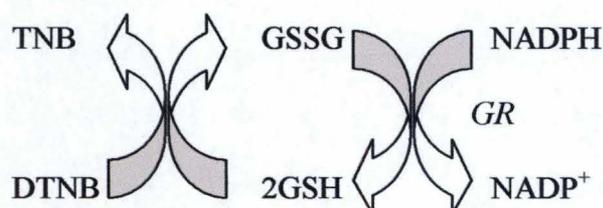
Principe : La technique la plus couramment employée consiste en l'ajout de *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS) à l'échantillon. Le TBARS réagit avec le MDA et le produit de cette réaction est lu à 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Fatima *et al.*, 2000).

¹ Les protocoles sont détaillés en annexe.

Une courbe de calibration avec des valeurs croissantes en MDA permet de calculer la peroxydation des lipides qui est exprimée en nmol de MDA/g de tissu.

3.3. Dosage du glutathion total (GSH)

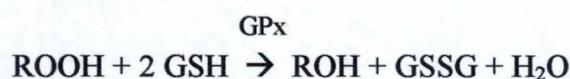
Le glutathion (gamma-glutamylcystéinglycine ou GSH) est un tripeptide naturel dont les propriétés de réduction jouent un rôle central dans les voies métaboliques, aussi bien que dans les systèmes antioxydants de la plupart des cellules aérobies. Le GSH joue un rôle critique en tant que coenzyme avec une variété d'enzymes dont la glutathion peroxydase, la glutathion S-transférase, et la thiol-transférase. Il est également crucial pour une série de processus vitaux, incluant le maintien du potentiel rédox des cellules.



Principe : Afin d'évaluer les contenus en GSH total dans les tissus de crevettes, nous utilisons la réaction du GSH réduit avec le DTNB (acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)) qui peut être lue à 412 nm au spectrophotomètre. La forme oxydée du glutathion (GSSG) doit être réduite en GSH via l'enzyme glutathion réductase (GR) en présence de NADPH.

3.4. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

La fonction de la GPx est de réduire les peroxydes dans les cellules. La décomposition des peroxydes donne des radicaux hautement réactifs. Les enzymes GPx jouent un rôle critique dans la protection des cellules contre les dommages causés par ces radicaux libres. La GPx catalyse la réduction de H₂O₂ en eau et des peroxydes organiques (ROOH) en alcool stable (ROH) en utilisant le glutathion comme source de réducteur.

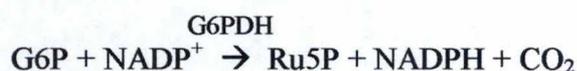


La technique testée a été décrite par Flohé et Günzler (1984) et modifiée par Mohandas *et al.* (1984).

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

3.5. Dosage de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)

La G6PDH catalyse la production du NADPH via la voie des pentoses phosphates.

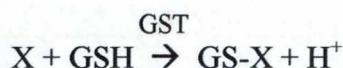


La technique testée a été décrite par Glock et McLean (1953).

Principe : l'essai est basé sur la production de NADPH en présence de NADP^+ et de glucose 6-phosphate. L'absorbance est lue à 340 nm pendant 3 minutes. L'activité est exprimée en nmol de NADP^+ réduit par minute par mg de protéines.

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

La GST catalyse l'attaque nucléophile du GSH sur différentes espèces de composés toxiques. Il s'agit d'une partie du système de défense de l'organisme contre les effets délétères de tels composés. La GST fait partie des enzymes de phase II qui sont principalement des conjugaisons. Ces réactions transforment les métabolites de phase I en des molécules plus hydrophiles qui subissent l'excrétion.

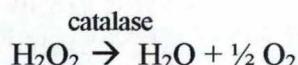


La technique testée a été décrite par Habig *et al.* (1974).

Principe : l'essai est basé sur la conjugaison du GSH avec le CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène). L'activité est exprimée en nmol de CDNB conjugué formé par minute et par mg de protéine en utilisant le coefficient d'extinction molaire de $9,6 \times 10^3 / \text{M cm}$. L'absorbance est lue à 340 nm pendant 3 minutes.

3.7. Dosage de la catalase (CAT)

La catalase est un des systèmes de défense contre l' H_2O_2 , un puissant oxydant qui peut causer des dommages intracellulaires. Chaque unité de catalase décompose 1 μmol de H_2O_2 par min et par mg de protéine à 25°C et à pH 7.



Principe : l'essai est basé sur le principe selon lequel l'oxysulfate de titane (TiOSO_4) réagit avec l' H_2O_2 n'ayant pas été réduit par la catalase après 6 min (Baudhuin *et al.*, 1964). L'absorbance est lue à 420 nm.

3.8. Dosage des protéines selon la méthode Lowry

La méthode de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) consiste à complexer par le cuivre en milieu alcalin environ un quart des acides aminés constituant les protéines. L'addition du réactif de Folin (une solution phénolique contenant des composés de tungstène et de molybdène) qui interagit avec ces protéines cuivriques est suivie du développement en 30 minutes d'une réaction colorée bleue strictement proportionnelle à la quantité de protéines présentes. L'absorbance est mesurée à 660 nm.

4. Mise en évidence des protéines carbonylées en analyse protéomique

Les gels d'électrophorèse 2D constituent des outils classiquement utilisés pour l'analyse protéomique car ils permettent de séparer les protéines provenant d'un organisme, organe, tissu, cellule ou organe cellulaire selon leur point isoélectrique (première dimension) et selon

Tableau 1 : Composition du tampon de lyse DLA

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

Tableau 2 : Composition du tampon de réhydratation des *strips* 1D

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

Tableau 3 : Composition du tampon de réduction

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

Tableau 4 : Programme suivi par l'*IPGphor*

	Pour gels des 11 cm (pH4-7)
Etape 1 : step and hold	1h à 500V
Etape 2 : gradient	1h à 1000V
Etape 3 : gradient	2h30 à 6000V
Etape 4 : step and hold	6000V pour 3000Vh



Figure 4 : Electrophorèse en IEF.
(*Strips* réhydratés placés dans le « *manifold* » lui-même placé sur l'« *IPGphor* »).

leur poids moléculaire (deuxième dimension). La réalisation des gels 2D se déroule en plusieurs étapes :

4.1. Préparation des échantillons

Etant donné les résultats obtenus avec les biomarqueurs, nous avons choisi de travailler avec la deltaméthrine et plus précisément d'étudier la condition test correspondant à 0,1 µg/l sur les branchies de crevettes prélevées au jour 0 avant contamination et au jour 4, soit en fin de contamination. En effet, un effet de peroxydation des lipides a été mis en évidence dans les branchies à la concentration la plus élevée de deltaméthrine. Le tout a été réalisé en triplicats.

Les échantillons (branchies de 6 crevettes regroupées pour chaque jour) ont été homogénéisés dans du tampon de lyse DLA (Tableau 1) auquel nous avons ajouté des inhibiteurs de protéase (Sigma 2714) aux concentrations finales suivantes : AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, bestatine 130 µM, E-64 14 µM, leupeptine 1 µM et aprotinine 0,3 µM.

Le mélange tissu-tampon a été homogénéisé à l'aide d'un potter électrique durant 2 x 25 secondes avec un intervalle de 10 secondes au cours duquel le tube a été refroidi au contact de la glace. Nous avons terminé l'homogénéisation par une sonication de 15 secondes.

Les échantillons ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 12 000 g à température ambiante. Le surnageant a été récupéré et les protéines ont été dosées par la méthode Bradford (Bradford, 1976)².

4.2. Electrophorèse en IEF (*IsoElectric Focusing*)

Du tampon de réhydratation (Tableau 2) a été placé dans les différentes rangées d'un « *Reswelling Tray* »: 200 µl de tampon pour un gel de 11 cm (pH 4-7). Le *strip* a alors été placé sur le tampon de réhydratation. Il a ensuite été recouvert d'huile et a été laissé à réhydrater pendant 10 à 20 h.

Avant de lancer l'électrophorèse, les échantillons ont subi une réduction dans un tampon contenant du DTT. Un même volume de tampon de réduction (Tableau 3) a été ajouté au volume d'échantillon et laissé 15 min à température ambiante. Ensuite, le mélange a été centrifugé 10 min à 12 000 g.

Le *strip* réhydraté a été placé dans un « *manifold* » lui-même placé sur l'« *IPGphor* ». 150 µg de protéines ont été déposées dans le puits de chargement (Figure 4). Le programme suivi par l'IPGphor est repris dans le tableau 4.

4.3. Electrophorèse SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

Une solution d'acrylamide (Tableau 5) a été préparée en prenant soin d'ajouter l'APS et le TEMED juste avant son utilisation. Nous avons préparé un gel 12,5 %. La solution d'acrylamide a été coulée jusqu'à 0,5 cm du bord des plaques. Environ 1 ml de butanol saturé d'eau a été versé sur le dessus de chaque gel afin d'empêcher tout contact avec l'oxygène et permettre la polymérisation. Nous avons laissé le gel recouvert d'un film plastique polymériser à température ambiante toute une nuit.

Avant équilibration du *strip*, nous avons procédé au marquage DNPH des groupes carbonyles des protéines (« *derivatization* »). Pour cela, le *strip* a été placé dans une solution HCl 2N / DNPH 10 mM pendant 20 minutes maximum à température ambiante et sous agitation. Il a ensuite été rincé et neutralisé 15 minutes dans une solution Tris-base 2M / glycérol 30 %.

² Le protocole est détaillé en annexe.

Tableau 5 : Composition de la solution d'acrylamide (gels 2D)

	Concentration finale
Acryl./bis 30%-0,8%	12,5 %
Tris 1.5M pH 8.8	0,375M
SDS 10%	0,1 %
APS 10%	0,1 %
TEMED pur	0,016 %

Tableau 6 : Composition du tampon d'équilibration

	Concentration finale
Tris HCl 1.5M pH 8.8	50mM
Urée	6M
Glycérol 87%	30 %
SDS	2 %

Tableau 7: Composition du tampon d'électrophorèse

	Quantité pour un volume final de 5l
Tris	151,2 g
Glycine	720 g
SDS	50 g

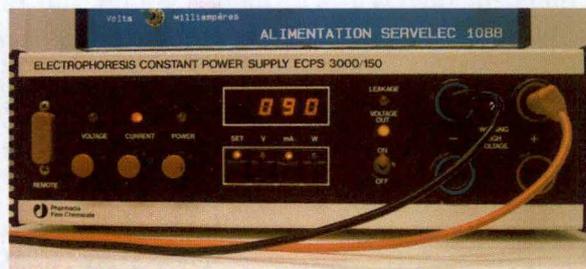
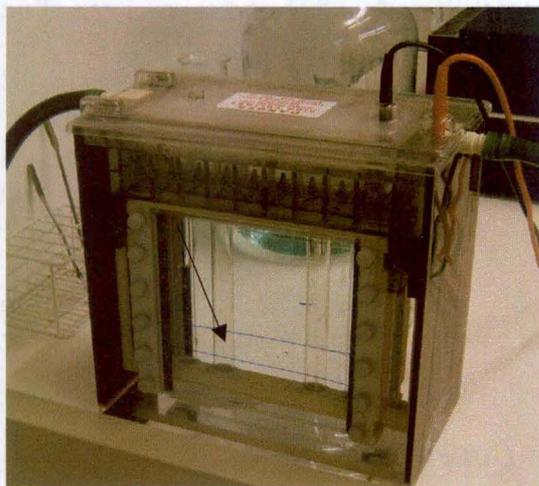


Figure 5 : Electrophorèse SDS-PAGE.

(Plaques comprenant les gels placées dans la cuve à électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse et migration).

Tableau 8: Composition du tampon de transfert

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

Le *strip* a alors été placé dans une solution d'équilibration (Tableau 6) deux fois 15 minutes. Durant les 15 premières minutes, le gel a été placé dans 10 ml de tampon d'équilibration auquel a été ajouté du DTT (100 mg DTT/10 ml TE). Pendant les 15 autres minutes, il a été placé dans 10 ml de tampon d'équilibration comprenant de l'iodoacétamide (250 mg iodoacétamide/10 ml TE).

Le *strip* a ensuite été déposé sur le gel de polyacrylamide entre les plaques et a rapidement été recouvert d'une solution d'agarose.

Les plaques comprenant les gels ont ensuite été placées dans la cuve à électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse (Tableau 7). La migration s'effectue durant 4h à 45 mA/gel (Figure 5).

4.4. Western blot

Une fois le front de migration au bout du gel, l'électrophorèse a été arrêtée. Les gels ont alors été démoulés et équilibrés dans du tampon de transfert (Tableau 8) pendant 5 min. Un western blot à 0,8 mA/cm² de membrane et d'une durée de 1h30 a alors été réalisé. Les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0,45 µm de porosité (Figure 6).

Après le blot, les membranes ont été placées dans une solution de blocage (2,5g de lait en poudre dans 50ml de TBST) à 4°C.

4.5. Marquage aux anticorps anti-DNP/HRP et révélation

Les anticorps vont se lier à la partie DNP de l'hydrazone formée par réaction du DNPH avec les groupements carbonyles des protéines. Ces anticorps sont liés de manière covalente à l'enzyme HRP («*Horse Radish Peroxidase*»). La coloration par chémiluminescence permettra ensuite de détecter l'activité de cette enzyme.

Après trois lavages successifs de 10 minutes dans du TBST, les membranes de nitrocellulose ont été incubées pendant 1h dans une solution TBST/lait en poudre 2 %/anticorps anti-DNP/HRP (polyclonal Rabbit Anti-DNP/HRP, P5102, Dako Cytomation) de lapin dilué 1 :750. Placées sous agitation, nous avons veillé à ce qu'elles soient continuellement recouvertes par la solution.

Ensuite, divers lavages ont été réalisés : 2 x dans du TBST, 1 x 15 min dans du TBST, 4 x 5 min dans du TBST et 1 x 5 min dans du TBS (Tableau 9).

La révélation a été réalisée en chémiluminescence. Les membranes de nitrocellulose ont été incubées pendant 1 minute avec les réactifs suivants : *enhanced luminol reagent* et *oxidizing reagent* en proportion 1 :1. En chambre noire, un film ECL Amersham a été mis au contact de la membrane pendant 5 minutes.

4.6. Coloration à l'argent

La coloration des gels à l'argent donne un aperçu de l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon et nous permet d'essayer de situer les protéines carbonylées sur un gel 2D afin d'éventuellement les identifier grâce à la spectrométrie de masse.

Après avoir été démoulés, les gels ont été placés dans une solution de fixation (Tableau 10) sous la hotte durant 30 minutes. La solution de fixation a été éliminée et remplacée par une solution d'incubation (Tableau 11). Les gels ont été placés dans cette solution toute une nuit à 4°C.

Le lendemain, après avoir été rincés 3 fois 10 minutes avec de l'eau distillée, les gels ont été laissés dans une solution d'argent (Tableau 12) pendant 30 minutes, à l'abri de la lumière. Les gels ont à nouveau été rincés 2 fois 10 minutes à l'aide d'eau ultra pure (milliQ). Ensuite, ils

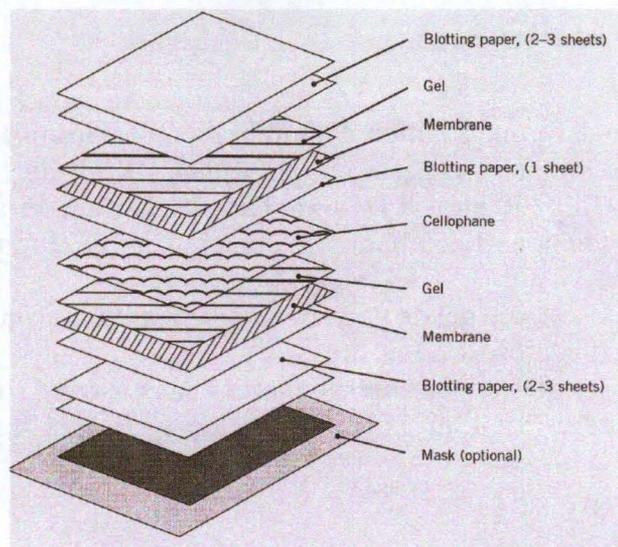


Figure 6 : Montage du western blot.

Tableau 9 : Composition du TBS et du TBST

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

TBS

500 ml + 0,25 ml de Tween

TBST

Tableau 10 : Composition de la solution de fixation

	Concentration finale
Ethanol	40 %
Acide acétique	10 %

Tableau 11 : Composition de la solution d'incubation

	Concentration finale
Ethanol	33,3 %
Na acétate.3 H ₂ O	72,3 g/l
Na ₂ S ₂ O ₃ .5 H ₂ O	2,1 g/l
Glutaraldéhyde 50 %	0,13 %

Tableau 12 : Composition de la solution de coloration à l'argent

	Concentration finale
Nitrate d'argent	1 g/l
Formaldéhyde 37 %	0,012 %

Tableau 13 : Composition de la solution 'Developing'

	Concentration finale
Na ₂ CO ₃	25 g/l
Formaldéhyde 37 %	0,007 %

Tableau 14 : Composition de la solution stop

	Concentration finale
EDTA	14,6 g/l

ont été placés dans la solution de 'developing' (Tableau 13) environ 8 minutes, jusqu'à ce que les spots soient bien visibles. La révélation des spots a été arrêtée par l'incubation dans une solution 'stop' (Tableau 14). Les gels ont ensuite été rincés 3 fois 5 minutes dans de l'eau.

4.7. Scanner

Les gels et films ont été scannés avec un scanner (Amersham Pharmacia Biotech.) à l'aide du programme LabScan version 5.0 (Amersham Biosciences).

5. Traitement statistique des données

Les données brutes ont été encodées et traitées dans le logiciel Excel (Microsoft). L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel STATISTICA. Un test paramétrique a été effectué par la méthode de l'analyse de la variance à deux critères (ANOVA 2) avec répétitions. Un seuil de probabilité significatif de 5 % a été utilisé. L'homogénéité des variances a été vérifiée par le test de Hartley-Bartlett et la normalité de la distribution des points a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov et Lilliefors. Lorsque la distribution n'était pas normale et/ou que les variances n'étaient pas homogènes, une transformation logarithmique des valeurs a été effectuée.

Dans notre analyse, deux variables indépendantes ont été prises en compte :

- Le traitement:
 - Contrôle ; 0,01 µg/l ; 0,1 µg/l et 1 µg/l pour l'endosulfan.
 - Contrôle ; 0,001 µg/l ; 0,01 µg/l et 0,1 µg/l pour la deltaméthrine.
- Le moment d'échantillonnage – temps:
 - Jour 0 avant contamination, jour 4, soit en fin de contamination et jour 4+7, soit 7 jours après la phase de décontamination.

Il s'agit donc d'une ANOVA 2 croisés fixe où le temps a été considéré en tant que répétition (chaque bassin a été prélevé et donc répété trois fois au cours du temps). Le principal effet que nous recherchions dans cette analyse statistique était la présence d'une interaction entre les différents traitements et temps. Celle-ci a permis de mettre en évidence un effet du temps différent en fonction du traitement traduisant donc un effet du pesticide. Lorsqu'un effet 'temps' seul était significatif, cela exprimait un effet de l'expérience sur le paramètre étudié, indépendamment du pesticide. Enfin, si un effet 'traitement' seul était observé, cela traduisait un effet dans certains bassins indépendamment du 'temps', et donc indépendant de l'exposition au pesticide.

Lorsque cette ANOVA a mis en évidence un effet du traitement, du temps et/ou la présence d'une interaction entre le traitement et le temps, le test LSD a été employé afin de distinguer quelles moyennes diffèrent des autres.

Sur les graphiques présentés dans la partie résultats, lors de la présence d'une interaction significative, des lettres (a, b et c) différentes sont ajoutées afin de représenter une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

1. Rappel du protocole expérimental

Pour rappel, des crevettes, mâles et femelles confondus, d'un poids moyen individuel de $8,5 \pm 0,4$ g ont été contaminées par trois concentrations nominales d'endosulfan ($0,01 \mu\text{g/l}$; $0,1 \mu\text{g/l}$ et $1 \mu\text{g/l}$) et de deltaméthrine ($0,001 \mu\text{g/l}$; $0,01 \mu\text{g/l}$ et $0,1 \mu\text{g/l}$) pendant quatre jours. Une condition contrôle était également présente. Six crevettes de chaque condition ont été prélevées au jour 0 avant contamination, au jour 4, soit en fin de contamination et au jour 4+7, soit 7 jours après la phase de contamination.

2. Dosage des biomarqueurs du stress oxydant

Les organes des crevettes de chaque condition ont été disséqués et homogénéisés afin de mettre en évidence d'éventuels effets sur les biomarqueurs sélectionnés. Un minimum de 3 répétitions ($n = 3$) pour chaque condition nous a permis, sur base d'un calcul des moyennes et des écarts-types, de déterminer les concentrations et activités dans les différents organes des individus.

2.1. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation des lipides a été déterminée par la mesure de la quantité de TBARS (*ThioBarbituric Acid Reactive Substances*) dans l'hépatopancréas et les branchies en fonction des différentes conditions d'expérimentation (Figures 1 à 4).

Le niveau de peroxydation des lipides est, de manière générale, plus élevé dans l'hépatopancréas que dans les branchies.

- **Endosulfan :**

Le niveau de LPO est compris entre $117,2 \pm 12,9$ et $192,6 \pm 38,1$ nmol MDA/g tissu dans l'hépatopancréas et entre $25,2 \pm 10,0$ et $63,8 \pm 34,3$ nmol MDA/g tissu dans les branchies (Figures 1 et 2).

Aucune interaction significative entre les différents traitements et temps n'a pu être décelée par l'ANOVA dans les deux organes étudiés. Toutefois, dans les branchies, un effet hautement significatif du temps est observé ($P=0,006$). Le test LSD a révélé une différence hautement significative entre le jour 0 et les jours 4 ($P=0,005$) et 4+7 ($P=0,009$).

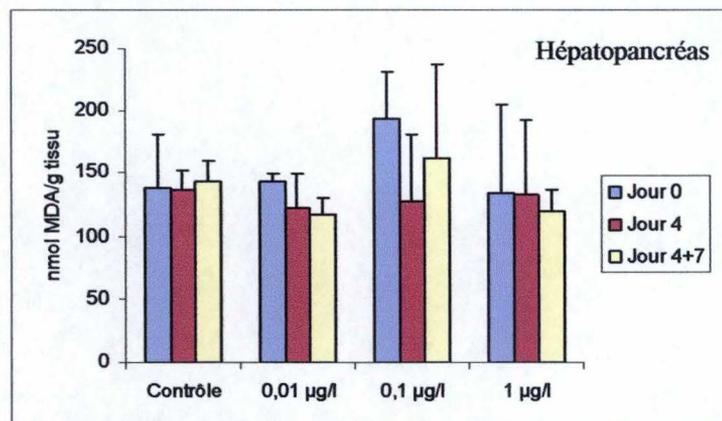


Figure 1 : Taux de TBARS dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

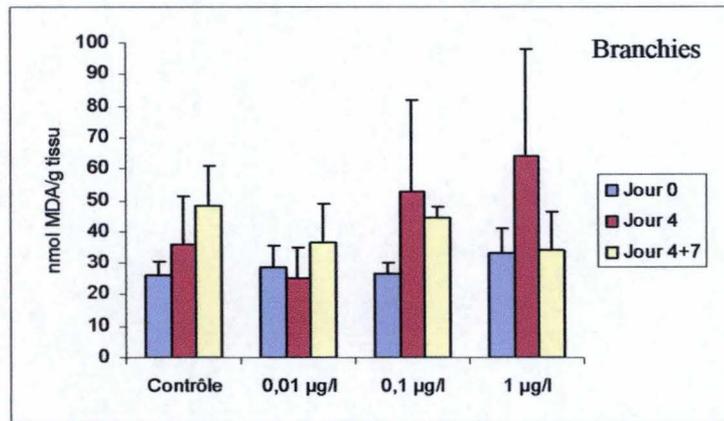


Figure 2 : Taux de TBARS dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

• **Deltaméthrine :**

Le niveau de peroxydation lipidique varie entre $85,1 \pm 8,5$ et $188,2 \pm 26,4$ nmol MDA/g tissu dans l'hépatopancréas et entre $17,8 \pm 0,28$ et $75,0 \pm 17,7$ nmol MDA/g tissu dans les branchies (Figures 3 et 4).

L'analyse statistique montre qu'il existe une interaction très hautement significative entre les différents traitements et temps dans les branchies ($P=0,0001$). En effet, nous observons une diminution hautement significative du niveau de peroxydation lipidique après la période de décontamination chez des crevettes issues du groupe contrôle ($P=0,004$) et du groupe $0,01 \mu\text{g/l}$ ($P=0,001$). Par contre, une augmentation très hautement significative des taux de MDA est observée après sept jours de décontamination suite au traitement $0,001 \mu\text{g/l}$ ($P=0,0001$). Nous pouvons également remarquer une augmentation hautement significative ($P=0,002$) du niveau de lipoperoxydation au jour 4 suivie d'une diminution hautement significative ($P=0,002$) après sept jours de décontamination chez des organismes issus du groupe $0,1 \mu\text{g/l}$. Dans l'hépatopancréas, une différence hautement significative entre les différents temps a été décelée par l'ANOVA ($P=0,002$). Le test LSD consécutif met en évidence une différence très hautement significative entre le jour 0 et le jour 4 ($P=0,0004$) et une différence significative entre le jour 4 et le jour 4+7 ($P=0,019$).

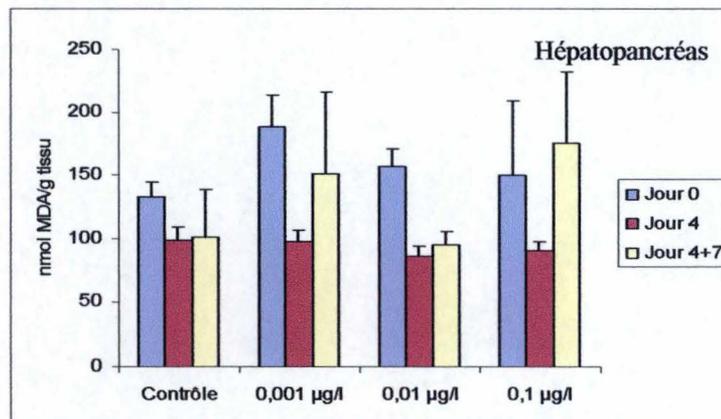


Figure 3 : Taux de TBARS dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

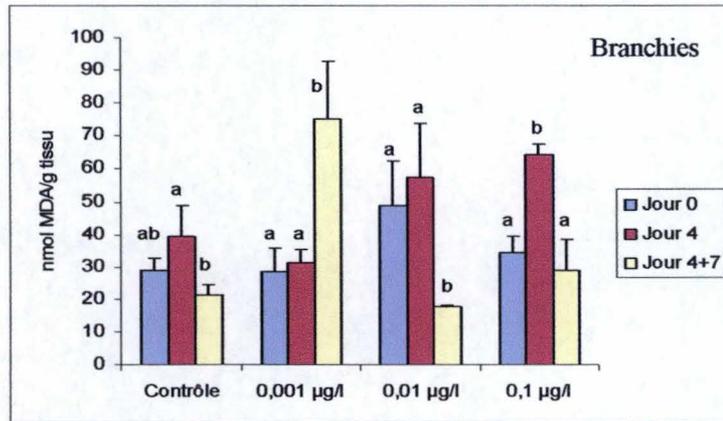


Figure 4 : Taux de TBARS dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

2.2. Dosage du glutathion total (GSH)

- **Endosulfan :**

Les valeurs obtenues au jour 0 avant contamination, tous traitements confondus, ne sont ni reprises sur les figures ni incluses dans l'analyse statistique suite à une erreur survenue lors de ce dosage.

Les contenus en glutathion total (GSH) sont compris entre $19,3 \pm 7,2$ et $88,6 \pm 24,8$ nmol de GSH/g tissu dans l'hépatopancréas et entre $14,1 \pm 4,2$ et $90,7 \pm 73,0$ nmol de GSH/g tissu dans les branchies (Figures 5 et 6).

Dans l'hépatopancréas, une interaction significative entre les différents temps et traitements a été décelée par l'ANOVA ($P=0,02$). En effet, nous observons une augmentation significative ($P=0,02$) du contenu en GSH au jour 4+7 suite au traitement $1 \mu\text{g/l}$, augmentation non retrouvée pour les trois autres traitements.

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par l'ANOVA dans les branchies.

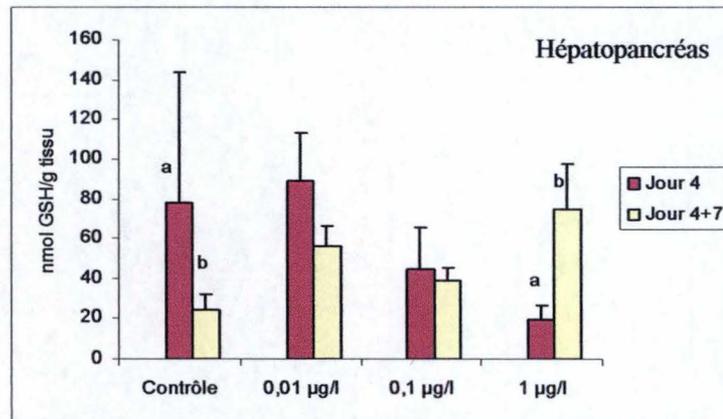


Figure 5 : Mesure du glutathion total en nmol de GSH/g tissu dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

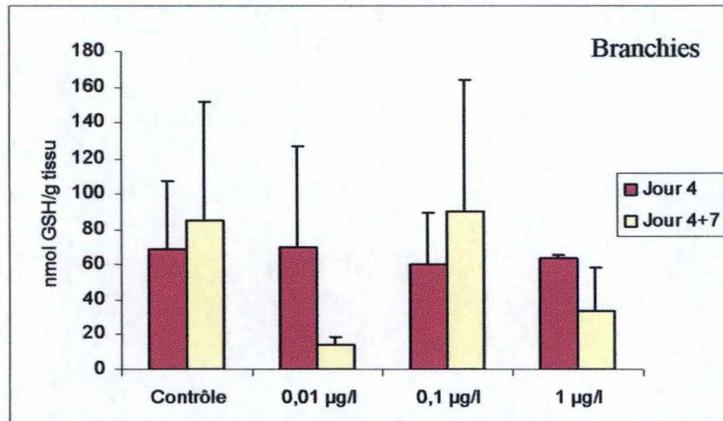


Figure 6 : Mesure du glutathion total en nmol de GSH/g tissu dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

• **Deltaméthrine :**

Les contenus en glutathion total (GSH) varie entre $4,0 \pm 1,0$ et $71,6 \pm 13,4$ nmol de GSH/g tissu dans l'hépatopancréas et entre $12,8 \pm 3,9$ et $100,8 \pm 26,3$ nmol de GSH/g tissu dans les branchies (Figures 7 et 8).

Les tests statistiques ont décelé la présence d'une interaction hautement significative entre les différents temps et traitements dans les deux organes considérés ($P=0,006$ pour l'hépatopancréas et $P=0,009$ pour les branchies).

L'évolution du contenu en GSH dans l'hépatopancréas est similaire pour les trois premiers traitements (Contrôle ; $0,001 \mu\text{g/l}$ et $0,01 \mu\text{g/l}$). Cette évolution diffère dans le dernier groupe où nous observons une augmentation significative ($P=0,03$) du contenu en GSH après quatre jours d'exposition à $0,1 \mu\text{g/l}$. Cette augmentation est suivie d'une diminution très hautement significative de la concentration en GSH après la période de décontamination ($P=0,0001$).

Dans les branchies, à la concentration la plus élevée, nous observons une augmentation significative ($P=0,027$) du contenu en GSH au cours du temps. Cette tendance n'est pas perçue pour les trois autres traitements (Contrôle ; $0,001 \mu\text{g/l}$ et $0,01 \mu\text{g/l}$) où une diminution hautement significative du contenu en GSH est observée au cours du temps dans le groupe contrôle ($P=0,007$) et dans celui exposé à $0,01 \mu\text{g/l}$ ($P=0,002$).

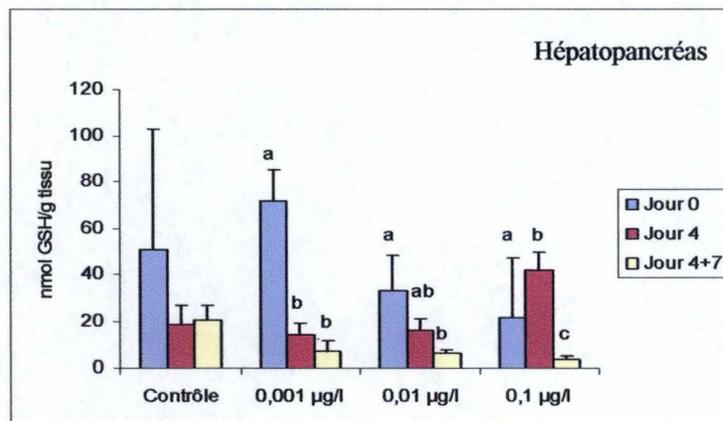


Figure 7 : Mesure du glutathion total en nmol de GSH/ g tissu dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a, b et c) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

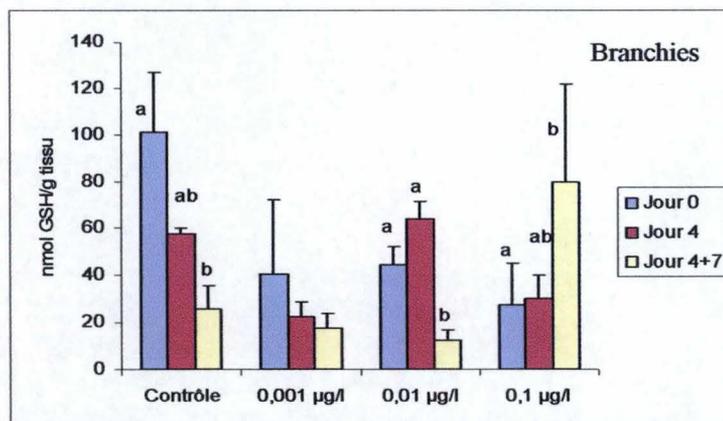


Figure 8 : Mesure du glutathion total en nmol de GSH/ g tissu dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

2.3. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

- **Endosulfan :**

Dans l'ensemble, l'activité de cette enzyme dans l'hépatopancréas reste constante parmi les différents traitements (Figure 9). L'activité moyenne de la GPx varie entre 7,2 et 13,1 nmol NADPH/min/mg protéine, avec une valeur minimale de 4,5 nmol NADPH/min/mg protéine et une valeur maximale de 20,6 nmol NADPH/min/mg protéine. Aucune différence significative n'a pu être décelée par l'ANOVA.

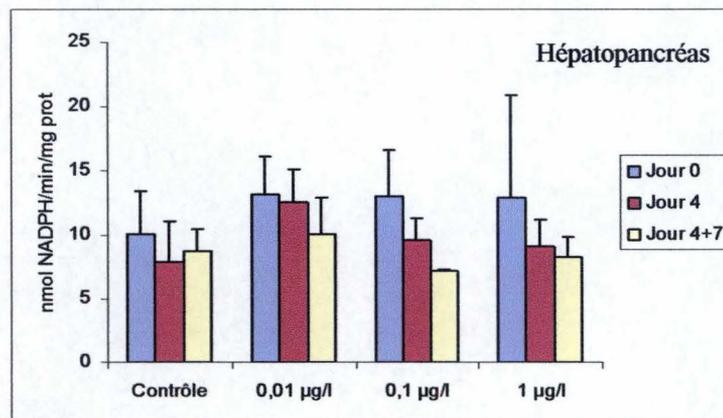
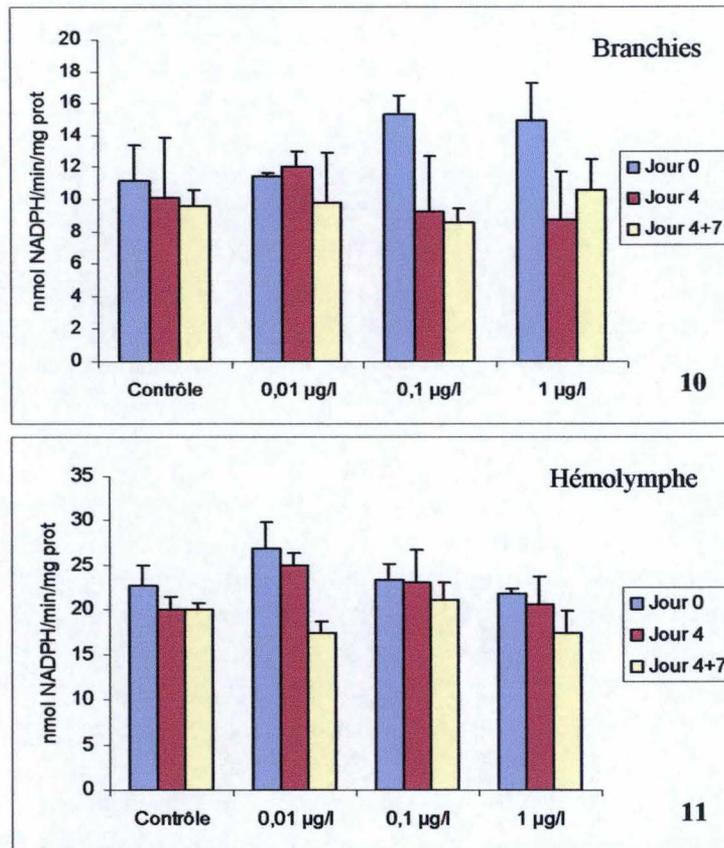


Figure 9 : Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/mg prot) dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

Cette activité varie entre $8,5 \pm 0,8$ et $15,3 \pm 1,2$ nmol NADPH/min/mg protéine dans les branchies et entre $17,3 \pm 2,5$ et $27,0 \pm 2,9$ nmol NADPH/min/mg protéine dans l'hémolymphe (Figures 10 et 11).

L'ANOVA n'a pas pu mettre en évidence la présence d'une interaction entre les différents traitements et temps dans les deux organes étudiés. Toutefois, une différence hautement significative entre les différents temps a été décelée dans les branchies ($P=0,0013$). Le test LSD indique que cette différence hautement significative se marque entre le jour 0 et les jours 4 et 4+7.

Un effet hautement significatif du traitement ($P=0,01$) et très hautement significatif du temps ($P=0,0001$) ont également été décelés par les tests statistiques dans l'hémolymphe.



Figures 10 et 11 : Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/mg prot) dans les branchies (10) et l'hémolymph (11) de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

• **Deltaméthrine :**

L'activité de la GPx dans les branchies varie entre $2,5 \pm 1,7$ et $10,3 \pm 5,3$ nmol NADPH/min/mg protéine (Figure 12).

Nous avons réussi à détecter la présence d'une interaction significative entre les différents temps et traitements par l'ANOVA ($P=0,034$). En effet, nous observons une augmentation significative ($P=0,016$) de l'activité de cette enzyme au cours du temps au traitement $0,1 \mu\text{g/l}$. Cette tendance n'est nullement identifiée pour les trois autres traitements (Contrôle ; $0,001 \mu\text{g/l}$ et $0,01 \mu\text{g/l}$). Nous remarquons également une diminution de l'activité de cette enzyme au jour 4+7 chez des crevettes issues du groupe contrôle et du groupe exposé à $0,001 \mu\text{g/l}$.

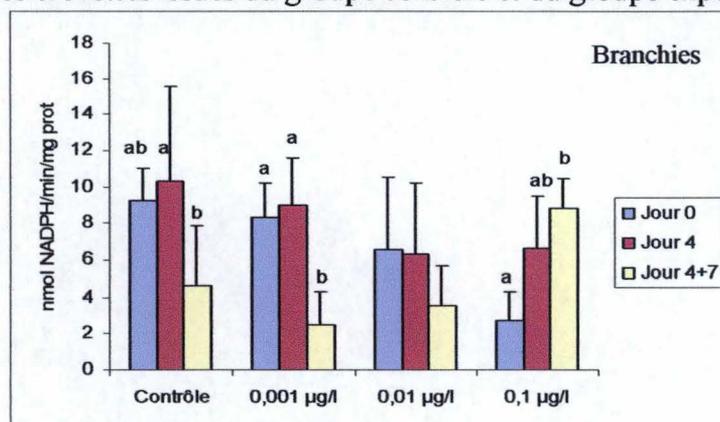
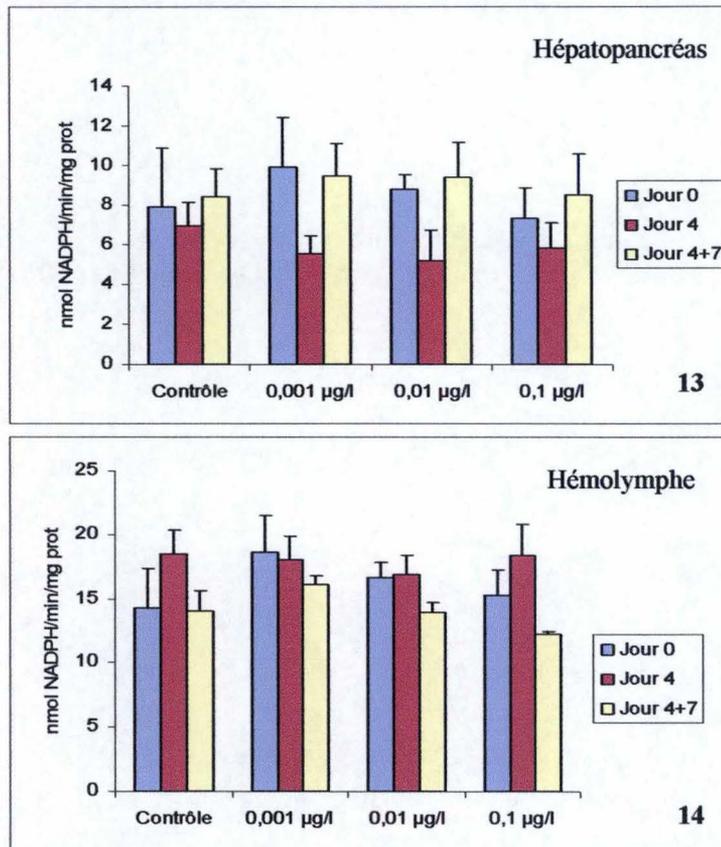


Figure 12 : Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/mg prot) dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

Dans l'hépatopancréas, l'activité de la GPx est comprise entre $5,2 \pm 1,6$ et $9,9 \pm 2,5$ nmol NADPH/min/mg protéine (Figure 13). Tandis que dans l'hémolymphe, elle est comprise entre $12,2 \pm 0,3$ et $18,6 \pm 2,9$ nmol NADPH/min/mg protéine (Figure 14).

Nous ne sommes pas parvenu à détecter la présence d'une interaction significative entre les différents temps et traitements par l'ANOVA. Cependant, les test ANOVA montrent un effet hautement significatif du temps dans l'hépatopancréas ($P=0,003$) et très hautement significatif dans l'hémolymphe ($P=0,0001$). Les tests LSD mettent en évidence une différence hautement significative entre les jours 0 et 4 ($P=0,005$) et entre les jours 4 et 4+7 ($P=0,0017$) dans l'hépatopancréas. Quant à l'hémolymphe, chaque jour diffère des autres.



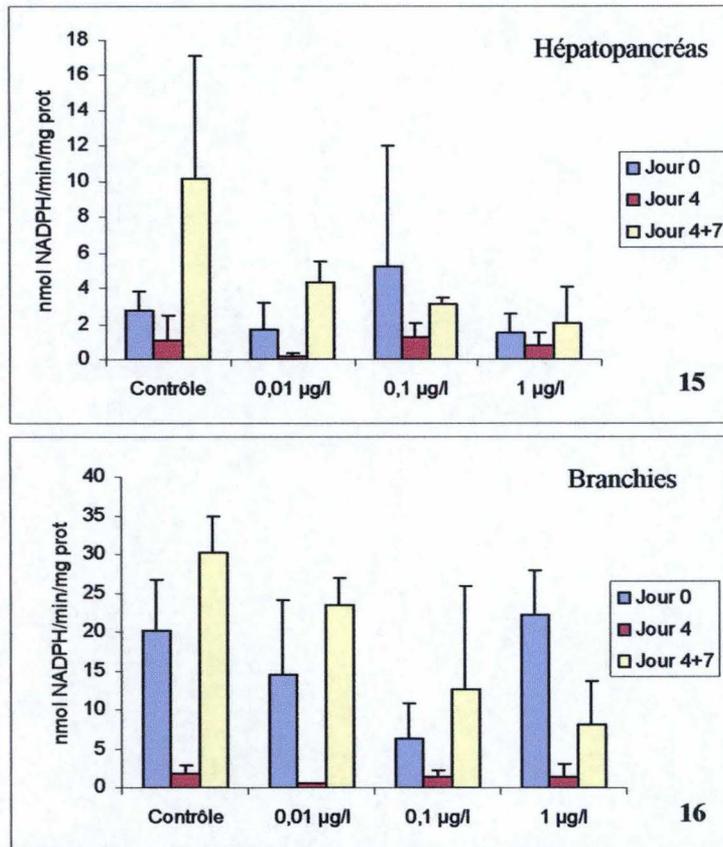
Figures 13 et 14 : Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/mg prot) dans l'hépatopancréas (13) et l'hémolymphe (14) de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

2.4. Dosage de l'activité de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)

• Endosulfan :

L'activité de la G6PDH est comprise entre $0,2 \pm 0,2$ et $10,2 \pm 7,0$ nmol NADPH/min/mg de protéine dans l'hépatopancréas et entre $0,65 \pm 0,01$ et $30,2 \pm 4,7$ nmol NADPH/min/mg de protéine dans les branchies (Figures 15 et 16).

Globalement, nous observons une diminution nette de l'activité de cette enzyme quatre jours après traitement dans les deux organes tous traitements confondus. L'analyse statistique n'a pas décelé la présence d'une interaction significative entre les différents traitements et temps mais a révélé un effet hautement significatif du temps ($P=0,01$) dans les branchies. Cet effet se marque entre les jours 0 et 4 ($P=0,014$) et entre les jours 4 et 4+7 ($P=0,010$).



Figures 15 et 16 : Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (nmol NADPH/min/mg prot) dans l'hépatopancréas (15) et les branchies (16) suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

• **Deltaméthrine :**

L'activité de la G6PDH varie entre $1,9 \pm 0,9$ et $16,4 \pm 4,2$ nmol NADPH/min/mg de protéine dans l'hépatopancréas et entre $0,54 \pm 0,04$ et $30,9 \pm 0,7$ nmol NADPH/min/mg de protéine dans les branchies (Figures 17 et 18).

La présence d'une interaction entre les différents traitements et temps n'a pas pu être mise en évidence par les tests statistiques. Toutefois, le test de l'ANOVA montre qu'il existe une différence significative entre les différents temps dans l'hépatopancréas ($P=0,03$) et dans les branchies ($P=0,005$). Dans l'hépatopancréas, le test LSD indique que cette différence se marque entre les jours 4 et 4+7 ($P=0,03$) alors que dans les branchies, elle se marque entre les jours 0 et 4 ($P=0,001$) et entre les jours 4 et 4+7 ($P=0,002$).

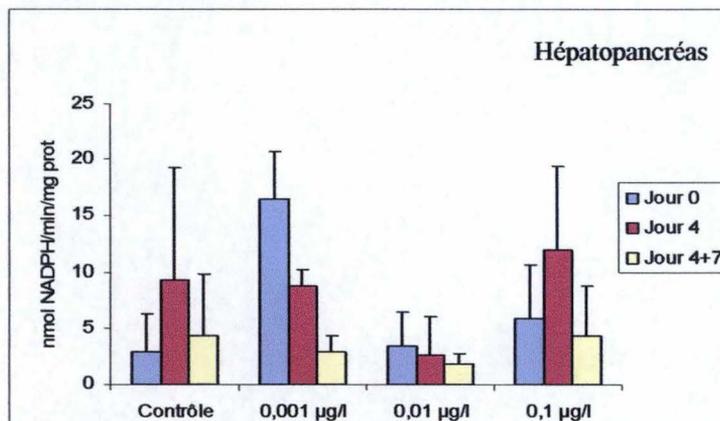


Figure 17 : Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (nmol NADPH/min/mg prot) dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

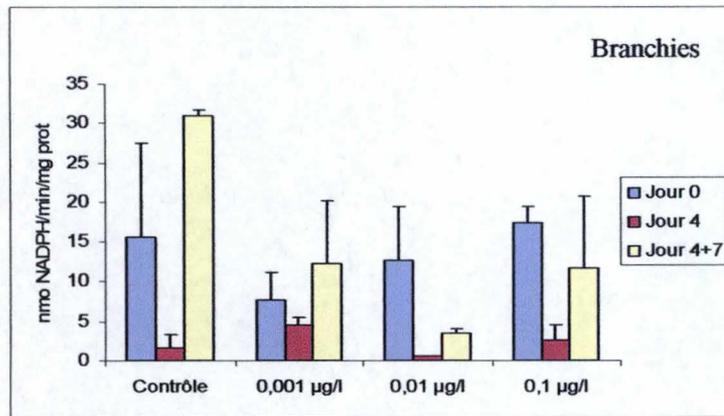


Figure 18 : Activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (nmol NADPH/min/mg prot) les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

2.5. Dosage de l'activité de la glutathion S-transférase (GST)

• Endosulfan :

Dans l'hépatopancréas, l'activité de la GST varie entre $30,7 \pm 12,3$ et $106,8 \pm 13,6$ nmol CDNB/min/mg de protéine (Figure 19).

Nous observons une diminution nette de l'activité de cette enzyme quatre jours après le début des contaminations tous traitements confondus. En effet, bien que le test de l'ANOVA ne soit pas parvenu à révéler l'existence d'une interaction, nous avons réussi à mettre en évidence une différence très hautement significative entre les différents temps ($P=0,0003$). Le test LSD consécutif a permis de déceler la différence très hautement significative entre le jour 0 et le jour 4 ($P=0,0003$) ainsi qu'entre le jour 4 et le jour 4+7 ($P=0,0005$).

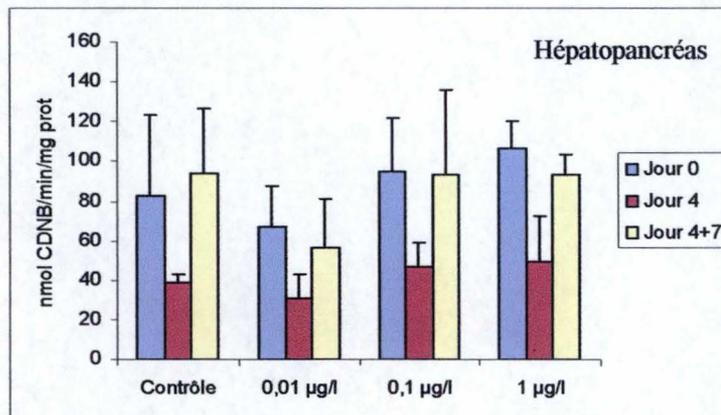


Figure 19 : Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) dans l'hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

L'activité moyenne de la GST dans les branchies est comprise entre 93,1 et 147,0 nmol CDNB/min/mg de protéine avec des valeurs minimales de 86 nmol CDNB/min/mg de protéine pour le contrôle au jour 0 et des valeurs maximales de 181 nmol CDNB/min/mg de protéine concernant la dose 1 µg/l au jour 4+7 (Figure 20).

Les tests statistiques n'ont pas révélé de différence significative entre les différents temps ni entre les différents traitements.

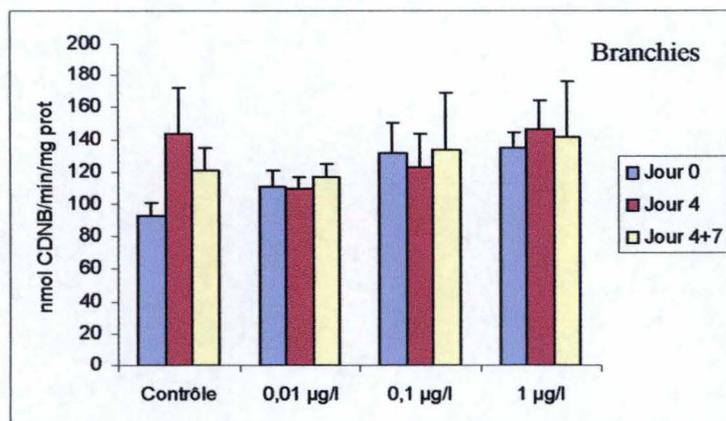


Figure 20 : Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à l’endosulfan (Jour 4) suivie d’une période de décontamination (Jour 4+7).

• **Deltaméthrine :**

L’activité de la GST est comprise entre $56,7 \pm 24,5$ et $132,6 \pm 31,1$ nmol CDNB/min/mg de protéine dans l’hépatopancréas et entre $84,9 \pm 8,4$ et $138,3 \pm 8,9$ nmol CDNB/min/mg de protéine dans les branchies (Figures 21 et 22).

Les tests statistiques ont décelé la présence d’une interaction significative entre les différents temps et traitements dans les deux organes ($P=0,017$ pour l’hépatopancréas et $P=0,023$ pour les branchies).

Au traitement 0,001 µg/l, nous observons une diminution ($P=0,009$) et une augmentation hautement significative ($P=0,001$) de l’activité de la GST au jour 4 respectivement dans l’hépatopancréas et les branchies. Dans l’hépatopancréas, une augmentation significative ($P=0,02$) de l’activité de cette enzyme est observée quatre jours après le début des contaminations dans le groupe contrôle. Dans les branchies, aux traitements ‘contrôle’ et 0,01 µg/l, nous observons également une diminution significative de l’activité de la GST au jour 4+7.

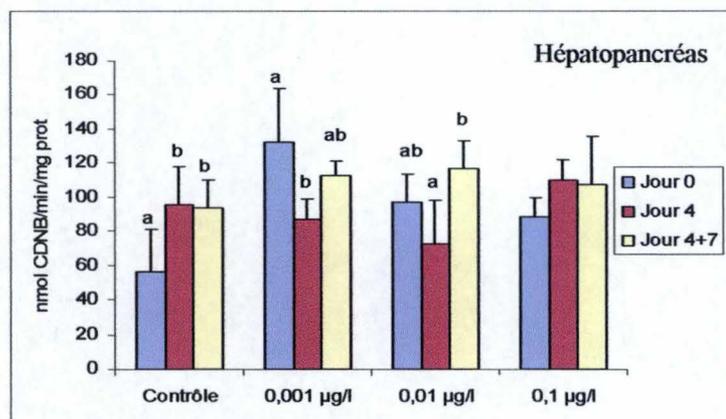


Figure 21 : Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) dans l’hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d’une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

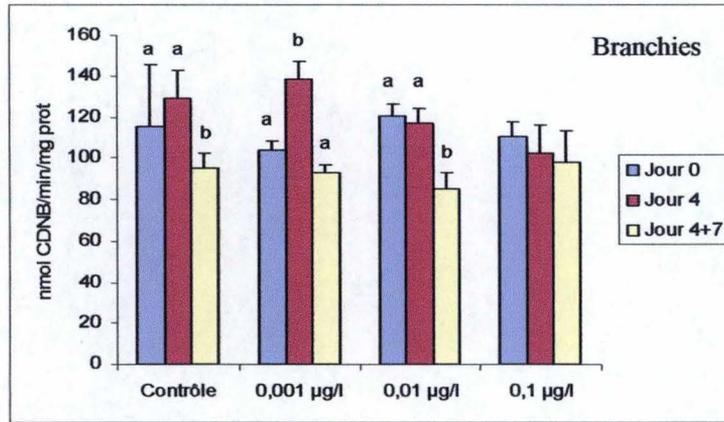


Figure 22 : Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d’une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

2.6. Dosage de l’activité de la catalase (CAT)

- **Endosulfan :**

L’activité de cette enzyme varie entre $0,0092 \pm 0,0019$ et $0,0188 \pm 0,0009$ U/mg protéine dans l’hépatopancréas et entre $0,0229 \pm 0,0105$ et $0,0476 \pm 0,002$ nmol U/mg protéine dans les branchies (Figures 23 et 24).

Nous n’avons pas réussi à déceler l’effet d’une interaction entre les différents traitements et temps par l’ANOVA dans les deux organes étudiés. Toutefois, un effet significatif du temps a été mis en évidence par l’ANOVA ($P=0,002$) dans l’hépatopancréas. Le test LSD identifie une différence très hautement significative entre les jours 0 et 4 ($P=0,0007$). Une autre différence significative a été décelée entre le jour 4 et le jour 4+7 ($P=0,013$).

Quant aux branchies, nous avons réussi à montrer une différence significative entre les différents traitements ($P=0,043$). Le test LSD indique que cette différence se marque en faveur du traitement 0,01 µg/l par rapport aux deux derniers traitements (0,1 µg/l et 1 µg/l).

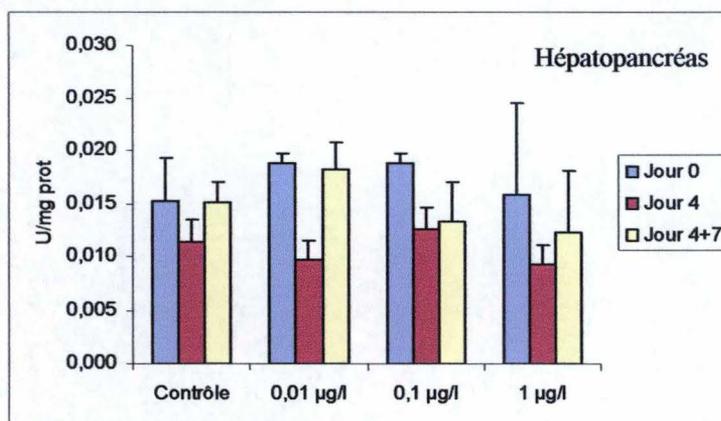


Figure 23 : Activité de la catalase (U/mg prot) dans l’hépatopancréas de la crevette tigrée suite à une contamination à l’endosulfan (Jour 4) suivie d’une période de décontamination (Jour 4+7).

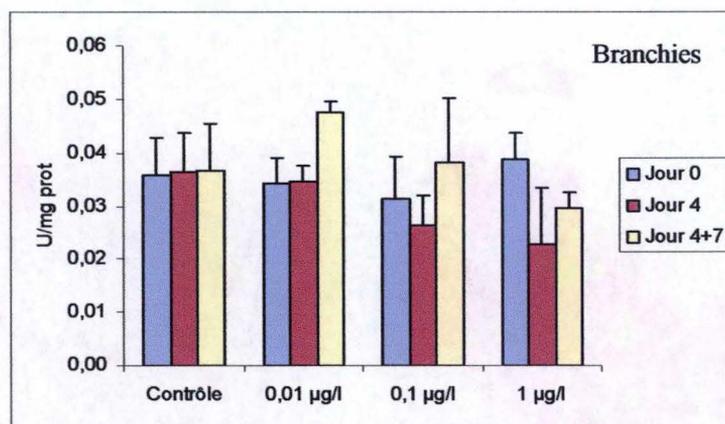


Figure 24 : Activité de la catalase (U/mg prot) dans les branchies de la crevette tigrée suite à une contamination à l'endosulfan (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7).

• **Deltaméthrine :**

L'activité de la catalase est comprise entre $0,0084 \pm 0,0019$ et $0,0276 \pm 0,0024$ U/mg protéine dans l'hépatopancréas et entre $0,0201 \pm 0,0373$ et $0,0474 \pm 0,0073$ nmol U/mg protéine dans les branchies.

Les tests statistiques nous ont permis de mettre en évidence la présence d'une interaction significative entre les différents temps et traitements aussi bien dans l'hépatopancréas ($P=0,014$) que dans les branchies ($P=0,034$).

Dans l'hépatopancréas, nous observons une diminution très hautement significative de l'activité de cette enzyme après quatre jours d'exposition à $0,001 \mu\text{g/l}$ ($P=0,0001$). Quant aux branchies, à la plus faible concentration, nous observons une augmentation de l'activité de la CAT au jour 4 suivie d'une diminution significative au jour 4+7. Dans les trois autres traitements, l'augmentation au jour 4 n'est pas identifiée.

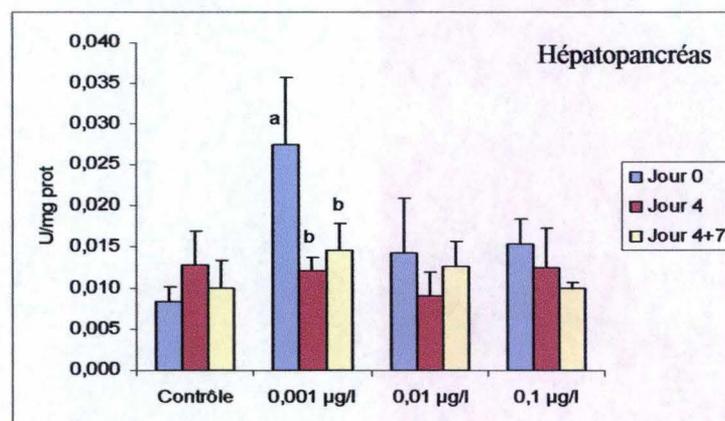


Figure 25: Activité de la catalase (U/mg prot) dans l'hépatopancréas suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

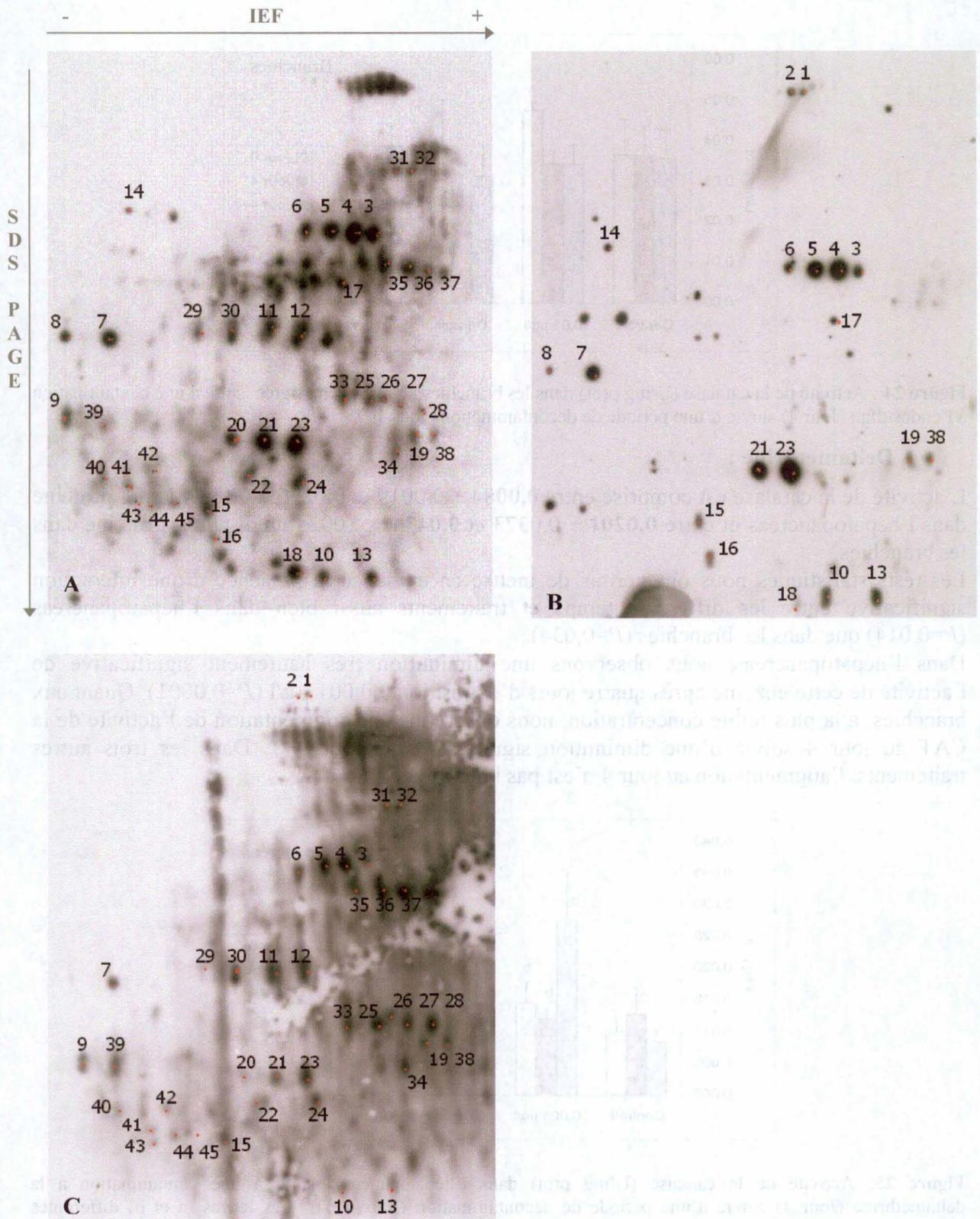


Figure 27 : Les échantillons de ces films proviennent de branchies de crevettes tigrées non traitées.
A : bassin 3 ; **B :** bassin 5 ; **C :** bassin 11
 (IEF : IsoElectric Focusing ; SDS PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

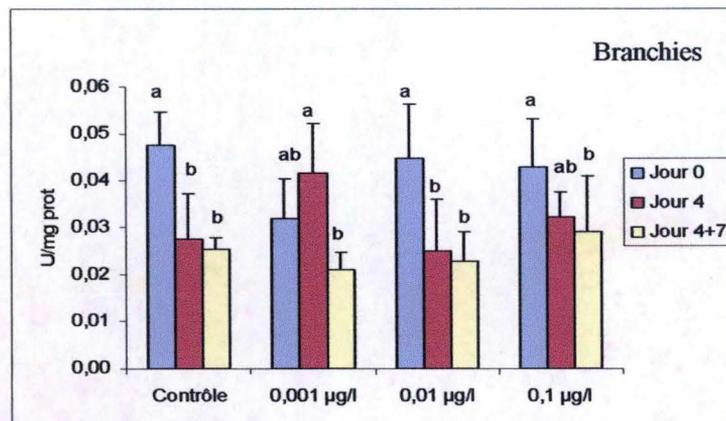


Figure 26 : Activité de la catalase (U/mg prot) dans les branchies suite à une contamination à la deltaméthrine (Jour 4) suivie d'une période de décontamination (Jour 4+7). Les lettres (a et b) différentes représentent une différence significative entre les différents temps dans chaque traitement pris indépendamment.

3. Analyse protéomique

Etant donné les résultats obtenus avec les biomarqueurs, nous avons choisi de travailler avec la deltaméthrine et plus précisément d'étudier la condition test correspondant à 0,1 µg/l sur les branchies de crevettes prélevées au jour 0 avant contamination et au jour 4, soit en fin de contamination. En effet, un effet de peroxydation des lipides a été mis en évidence dans les branchies à la concentration de deltaméthrine la plus élevée (Figure 4).

Rappelons que la présente analyse est utilisée dans le but de mettre en évidence un éventuel état d'oxydation des protéines suite à une exposition à un pesticide. Bien que la formation de groupements carbonyles ne soit pas le seul marqueur biologique de l'oxydation des protéines, ces groupements peuvent être facilement détectés après dérivatisation au 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) par diverses méthodes. Parmi ces méthodes, nous avons retenu le procédé immunologique.

Une révélation par chémiluminescence a permis d'obtenir pour chacun des 6 gels 2D réalisés, un film présentant une série de spots de protéines carbonylées (Figures 27 et 28). Nous avons également réalisé un gel coloré au nitrate d'argent (Figure 30). Ce dernier donne un aperçu de l'ensemble des protéines présentes dans l'échantillon.

Nous avons procédé à l'analyse des différents films de manière visuelle. Dans un premier temps, nous avons superposé les films correspondant au même jour dans le but de faire coïncider les spots de protéines entre eux. Les spots de protéines retrouvés sur au moins deux des trois répliquats sont numérotés.

Dans les branchies de crevettes non traitées (jour 0), nous avons pu faire coïncider 45 spots de protéines carbonylées (Figure 27). Cependant, seulement 12 (numéros 3 à 7, 10, 13, 15, 19, 21, 23 et 38) de ces spots sont présents sur les trois films. De plus, nous observons que les films A et C sont fort semblables avec 38 spots de protéines localisés approximativement à la même place.

Après quatre jours de contaminations, nous ne retrouvons plus que 38 spots de protéines carbonylées présents dans au moins 2 gels dont 8 (numéros 3 à 7, 11, 46 et 49) sont présents sur les trois répliquats (Figure 28).

En comparant les profils d'expression protéique des différents films, nous observons que le degré de carbonylation n'est pas plus élevé au jour 4 après contamination qu'au jour 0.

Par la suite, sur base de cette superposition de triplicats, nous avons dessiné un 'gel moyen' pour chacun des deux temps (Figure 29). Le gel moyen correspondant au jour 0 présente les 45 spots de protéines carbonylées communs à minimum 2 des films A, B et C. Quant au gel

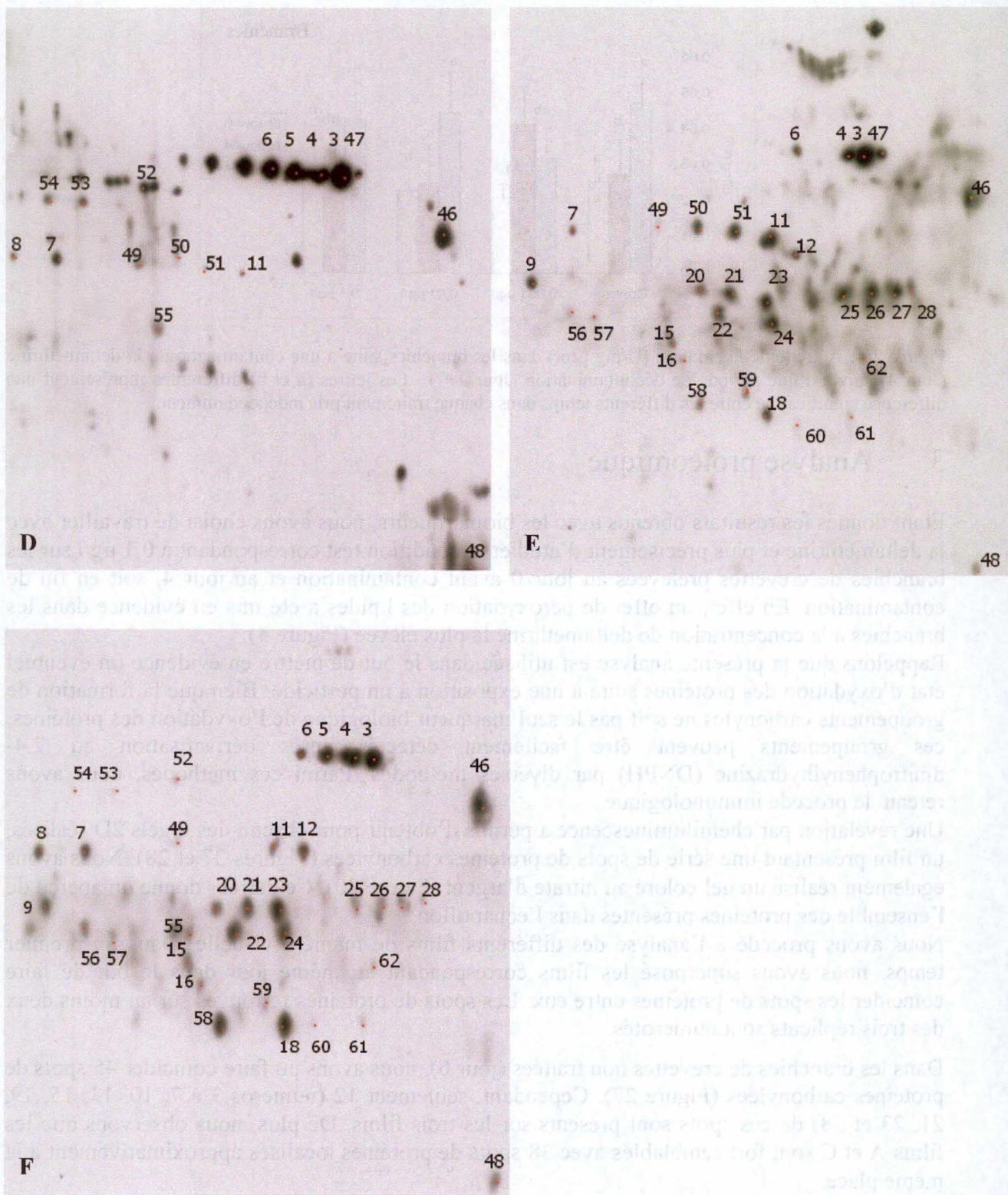


Figure 28 : Les échantillons de ces films proviennent de branchies de crevettes tigrées traitées à la deltaméthrine (0,1 µg/l) après quatre jours de contamination.
D : bassin 3 ; **E** : bassin 5 ; **F** : bassin 11.

Troisième partie : Résultats

moyen correspondant au jour 4, il reprend les 38 spots identiques sur au minimum 2 des films D, E et F. En comparant ces deux gels moyens, nous pouvons observer que certains spots de protéines carbonylées ne se retrouvent que dans un seul des deux gels. En effet, 17 protéines sont nouvellement oxydées avec la deltaméthrine alors que 23 protéines carbonylées au jour 0 avant contamination n'apparaissent plus après une exposition de quatre jours à 0,1 µg/l de deltaméthrine. Cette comparaison est intéressante dans le sens où nous pourrions ainsi mettre en évidence une modification de l'état d'oxydation des protéines non présentes dans les deux conditions (Jour 0 et jour 4).

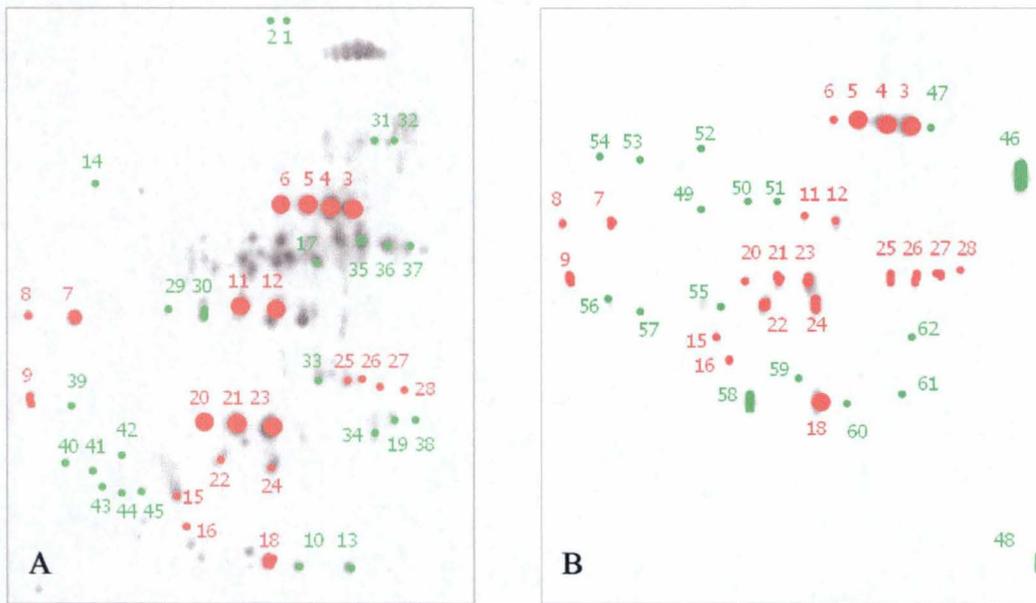


Figure 29 : Gels moyens. **A :** gel moyen correspondant au jour 0 ; **B :** gel moyen correspondant au jour 4. Les spots de protéines carbonylées retrouvés dans les deux gels sont colorés en rouge alors que ceux présents uniquement dans un des deux gels sont colorés en vert.

Le gel coloré au nitrate d'argent (Figure 30) sera utile dans de futures études afin d'identifier en spectrométrie de masse, les spots de protéines carbonylées qui ne sont pas présents sur les deux gels moyens et plus particulièrement ceux qui sont oxydés au jour 4. Nous avons eu beaucoup de mal à faire coïncider les spots de protéines carbonylées des 6 films précédents avec ceux du gel ci-contre. En effet, nous observons un bruit de fond assez important. De ce fait, un grand nombre de protéines sont saturées. De plus, nous observons la présence d'un grand nombre de protéines.

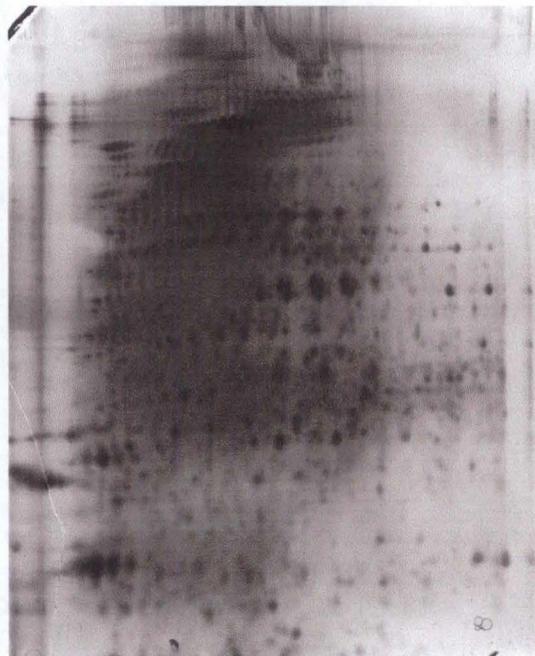


Figure 30 : Gel coloré au nitrate d'argent.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Nous savons que de nombreux composés chimiques et biologiques sont utilisés dans les élevages de crevettes en Asie. Les principales raisons de l'utilisation de ces produits sont liées aux problèmes engendrés par l'augmentation des densités d'élevage, et par conséquent à la détérioration de la qualité de l'eau et au risque élevé de maladies. Parmi ces nombreux produits, on retrouve les fertilisants, désinfectants, antibiotiques, pesticides et probiotiques. Ces substances ont des effets néfastes sur l'environnement aquatique, les écosystèmes terrestres adjacents, la santé humaine et la sécurité alimentaire. Ce cocktail de substances peut également avoir un impact négatif sur la santé des crevettes cultivées (Gräslund *et al.*, 2003). L'exposition à ces produits peut augmenter le niveau de stress des crevettes et dès lors diminuer leur croissance et/ou augmenter leur sensibilité aux infections (Reyes *et al.*, 1999 ; Le Moullac et Haffner, 2000) conduisant dès lors à une augmentation dans l'emploi de ces substances. Selon Bainy (2000), les désinfectants, antibiotiques, pesticides, fertilisants et autres ont tous le potentiel d'engendrer des effets toxiques sur les crevettes cultivées.

Plusieurs études ont montré que certains pesticides dont l'endosulfan et la deltaméthrine sont capables d'induire des dommages oxydatifs chez des organismes contaminés (voir première partie : Introduction point 4). Au vu de ces études, nous nous sommes demandés si l'utilisation de l'endosulfan et de la deltaméthrine dans les élevages de crevettes géantes tigrées n'avait pas un effet sur l'état de stress oxydant chez ces dernières.

La métabolisation de certains pesticides s'accompagne d'une production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) responsables d'un stress oxydant. La formation d'espèces réactives est une conséquence normale de nombreuses réactions biochimiques essentielles à l'organisme. Mais ces ROS peuvent devenir nuisibles si elles sont produites en excès et si les systèmes antioxydants ne parviennent plus à les éliminer ou à contrecarrer leurs effets. Une des caractéristiques du stress oxydant est la peroxydation des lipides membranaires par des radicaux hautement réactifs (Ribera *et al.*, 1991). Les membranes biologiques contiennent des acides gras polyinsaturés qui sont d'excellentes cibles pour les attaques par des ROS hautement réactives. Les ROS exercent également leurs effets sur d'autres constituants cellulaires comme les protéines, les acides nucléiques et les polysaccharides (Lagadic *et al.*, 1997).

- *Conséquences biochimiques du stress oxydant*

De nombreux auteurs rapportent l'utilisation du niveau de peroxydation des lipides en tant que biomarqueur d'exposition à divers contaminants. Par exemple, après avoir exposé des moules *Mytilus edulis* à 1 mg/l de CCl₄ et de ménadione, Ribera *et al.* (1991) ont observé une augmentation des taux de LPO dans la glande digestive après deux jours d'exposition. Cela représente un indice des dommages oxydatifs provoqués chez ces moules. Chez des poissons d'eau douce *Wallago attu* vivant dans des sites pollués de la rivière Yamuna (Inde), les valeurs de LPO étaient augmentées dans le foie, les reins et les branchies avec des valeurs respectivement de 38, 52 et 79 nmol de MDA/g tissu (Pandey *et al.*, 2003).

Dans notre étude, aucun des deux pesticides ne semble avoir d'effet sur l'oxydation des lipides hépatiques. En effet, aucune tendance ne peut être observée lors de l'exposition à l'endosulfan. Quant à la seconde exposition à la deltaméthrine, nous observons que les profils d'évolution des taux de LPO au cours du temps sont similaires dans les trois groupes traités ainsi que dans le groupe contrôle. Au vu de ces résultats, nous ne pouvons penser qu'il s'agisse d'un effet du pesticide. Le niveau de LPO hépatique mesuré chez la crevette tigrée,

varie entre $85,1 \pm 8,5$ et $192,6 \pm 38,1$ nmol MDA/g tissu. Dans leurs travaux, Ozcan Oruç et Üner (2000) n'avaient pas mis en évidence une augmentation des concentrations en MDA dans le foie de poissons *Oreochromis niloticus* exposés à deux pesticides (2,4-D et azinphosmethyl).

Dans les branchies, la situation est quelque peu différente. Nous pouvons dire qu'une tendance non significative à la lipoperoxydation est observée après quatre jours d'exposition chez les organismes issus des deux derniers groupes traités à l'endosulfan ($0,1 \mu\text{g/l}$ et $1 \mu\text{g/l}$) où des valeurs respectivement de $52,9 \pm 28,9$ et $63,8 \pm 34,3$ nmol MDA/g tissu ont été enregistrées. De plus, nos résultats indiquent que la deltaméthrine a un effet de peroxydation lipidique sur les branchies d'organismes exposés durant quatre jours à une concentration de $0,1 \mu\text{g/l}$ ($64,3 \pm 3,2$ nmol MDA/g tissu). Cet effet de la deltaméthrine à la concentration la plus élevée est transitoire. En effet, nous pouvons observer une diminution significative du niveau de LPO après sept jours de décontamination. Remarquons également un taux de LPO significativement élevé après la période de décontamination chez des crevettes exposées à $0,001 \mu\text{g/l}$ de deltaméthrine ($75,1 \pm 17,7$ nmol MDA/g tissu).

Si on sait que la peroxydation des lipides est un indicateur de l'état général de stress oxydant, les branchies de crevettes exposées aux deux pesticides étudiés semblent subir un tel stress.

Plusieurs études ont démontré la capacité de la deltaméthrine (Sayeed *et al.*, 2003 ; Atif *et al.*, 2005 ; Parvez *et al.*, 2006) et de l'endosulfan (Pandey *et al.*, 2001) à augmenter les taux de LPO dans le foie, les reins et les branchies du poisson *Channa punctatus*. De telles augmentations furent également observées chez la truite arc-en ciel *Oncorhynchus mykiss* après une exposition à l'endosulfan (Dorval *et al.*, 2003).

Les résultats obtenus lors de ces études suggèrent que la branchie est l'organe le plus sensible à la peroxydation des lipides. Ainsi, dans l'étude de Atif *et al.* (2005), une exposition de 48h à la deltaméthrine ($0,75 \mu\text{g/l}$) provoque une augmentation significative des valeurs de LPO dans le foie, les reins et les branchies du poisson *Channa punctatus*. L'augmentation la plus élevée était enregistrée dans les branchies (53 %). Chez ces mêmes poissons, suite à une exposition de 24h à l'endosulfan (5 ppb), les valeurs de LPO étaient également augmentées dans les trois organes avec des taux doublés dans les branchies (Pandey *et al.*, 2001).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces taux élevés de LPO dans les branchies. En effet, en plus d'un potentiel antioxydant relativement faible (Sayeed *et al.* 2003), la branchie est le premier lieu d'absorption des polluants chez les organismes aquatiques. Les branchies sont également en contact direct avec les pesticides. Rappelons que les contaminations effectuées dans ce travail ont été réalisées via l'eau. De plus, dans leur travaux, Arun et Subramanian (1998) se sont intéressés à l'activité d'enzymes antioxydantes (SOD, CAT, GPx et GST) dans l'hépatopancréas, les branchies et les muscles de crevettes *Macrorachium malcolmsonii* sub-adultes. De leurs analyses, il ressort une activité enzymatique antioxydante nettement supérieure au niveau de l'hépatopancréas.

Dans de futures études, il serait intéressant d'analyser la concentration en pesticides présente dans l'eau, ainsi que dans les différents organes étudiés. Ces analyses pourraient donner une idée de la quantité de pesticides directement en contact avec les branchies, et leurs capacités à pénétrer dans l'organisme des animaux contaminés. Ces analyses pourraient également apporter des éléments d'explication aux effets observés sur les autres biomarqueurs potentiels testés dans ce travail.

Dans notre étude, nous remarquons que, quel que soit le traitement, les valeurs de LPO sont plus élevées dans l'hépatopancréas que dans les branchies (3 à 5 fois). Cette différence rejoint les résultats obtenus par Cheung *et al.* (2002) sur la moule *Perna viridis*. En effet, ces auteurs ont retrouvés des taux de LPO compris entre 1,2 et 2,1 nmol de MDA/mg tissu dans les branchies et entre 8,9 et 12,8 nmol de MDA/mg tissu dans l'hépatopancréas.

- *Etat de carbonylation des protéines*

L'étude du protéome, ou ensemble des protéines exprimées par un système biologique à un moment donné et dans une condition spécifique, peut être une étape supplémentaire pour la compréhension des mécanismes d'action des pesticides.

Afin d'aller plus loin dans la mise en évidence de l'induction d'un éventuel stress oxydant par les pesticides, nous avons entrepris une étude originale d'analyse protéomique dans le but de déceler un éventuel état d'oxydation des protéines par la méthodologie des gels d'électrophorèse en deux dimensions.

Les principales études au niveau protéomique concernent le domaine biomédical. En ce qui concerne le domaine de l'écotoxicologie aquatique, quelques études utilisent l'analyse protéomique pour mettre en évidence des profils d'expression de protéines (PEPs) induits suite à l'exposition à un xénobiotique donné. Cela permet ainsi de caractériser au niveau protéomique, les modifications occasionnées par ce polluant. Nous retiendrons l'étude de Shepard *et al.*, 2000 qui a permis la mise en évidence des « Signatures d'Expression Protéique » (SEP) sur des moules *Mytilus edulis* exposées pendant 7 jours à du Cu, des PCBs, ou encore à une faible salinité. Ils montrèrent l'existence de différents PEPs suivant les conditions expérimentales. Cela peut être le reflet de stress spécifiques engendrés par de tels polluants (Shepard *et al.*, 2000).

Toutefois, un nombre croissant d'études s'intéresse à l'oxydation des protéines engendrée par une exposition aux contaminants de l'environnement. Ainsi, bien que la formation de groupements carbonyles ne soit pas le seul marqueur biologique de l'oxydation des protéines, Parvez et Raisuddin (2005) ont démontré que l'état de carbonylation des protéines peut être un biomarqueur potentiel du stress oxydant. Après avoir exposé des poissons *Channa punctatus* à la deltaméthrine, à l'endosulfan et au paraquat, ces auteurs ont observé une augmentation significative du contenu en protéines carbonylées dans le foie, les reins et les branchies après deux jours d'exposition. Cependant, la deltaméthrine semble être le pesticide responsable de l'augmentation la plus importante et les branchies s'avèrent être l'organe le plus vulnérable.

Dans notre étude, nous observons que le degré de carbonylation des protéines au niveau des branchies, n'est pas plus élevé après une exposition de quatre jours à 0,1 µg/l de deltaméthrine qu'au jour 0 avant contamination. En effet, il serait dangereux d'affirmer que le degré de carbonylation des protéines est plus élevé au jour 0 avant contamination car nous ne nous sommes basés que sur une analyse qualitative et non quantitative. Une analyse quantitative serait à envisager dans de futures études.

Pour expliquer cette absence d'augmentation du degré de carbonylation après quatre jours de contamination, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses. Nous resterons prudents quant à l'interprétation de ces résultats. Ainsi, nous pourrions penser à une éventuelle induction de protéines chaperonnes. Ce type de protéine est connu pour jouer un rôle dans le repliement, l'assemblage, la localisation intracellulaire ainsi que dans la dégradation des protéines (Dowling *et al.*, 2006). De plus, certaines de ces chaperonnes, sous conditions stressantes, semblent être impliquées dans la protection de l'organisme au niveau cellulaire (Olsson *et al.*, 2004). Ainsi, après avoir soumis des cellules de levures *Saccharomyces cerevisiae* et des bactéries *Escherichia coli* à une condition de stress oxydant correspondant à un traitement à l'H₂O₂, le rôle protecteur des chaperonnes Hsp6p et DnaK, respectivement, fut confirmé (Cabiscol *et al.*, 2000 et Tamarit *et al.*, 1998 in Costa *et al.*, 2002). Dans leurs travaux, après avoir exposé des palourdes *Ruditapes decussatus* à du DDE (*p,p'*-dichlorodiphényldichloroéthylène), Dowling *et al.* (2006) ont observé une augmentation du nombre de protéines carbonylées dans la glande digestive et le manteau. Ils ont également

observé que les taux des Hsp60 et 70 étaient les plus élevés dans la glande digestive et que ces taux ne semblaient pas être altérés suite à l'exposition au DDE. Quant à l'Hsp 90, elle n'est exprimée, ni dans la glande digestive, ni dans le manteau d'individus contrôles, mais elle apparaît au niveau du manteau d'individus traités. Nous pourrions également envisager que les systèmes de dégradation des protéines oxydées (par exemple, le protéasome) dégradent davantage de protéines.

Nous avons également pu observer une modification de l'état d'oxydation de certaines protéines dans la condition traitée par rapport à la condition contrôle et inversement. En effet, 17 protéines sont nouvellement oxydées avec la deltaméthrine alors que 23 protéines carbonylées au jour 0 avant contamination n'apparaissent plus après une exposition de quatre jours à 0,1 µg/l de deltaméthrine.

Suite aux résultats obtenus, nous pouvons penser que, même si aucune modification quantitative n'est observée, la deltaméthrine induit une modification qualitative de l'état de carbonylation du protéome. De plus, au vu des résultats obtenus par l'approche biochimique et protéomique, nous pouvons également penser que chez les crevettes, la deltaméthrine n'affecte pas les protéines de la même manière que les lipides. En effet, une tendance à la lipoperoxydation était observée dans les branchies après une exposition de quatre jours à 0,1 µg/l de deltaméthrine.

L'analyse protéomique développée dans ce travail pourrait donc être utilisée afin de mettre en évidence des biomarqueurs, dans ce cas des protéines spécifiquement carbonylées, dans le but de détecter la présence de la deltaméthrine dans les élevages de crevettes géantes tigrées ainsi que de s'assurer du bien-être des individus et optimiser la production aquacole. Toutefois, quelques améliorations pourraient être apportées. Une approche informatique serait à envisager afin d'analyser et de comparer les dizaines de spots de protéines entre un nombre plus important de gels. Ainsi, après coloration des gels à l'argent, les gels pourraient être scannés grâce à un densitomètre. Ce dernier analyserait chaque spot et lui assignerait une valeur proportionnelle à sa densité optique calculée sur la surface totale de chaque spot. Un logiciel informatique se chargerait alors de superposer les différents gels afin de faire coïncider les spots entre eux (*matching*).

Dans de futures études, il serait bien évidemment intéressant d'identifier les protéines présentant une modification de l'état d'oxydation et plus particulièrement celles qui sont oxydées après une exposition de quatre jours en couplant les gels 2D à la spectrométrie de masse. Cela nous renseignerait sur la nature des protéines et le rôle qu'elles tiennent dans les organismes étudiés. Cette identification nous permettrait également de comprendre les mécanismes d'action des polluants et les mécanismes de défense des organismes.

Une fois que les différents spots de protéines sont révélés au nitrate d'argent et que les protéines oxydées sont localisées, l'identification de protéines peut se faire. En résumé, les spots de protéines sont découpés des gels et digérés par une enzyme, souvent la trypsine. La solution polypeptidique ainsi obtenue est introduite dans le spectromètre de masse. Les peptides sont ensuite séparés dans le spectromètre en fonction du rapport entre leur masse et leur charge. A ce stade, l'identification de la protéine fait l'objet d'un choix entre deux stratégies : soit par comparaison de 'cartes de masses peptidiques' (spectromètre de type MALDI-TOF), soit par comparaison de séquences en acides aminés obtenues par MS/MS (spectromètre de type ESI Q-TOF MS/MS). Dans la continuité de ce travail, l'identification des protéines nécessiterait de travailler par homologie et d'aligner les séquences obtenues expérimentalement par MS/MS avec des séquences appartenant à des espèces différentes.

- Réponse des systèmes de défense antioxydants

Nous savons qu'afin de contrer l'action oxydante des radicaux libres, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants. La peroxydation des lipides n'exclut pas l'induction de ces systèmes de défense mais elle traduit leur inefficacité à enrayer une agression toxique. Elle peut avoir lieu en présence d'activités antioxydantes augmentées, l'induction pouvant être insuffisante pour faire face au stress (Lagadic *et al.*, 1997). Dès lors, intéressons-nous à la réponse de certains de ces systèmes antioxydants.

Le glutathion joue un rôle à divers niveaux dans la lutte contre le stress oxydant et vient renforcer l'action des enzymes antioxydantes. Le glutathion, un tripeptide γ glutamyl-cystéinyl-glycine, est le thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules ; une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydant. Il intervient comme donneur d'électrons permettant de désactiver les ROS comme OH° , mais il sert surtout comme substrat aux glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes. Ce thiol non protéique intervient également dans la conjugaison de substances électrophiles, lesquelles sont catalysées par des glutathion S-transférases (Nordberg et Arnér, 2001 ; van der Oost *et al.*, 2003). Les enzymes antioxydantes peuvent être inactivées par les radicaux OH° , la présence de systèmes antioxydants non enzymatiques (comme le glutathion) est essentielle afin de neutraliser ces radicaux. Les taux de glutathion totaux sont régulés par diverses enzymes mais ils dépendent principalement de l'équilibre entre les taux de synthèse, de conjugaison (via la GST), d'oxydation (via la GPx) et de réduction du GSSG en GSH (via la GR) (Peña-Llopis *et al.*, 2003).

Souvent, les taux de GSH totaux sont augmentés suite à une exposition à des substances polluantes. Chez des moules *Perna perna* exposées au paraquat (un herbicide dichloride) et au plomb, les contenus en GSH totaux et en GSSG étaient augmentés dans la glande digestive après deux jours d'exposition. Quant aux rapports GSH/GSSG, ils étaient significativement diminués (Dafre *et al.*, 2004). De même, après avoir exposé des anguilles *Anguilla anguilla* à 1,5 mg/l de dichlorvos (insecticide organophosphoré), Peña-Llopis *et al.* (2003) ont observé une diminution des concentrations en GSH réduit dans le foie. Ces mêmes auteurs ont trouvé que des anguilles capables de préserver ou d'augmenter la valeur du rapport GSH/GSSG, survivent plus longtemps à une exposition au dichlorvos que les individus avec un rapport fortement diminué.

Dans plusieurs études, il est rapporté que des poissons *Channa punctatus* exposés à la deltaméthrine et à l'endosulfan présentent des concentrations en GSH réduit augmentées (Pandey *et al.*, 2001 ; Sayeed *et al.* 2003 ; Atif *et al.*, 2005 ; Parvez *et al.*, 2006). Il en est de même chez des poissons d'eau douce *Wallago attu* vivant dans des sites pollués de la rivière Yamuna (Inde) (Pandey *et al.*, 2003). Cette augmentation est décrite comme un mécanisme adaptatif et protecteur mis en place par les organismes aquatiques lors d'un stress oxydant modéré. Néanmoins, lorsque ce dernier perdure, une diminution des concentrations en GSH réduit s'observe (Zhang *et al.*, 2004). Cette diminution pourrait traduire l'inefficacité du GSH à protéger l'organisme contre d'éventuels dommages oxydatifs à long terme. Une telle diminution a été observée par Dorval *et al.* (2003) dans des cellules adénocorticales de truites arc-en ciel *Oncorhynchus mykiss* incubées en présence d'endosulfan.

Au vu des résultats que nous avons obtenu dans l'hépatopancréas d'individus exposés à l'endosulfan, nous pourrions penser que les individus soumis à la concentration la plus élevée (1 $\mu\text{g/l}$), exposeraient des taux en GSH plus faibles après quatre jours de contamination que ceux présents dans les autres groupes. Dès lors, la protection et la neutralisation des radicaux

libres dans ces individus pourraient être diminuées ce qui augmenterait leur stress oxydant. Toutefois, les taux de LPO chez ces mêmes individus ne semblent pas altérés. Nous pouvons émettre l'hypothèse que d'autres systèmes de défense antioxydants sont suffisants pour éviter l'effet d'un stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés. Nous observons également une augmentation du contenu en GSH après la période de décontamination. Nous pouvons penser que le GSH est nécessaire pour détoxifier l'endosulfan et qu'après retrait du pesticide, l'organisme continue à en synthétiser davantage. Nous pourrions également envisager que le glutathion contribue à l'élimination de l'endosulfan via la GST. Cependant, dans notre cas, nous n'observons pas de lien avec cette enzyme. Néanmoins, suite à la perte des échantillons prélevés au jour 0 avant contamination, nous resterons prudents quant à l'interprétation des résultats obtenus.

Lorsque nous examinons les profils d'évolution des taux hépatiques de GSH en fonction du temps, nous remarquons que ces taux sont augmentés quatre jours après une exposition à 0,1 µg/l de deltaméthrine alors que dans les trois autres groupes, les taux ont tendance à diminuer. Remarquons que le profil obtenu suite au traitement 0,1 µg/l va dans le sens opposé à celui obtenu pour la peroxydation lipidique. Ce qui pourrait confirmer le rôle protecteur du glutathion. Quant aux branchies, l'effet du polluant se marque de nouveau à la concentration la plus élevée en deltaméthrine où nous observons une augmentation des teneurs en GSH au cours du temps. La faible concentration en GSH mesurée quatre jours après une exposition à 0,1 µg/l de deltaméthrine ainsi que l'augmentation de cette concentration après la période de décontamination pourrait expliquer les taux de LPO retrouvés dans ces mêmes conditions.

Dans de futures études, il serait intéressant d'analyser l'évolution de la valeur du rapport GSH/GSSG en mesurant également les taux de glutathion oxydés comme le suggèrent plusieurs auteurs. Selon Peña-Llopis *et al.* (2003), augmenter le rapport GSH/GSSG en réduisant le GSSG en deux molécules de GSH serait énergétiquement moins coûteux que de synthétiser du nouveau GSH.

Parmi ses nombreuses fonctions, nous savons que le glutathion contribue à l'élimination de substances électrophiles via une réaction de conjugaison catalysée par des glutathion S-transférases. La glutathion S-transférase réfère à un large groupe de protéines dimériques ubiquistes qui catalysent l'attaque nucléophile du GSH sur différentes espèces de composés toxiques. Les GSTs ont un grand rôle à jouer dans les systèmes de détoxification des organismes (van der Oost *et al.*, 2002).

Dans notre étude, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence un réel effet de l'endosulfan sur l'activité de la GST chez les individus contaminés. En examinant les résultats obtenus dans l'hépatopancréas, nous observons que les profils d'évolution de l'activité de la GST au cours du temps sont similaires quel que soit le traitement. Bien que les analyses statistiques montrent qu'il existe une différence très hautement significative entre les différents temps, au vu des profils similaires obtenus, nous ne pouvons penser qu'il s'agisse d'un effet du pesticide. Quant aux branchies, l'activité de la GST reste relativement constante. En effet, l'activité moyenne de la GST est comprise entre 93,1 et 147,0 nmol CDNB/min/mg prot. Dans un premier temps, nous pouvons envisager que l'activité de la GST maintenue constante dans les branchies de crevettes contaminées par l'endosulfan ait été suffisante pour éviter un stress oxydant. Toutefois, une tendance, bien que non significative, à la lipoperoxydation est observée dans les branchies d'individus exposés à 0,1 et 1 µg/l d'endosulfan. Deuxièmement, il est possible que la GST ne soit pas impliquée dans la détoxification de ce composé organochloré dans les branchies de crevettes tigrées. Cette deuxième hypothèse semble moins probable à la lumière des résultats obtenus par Pandey *et al.* (2001). En effet, après avoir exposé des poissons *Channa punctatus* à de l'endosulfan (5

ppb), ces auteurs avaient observé une augmentation de l'activité de la GST dans le foie, les reins et les branchies avec des valeurs respectivement de 499, 457 et 265 nmol de CDNB/min/mg prot après un jour d'exposition.

Dans l'hépatopancréas et les branchies, nous remarquons un effet de la déltaméthrine dans les groupes exposés à la plus faible concentration (0,001 µg/l). Une diminution significative de l'activité de la GST après quatre jours de contamination ($87,1 \pm 11,7$ nmol CDNB/min/mg prot) est observée dans l'hépatopancréas par rapport au jour 0 ($95,3 \pm 22,3$ nmol CDNB/min/mg prot). Quant aux branchies, nous observons une augmentation significative de cette dernière après quatre jours d'exposition ($138,3 \pm 8,9$ nmol CDNB/min/mg prot) suivie d'une diminution après décontamination ($93,1 \pm 3,7$ nmol CDNB/min/mg prot). Nous pouvons nous étonner d'une telle augmentation de l'activité de cette enzyme dans les branchies d'individus exposés à la plus faible concentration de deltaméthrine.

Enfin, les résultats assez variables obtenus dans notre étude rejoignent en grande partie ceux d'autres études concernant d'autres espèces exposées à des contaminants. Après avoir administré à des rats 6 et 30 mg/kg de diméthoate (pesticide organophosphoré), Sharma *et al.* (2005a) ont observé une augmentation de l'activité de la GST dans le foie. Par contre l'activité de cette même enzyme restait inchangée dans le foie de rats traités avec 75 et 90 mg/kg (Sharma *et al.*, 2005b). Dans l'étude de Haorau *et al.* (2004), des palourdes *Ruditapes decussatus* ont été exposées à deux pesticides organochlorés (4,4'DDE et methoxychlor) et à un fongicide (imidazol). Ces auteurs ont observé que l'activité de la GST mesurée dans l'hépatopancréas était toujours deux à cinq fois plus faible que dans les branchies et qu'elle ne semblait pas être altérée après une exposition de 48h aux trois pesticides. Par contre, l'activité de la GST augmentait significativement dans les branchies après une exposition aux deux composés organochlorés. Dans une autre étude, des poissons *Gambusia yucatanana* ont été contaminés par trois types de pesticides (chlorpyrifos, carbofuran et glyphosate). Aucun d'entre eux n'altérait l'activité de la GST dans les branchies excepté le carbofuran qui provoquait une réduction de l'activité de cette enzyme après 24h d'exposition (Rendon-von Osten *et al.*, 2005). De même, l'activité de la GST ne semblait pas être altérée au niveau du foie et des branchies de poissons *Oreochromis niloticus* exposés au 2,4-D et à l'aziphosmethyl (Ozcan Oruç et Üner, 2000 ; Ozcan Oruç *et al.*, 2004). Rehman *et al.* (2006) ont administré oralement de la deltaméthrine à des souris mâles. Cette administration était responsable d'une diminution de l'activité de la GST dans le foie et les reins des individus contaminés. Dans leur travaux, Atif *et al.* (2005) ont exposés des poissons *Channa punctatus* à la deltaméthrine (0,75 ppb) pendant 48h. Une augmentation de l'activité de la GST a été observée dans le foie, les reins et les branchies. Chez des moules *Perna perna* exposées au paraquat (10 ppm), Dafre *et al.* (2004) ont mis en évidence une diminution significative de l'activité de la GST dans la glande digestive après deux jours d'exposition.

Les enzymes impliquées dans la destruction du peroxyde d'hydrogène sont les glutathions peroxydases et les catalases. Ces deux enzymes antioxydantes majeures assurent la seconde ligne de défense contre le stress oxydant après les superoxydes dismutases. Les glutathions peroxydases sélénium-dépendante catalysent la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes, allant du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques. Toutefois, cette enzyme cytosolique semblerait plus active dans l'élimination des peroxydes organiques (Zhang *et al.*, 2004). En effet, elle aurait un rôle important dans l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'effet d'un stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (van der Oost *et al.*, 2003). Toutefois, l'activation de la glutathion peroxydase ne suffit pas toujours à empêcher la lipoperoxydation (Lagadic *et al.*, 1997). La catalase quant à elle, catalyse uniquement la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire. Sa localisation peroxysomale en fait une enzyme antioxydante complémentaire de la SeGPx

contre la peroxydation induite par le peroxyde d'hydrogène. Ces deux enzymes diffèrent par leur affinité respective pour les peroxydes d'hydrogène. La catalase et la GPx présentent des Km respectivement de 25 mM et de 1-10 μ M (Dandapat *et al.*, 2000). On comprend ainsi pourquoi le mécanisme adaptatif de la GPx face à un stress oxydant modéré semble se mettre en place plus rapidement (Zhang *et al.*, 2004).

L'activité de ces deux enzymes est donc susceptible de varier selon le composé toxique en fonction de la nature, de la quantité et de la localisation subcellulaire des ROS produits (Barata *et al.*, 2005).

Comme nous venons de l'expliquer, la littérature nous apprend que la réponse de l'activité des enzymes antioxydantes à l'exposition aux contaminants de l'environnement est changeante. Chez des poissons d'eau douce *Wallago attu* vivant dans des sites pollués de la rivière Yamuna (Inde), l'activité de la CAT était diminuée dans le foie, les reins et les branchies avec des valeurs respectivement de 156, 93 et 135 nmol de H₂O₂ consommée/min/mg prot. Par contre, la réponse de la GPx était variable d'un organe à l'autre. Ainsi, une augmentation de cette activité enzymatique fut mesurée dans les reins et les branchies alors que dans le foie, l'activité de la GPx était diminuée (Pandey *et al.*, 2003). Bainy *et al.* (1996) avaient également observé des réponses similaires de la CAT et de la GPx chez des poissons *Oreochromis niloticus* vivant dans un lac pollué. Vijayavel *et al.* (2004) ont soumis des crabes *Scylla serrata* à une condition de stress oxydant correspondant à une exposition au naphthalène. Les résultats ont montré une diminution de l'activité de la CAT et de la GPx dans l'hépatopancréas et l'hémolymphe. Dans l'étude de Ahmad *et al.* (2000), des poissons *Channa punctatus* ont été exposés à 1 % d'effluents d'usine à papier pendant 15, 30, 60 et 90 jours. Ces auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la GPx dans le foie au cours du temps alors que dans les reins et les branchies, une diminution de l'activité de cette enzyme était observée. Cette diminution démontre l'inefficacité des reins et des branchies à neutraliser l'impact des peroxydes. Après avoir exposés des poissons *Carassius auratus* au 2,4-dichlorophenol (herbicide), Zhang *et al.* (2004) ont observé une augmentation de l'activité de la CAT et de la GPx au niveau du foie après 40 jours d'exposition. Toutefois, à la plus faible concentration de 2,4-D (0,005 mg/l), l'activité de la CAT reste inchangée.

Après avoir exposé des poissons *Channa punctatus* à l'endosulfan, Pandey *et al.* (2001) ont observé une augmentation de l'activité de la GPx dans le foie, les reins et les branchies avec des valeurs respectivement de 228, 375 et 297 nmol NADPH oxydée/min/mg prot. L'activité de la CAT était quant à elle diminuée dans le foie, les reins et les branchies avec des valeurs respectivement de 66, 43 et 188 nmol H₂O₂ consommée/min/mg prot après un jour d'exposition. Dans l'étude de Barata *et al.* (2005), l'endosulfan ne semble pas altérer l'activité de la CAT chez des cladocères *Daphnia magna*. Cependant, une augmentation de l'activité glutathion peroxydasique fut observée. Dans leurs travaux, Atif *et al.* (2005) ont constaté une augmentation significative de l'activité de la GPx dans le foie et les reins de poissons *Channa punctatus* exposés à la deltaméthrine. Par contre, une diminution de l'activité de cette enzyme fut enregistrée dans les branchies. Ceci vient renforcer l'idée selon laquelle les branchies semblent plus vulnérables à une exposition aux contaminants de l'environnement.

L'ensemble de ces études nous indique que la réponse des activités glutathion peroxydasiques ne va pas toujours dans le même sens que celle de la catalase mais, que dans certains cas, une augmentation ou une diminution parallèle des activités de la GPx et de la CAT peut être observée.

Afin d'exposer au mieux les résultats obtenus dans notre étude, nous allons dans un premier temps, discuter de l'activité de la GPx et de la CAT au niveau de l'hépatopancréas.

Tout d'abord, nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence un effet de l'endosulfan sur l'activité de ces deux enzymes. En effet, nous constatons une activité de la GPx stable au

cours du temps et à travers les différents traitements avec une activité moyenne comprise entre 7,2 et 13,1 nmol NADPH/min/mg prot. Cela a été confirmé par les analyses statistiques. Nous pouvons envisager que l'activité de la GPx maintenue constante dans l'hépatopancréas de crevettes contaminées par l'endosulfan ait été suffisante pour éviter un stress oxydant. Cela renforcerait l'idée selon laquelle la GPx joue un rôle important contre l'oxydation des lipides (Dandapat *et al.*, 2000). Quant à l'activité de la CAT, nous observons que l'effet du temps décelé par ces mêmes analyses est similaire quel que soit le traitement. Au vu de ces résultats, nous ne pouvons penser qu'il s'agisse d'un effet du pesticide.

En examinant les résultats obtenus lors de l'exposition à la deltaméthrine, nous observons que les profils d'évolution de l'activité glutathion peroxydasique au cours du temps sont semblables quel que soit le traitement. Toutefois, une diminution, bien que non significative, plus marquée de l'activité de cette enzyme après quatre jours d'exposition peut être observée dans les trois groupes traités avec des valeurs respectivement de $5,5 \pm 0,9$; $5,2 \pm 1,6$ et $5,9 \pm 1,2$ nmol NADPH/min/mg prot par rapport au groupe contrôle ($7,0 \pm 1,2$ nmol NADPH/min/mg prot). Nous constatons également une diminution de l'activité de la catalase après quatre jours d'exposition chez les organismes issus des trois groupes exposés à la deltaméthrine. Remarquons une valeur anormalement élevée de l'activité de cette enzyme au jour 0 avant contamination dans le deuxième groupe ($0,001 \mu\text{g/l}$). Nous resterons prudents sur l'obtention de cette valeur.

Examinons maintenant l'activité de ces deux enzymes dans les branchies. Nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence un effet de l'endosulfan sur l'activité de ces deux enzymes. Toutefois, nous pouvons observer une diminution non significative de l'activité de ces deux enzymes chez des individus exposés pendant quatre jours à $0,1$ et $1 \mu\text{g/l}$. L'activité de la GPx est comprise entre $8,5 \pm 0,8$ et $15,3 \pm 1,2$ nmol NADPH/min/mg prot et celle de la CAT varie entre $0,023 \pm 0,01$ et $0,048 \pm 0,002$ U/mg prot dans les branchies de crevettes tigrées.

Ensuite, nos résultats indiquent que la deltaméthrine a un effet sur l'activité de la GPx et de la CAT au niveau des branchies. Nous pouvons observer une augmentation de l'activité de la GPx au cours du temps chez des crevettes exposées à $0,1 \mu\text{g/l}$ (de $2,7 \pm 1,6$ à $8,8 \pm 1,7$ nmol NADPH/min/mg prot). Dans les autres groupes, nous observons plutôt une diminution de l'activité de cette enzyme. L'augmentation de l'activité de la GPx au cours du temps pourrait être expliquée par l'augmentation du contenu branchial en GSH également observé au cours du temps chez les individus issus du traitement $0,1 \mu\text{g/l}$. Toutefois, l'induction de la GPx quatre jours après exposition semble être insuffisante pour faire face au stress oxydant. En effet, nous pouvons remarquer que les activités de la GPx enregistrées quatre jours après la contamination et après la période de décontamination chez les crevettes issues du traitement $0,1 \mu\text{g/l}$, vont dans le sens opposé aux taux de LPO mesurés dans les mêmes conditions. Quant à l'effet de la deltaméthrine sur l'activité de la catalase, il se marque dans les branchies d'individus issus du second groupe ($0,001 \mu\text{g/l}$). A cette concentration, nous pouvons observer une augmentation, bien que non significative, de l'activité de la CAT après quatre jours d'exposition ($0,041 \pm 0,01$ U/mg prot) suivie d'une diminution significative après la période de décontamination ($0,021 \pm 0,004$ U/mg prot) par rapport au jour 0 ($0,032 \pm 0,008$ U/mg prot).

En ce qui concerne l'activité de la GPx dans l'hémolymphe, il n'y a pas de modification de l'activité de cette enzyme après une exposition de quatre jours à l'endosulfan. La même constatation est réalisée après exposition à la deltaméthrine.

Dans de futures études, il serait intéressant de doser les biomarqueurs étudiés dans l'hémolymphe. Les activités enzymatiques dans l'hémolymphe sont parfois très faibles, d'où la nécessité de travailler avec de grandes quantités d'échantillon. Travailler sur l'hémolymphe aurait l'avantage d'être moins invasif et de ne pas tuer l'animal. Cela permettrait un suivi plus

facile des biomarqueurs puisqu'il 'suffirait' de prélever de l'hémolymphe des crevettes récoltées dans les élevages.

Parmi les systèmes de défense enzymatiques, il existe d'autres enzymes venant renforcer l'action de trois enzymes antioxydantes majeures (SOD, CAT et GPx). En effet, le maintien d'une activité glutathion peroxydasique impliquant le recyclage NADPH-dépendant du glutathion réduit (GSH) est assuré par la glutathion réductase. La glucose 6-phosphate déshydrogène intervient elle aussi dans le maintien d'un système de défense cellulaire efficace en régénérant le NADP⁺ formé par la GR en NADPH via la première étape de la voie des pentoses phosphates (Pandey *et al.*, 2003). L'augmentation de l'activité de la G6PDH engendre une augmentation de la production de NADPH utilisé dans les processus de détoxification. En effet, le NADPH est un important cofacteur pour recycler le GSH réduit via l'activité glutathion réductase. De plus, il serait nécessaire pour maintenir une activité catalasique (Bainy *et al.*, 1996).

En ce qui nous concerne, nous ne sommes pas parvenu à mettre en évidence un effet de l'endosulfan sur l'activité de la G6PDH dans les deux organes étudiés. En effet, l'activité de la G6PDH au niveau de l'hépatopancréas et des branchies évolue de façon identique au cours du temps et ce quelque soit le traitement. Dès lors, nous pouvons penser que la diminution des activités de cette enzyme enregistrée après quatre jours d'exposition ne soit pas due à un effet du pesticide mais bien à un ou à d'autres facteurs endogènes et/ou exogènes (discutés plus bas). Lors de l'expérimentation avec la deltaméthrine, nous pouvons également observé que les profils d'évolution des activités de la G6PDH sont similaires dans les branchies d'individus issus des quatre groupes. Quant à l'hépatopancréas, un effet de la deltaméthrine sur l'activité de la G6PDH est relativement difficile à voir au vu des résultats obtenus.

Contrairement à nos résultats, plusieurs études montrent des effets de différents xénobiotiques sur l'activité de la G6PDH. Après avoir exposé des poissons rouges *Carassius auratus* à du FeSO₄ et du calcaire, Bagnyukova *et al.* (2006) ont observé une diminution de 30 à 60 % de l'activité de la G6PDH dans les reins alors que dans le foie, l'activité de cette enzyme restait inchangée par rapport au contrôle. Chez des cyprinidés vivant dans des sites pollués du lac Seyhan Dam (Turquie), l'activité de la G6PDH était augmentée dans le foie. Une activité de 0,0144 ± 0,001 U/mg prot était observée dans le foie de poissons vivant dans les stations polluées par rapport à une activité de 0,0013 ± 0,0001 U/mg prot pour les contrôles (Gül *et al.*, 2004). Dans une autre étude, Sharma *et al.* (2005a ; 2005b) ont administré diverses doses de diméthoate à des rats *Wistar* mâles. Suite à cette administration, l'activité de la G6PDH restait inchangée dans le foie excepté à la dose 30 mg/kg où une augmentation de l'activité de cette enzyme fut enregistrée. Dans leurs travaux, Ozcan Oruç et Üner (2000) ont observé une augmentation de l'activité de la G6PDH dans le foie de poissons *Oreochromis niloticus* après une exposition de 24h au 2,4-D. Chez des poissons d'eau douce *Wallago attu* vivant dans des sites pollués de la rivière Yamuna (Inde), l'activité de la G6PDH était augmentée dans le foie, les reins et les branchies avec des valeurs respectivement de 363, 157 et 172 nmol de NADP réduit/min/mg prot (Pandey *et al.*, 2003).

Dans de futures études, il serait intéressant de compléter le set de biomarqueurs développé en dosant l'activité des superoxydes dismutases et des glutathions réductases. La réponse de ces deux enzymes antioxydantes pourrait expliquer les réponses des autres systèmes de défense observées dans ce travail.

Dans cette étude, les niveaux de peroxydation des lipides et les réponses des systèmes de défense antioxydants paraissent être influencés par d'autres facteurs que les polluants utilisés.

Les résultats obtenus tendent à indiquer que les conditions expérimentales elles-mêmes sont une source de stress pour les crevettes. En effet, les taux de LPO et les systèmes de défense antioxydants sont connus pour varier selon le tissu considéré et selon d'autres facteurs endogènes (sexe, maturité sexuelle, taille et poids) et exogènes (saison, température, salinité et teneur en oxygène) (Livingstone, 2001 ; Nunes *et al.*, 2006) rendant ainsi difficile l'interprétation des données (Ozcan Oruc *et al.*, 2004). Dans l'environnement aquatique, l'oxygène dissous et la température sont des variables environnementales susceptibles d'influencer les processus oxydatifs. Ces variables devraient être rigoureusement contrôlées en laboratoire.

C'est dans cet ordre d'idées que nous allons nous intéresser aux facteurs endogènes et/ou exogènes responsables d'une variation du niveau de LPO et des réponses des systèmes antioxydants.

Damiens *et al.* (2004) se sont intéressés à l'effet de la température sur l'activité de la GST et de la CAT ainsi que sur les taux de TBARS chez des larves d'huîtres *Crassostrea gigas*. Ces auteurs ont observé une augmentation de l'activité de la CAT et des taux de LPO avec la température. L'activité de la GST a quant à elle, une activité légèrement plus élevée à 20°C ($115,0 \pm 57,6$ nmol/min/mg prot) qu'à 25°C ($93,6 \pm 39,4$ nmol/min/mg prot). Dans leurs travaux, Parihar et Dubey (1995) avait également observé une augmentation de la peroxydation des lipides membranaires dans les branchies de poissons *Heteropneustes fossilis* suite à une augmentation de température de 25 à 37°C. Deux ans plus tard, ces mêmes auteurs ont démontré qu'une exposition à 32 et 37°C était responsable d'une diminution de l'activité de la GPx et du contenu en GSH dans les branchies (Parihar *et al.*, 1997). Dans une étude menée par Zenteno-Savin *et al.* (2006), il ressort que des crevettes *Litopenaeus vannamei* tolèrent une hypoxie mais sont sensibles à une soudaine réintroduction d'oxygène. Ainsi, une augmentation de la production d'anions superoxydes et une diminution de la capacité antioxydante furent observées au niveau de l'hépatopancréas et des muscles dans les premières heures de réoxygénation. Dans leurs travaux, Correia *et al.* (2003) se sont focalisés sur l'activité d'enzymes antioxydantes et sur les taux de lipoperoxydation présents dans des juvéniles, des sub-adultes et des adultes mâles et femelles de l'amphipode marin *Gammarus locusta*. Ces auteurs ont observé que le passage de l'état juvénile à l'âge adulte s'accompagne d'une diminution de l'activité de la GPx. De plus, l'activité de la GPx semblait être plus élevée chez les adultes mâles que chez les femelles. Une autre étude réalisée par Mourente et Diaz-Salvago (1999) a permis de montrer des différences au niveau des systèmes antioxydants dans le cerveau de crevettes *Aristeus antennatus* selon différentes classes de taille et selon le sexe. Dans cette étude, les mâles semblent être plus sensibles aux dommages oxydatifs que les femelles. Ainsi, chez les individus mâles, les activités de la CAT et de la GST ont tendance à diminuer avec l'âge et donc avec une augmentation de la taille des individus, alors qu'une augmentation de l'activité de la SOD et de la GPx fut observée à travers les classes de taille.

Plusieurs autres facteurs, seuls ou en s'additionnant, pourraient également expliquer la variabilité des résultats obtenus dans notre étude. Ainsi, les effets de la captivité, de la stabulation et/ou de la manipulation des individus sur les taux de LPO et sur la réponse des différents systèmes de défense antioxydants observés sont à prendre en considération. Certains facteurs peuvent aussi altérer la toxicité des pesticides utilisés. Dans leurs travaux, Capkin *et al.* (2006) ont démontré que la qualité de l'eau (température et alcalinité) et la taille des individus modifiaient la toxicité de l'endosulfan envers la truite arc-en ciel *Oncorhynchus mykiss*.

Dès lors, l'effet de facteurs endogènes et/ou exogènes devrait être pris en compte lors d'études ultérieures.

Quatrième partie : Discussion et perspectives

Rappelons l'aspect exploratoire et pionnier de ce travail réalisé dans des conditions de laboratoire pas toujours optimales ou parfois difficiles pouvant éventuellement affecter la qualité des résultats et engendrer une variabilité masquant des effets éventuels.

Dans de futures études, il serait intéressant de calculer une CL50 précise. Pour des raisons évidentes d'infrastructures, nous n'avons pas pu calculer une telle concentration létale moyenne. Dans ce travail, les concentrations en pesticides utilisées ont été déterminées sur base de CL50 d'autres espèces retrouvées dans la littérature.

Il serait aussi intéressant de faire varier la durée de la période de contamination lors d'études ultérieures. Ainsi, différents types d'exposition (aiguë et chronique) pourraient être envisageables dans le futur. En effet, ces types d'exposition sont connus pour induire des réponses différentes (Silvestre, 2005). De plus, rappelons qu'en conditions *in situ*, les crevettes sont au contact des pesticides pendant des durées plus longue que quatre jours. Toutefois, ce laps de temps semble être suffisant pour observer un léger effet des pesticides sur les branchies, ce qui pourrait s'expliquer par leur contact direct avec l'eau.

Dans ce travail, nous avons pu montrer que l'endosulfan et la deltaméthrine ont peu d'effet sur les biomarqueurs du stress oxydant. Toutefois, l'utilisation de la LPO, du GSH, de la GPx et de l'état de carbonylation du protéome au niveau des branchies en tant que biomarqueur d'exposition à la deltaméthrine est envisageable afin d'évaluer l'état de stress des crevettes tigrées dans les élevages. En effet, l'intérêt du programme de recherche dans lequel s'inscrit ce travail est de développer un système multiple de biomarqueurs qui pourrait être utilisé dans les laboratoires régionaux du Vietnam. Ce set de biomarqueurs servirait à évaluer rapidement l'état de stress des crevettes exposées aux substances employées dans les élevages. Si certains biomarqueurs sont altérés et d'autres pas, cela permettrait d'indiquer quelle substance est incriminée. Dès lors, les échantillons seraient envoyés dans des laboratoires plus performants où une analyse des résidus de ces xénobiotiques serait effectuée.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

La détection de substances potentiellement dangereuses pour la santé humaine attire régulièrement l'attention sur la production animale. Ces différents problèmes sanitaires entraînent non seulement des pertes économiques considérables pour les producteurs concernés mais ternissent également l'image du secteur agro-alimentaire. Les produits aquatiques ont été, jusqu'à présent, relativement épargnés par cette vague de problèmes de sécurité alimentaire. L'intensification de la production aquacole est toutefois susceptible de faire apparaître des problèmes similaires à ceux rencontrés dans la production des animaux à viande.

Au Vietnam, le secteur de la pêche et de l'aquaculture constitue actuellement le troisième secteur d'exportation, après les produits oléagineux et le textile. Parmi les différents types de production aquacole, l'élevage de crevettes constitue une activité prédominante. Afin d'augmenter leur productivité, les cultivateurs utilisent un grand nombre de substances chimiques telles que des pesticides et des antibiotiques. Hélas, ces produits posent des problèmes au niveau de la qualité des animaux exportés et au niveau des écosystèmes environnants. De plus, ce cocktail de substances est connu pour avoir un impact négatif sur la santé des crevettes cultivées (Boyd et Massaut, 1999 ; Gräslund *et al.*, 2003). L'exposition à ces produits peut augmenter le niveau de stress des crevettes et dès lors diminuer leur croissance et/ou augmenter leur sensibilité aux infections (Reyes *et al.*, 1999 ; Le Moullac et Haffner, 2000). C'est dans ce contexte général que nous avons réalisé ce travail.

Soulignons le fait que les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques constituent des biomarqueurs potentiellement intéressants en aquaculture. En effet, leur utilisation permet d'évaluer l'état de santé et/ou de stress des individus cultivés. On peut ainsi s'assurer du bien-être des individus et optimiser la production aquacole. De plus, ils donnent une vue d'ensemble de l'emploi des produits chimiques utilisés dans les élevages aquacoles. Dans ce contexte, les biomarqueurs apparaissent comme des outils essentiels dans l'évaluation d'effets chroniques ou aigus à des polluants sur des individus ou des populations. Le terme biomarqueur s'applique aux structures ou processus biologiques dont les variations, induites par des xénobiotiques ou autres composés environnementaux, sont observables et/ou mesurables au niveau de l'individu. Cependant la combinaison de plusieurs biomarqueurs à différents niveaux (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental) reste indispensable pour évaluer l'impact et les réponses d'organismes aquatiques suite à une exposition à des contaminants.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence un état de stress chez la crevette tigrée *Penaeus monodon* en contact avec les pesticides. Après avoir testé différents biomarqueurs potentiels, nous sommes parvenus à mettre en évidence la capacité de la deltaméthrine à induire un stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés des branchies après une exposition de quatre jours à 0,1 µg/l. Toutefois, cet effet est transitoire et n'est observé qu'à la plus forte concentration. L'augmentation des contenus en GSH et l'induction de l'activité de la GPx observées au cours du temps chez ces mêmes individus ne semblent pas suffisantes pour faire face à ce stress bien que le système GSH/GPx semble être stimulé après les sept jours de décontamination. De plus, au vu des résultats obtenus par l'approche protéomique, nous pouvons penser que même si aucune modification quantitative n'est observée, la deltaméthrine induit une modification qualitative de l'état de carbonylation du protéome.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica Acta* **1523**, 37-48 (2000).
- Arun, S., Subramanian, P. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development. *Comparative Biochemistry and Physiology* **121B**, 273-277 (1998).
- Atif, F., Parvez, S., Pandey, S., Ali, M., Kaur, M., Rehman, H., Khan, H.A., Raisuddin, S., Modulatory effect of cadmium exposure on deltamethrine-induced oxidative stress in *Channa punctatus* Bloch. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **49**, 371-377 (2005).
- Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Stohs, S.J. In vitro and in vivo generation of reactive oxygen species, DNA damage and lactate dehydrogenase leakage by selected pesticides. *Toxicology* **104**, 129-140 (1995).
- Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology* **78**, 325-331 (2006).
- Bainy, A.C.D., Saito, E., Carvalho, P.S.M., Junqueira, V.B.C. Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquatic Toxicology* **34**, 151-162 (1996).
- Bainy, A.C.D. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* **191**, 163-168 (2000).
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J.C., Arun, S., Porte, C. Antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology* **140C**, 175-186 (2005).
- Barg, U., Lavilla-Pitoga, C. The use of chemicals in aquaculture: a summary brief of two international expert meetings. *FAO Aquaculture Newsletters* **14**, 12-14 (1996).
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P., De Duve, C. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochemical Journal* **92**, 179-184 (1964).
- Berg, H. Pesticide use in rice and rice-fish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Crop Protection* **20**, 897-905 (2001).
- Berlett, B.S., Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 20313-20316 (1997).
- Boyd, C.E., Massaut, L. Risks associated with the use of chemicals in pond aquaculture. *Aquaculture Engineering* **20**, 113-132 (1999).
- Bradford, M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254 (1976).
- Brkic, Z. The use of antimicrobials in shrimp hatcheries and grow-out facilities in a South East Asian country. Thèse de doctorat, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen (2003).
- Brown, A.E. Mode of action of insecticides and related pest control chemicals for production agriculture, ornamentals, and turf. *Pesticide information Leaflet* **43**. Pesticide Education and Assessment Programs (September 2005).
<http://www.entmclasses.umd.edu/peap/leaflets/pil43.pdf>.

Bibliographie

- Cajaraville, M. P., Bebianno, M. J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A. 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).
- Capkin, E., Altinok, I., Karahan, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere* **64**, 1793-1800 (2006).
- Cengiz, E.I. Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **22**, 200-204 (2006a).
- Cengiz, E.I. and Unlu, E. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: a microscopy study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **21**, 246-253 (2006b).
- Cheung, C.C.C., Zheng, G.J., Lam, P.K.S., Richardson, B.J. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin* **45**, 181-191 (2002).
- Costa, V.M.V., Amorim, M.A., Quintanilha, A., Moradas-Ferreira, P. Hydrogen peroxide-induced carbonylation of key metabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*: The involvement of the oxidative stress response regulators Yap1 and Skn7. *Free Radical Biology & Medicine* **33**, 1507-1515 (2002).
- Conrad, C.C., Marshall, P.L., Talent, J.M., Malakowsky, C.A., Choi, J., Gracy, R.W. Oxidized proteins in Alzheimer's plasma. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 678-681 (2000).
- Conrad, C.C., Choi, J., Malakowsky, C.A., Talent, J.M., Dai, R., Marshall, P., Gracy, W.R. Identification of protein carbonyls after two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **1**, 829-834 (2001).
- 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).
- Dafre, A.L., Medeiros, I.D., Müller, I.C., Ventura, E.C., Bairy, A.C.D. Antioxidant enzymes and thiol/disulfide status in the digestive gland of the brown mussel *Perna perna* exposed to lead and paraquat. *Chemico-Biological Interactions* **149**, 97-105 (2004).
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F., Roméo, M. Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* **138C**, 121-128 (2004).
- Dandapat, J., Chainy, G.B.N., Rao, K.R. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **127C**, 101-115 (2000).
- Dandapat, J., Chainy, G.B.N., Rao, K.R. Lipid peroxidation and antioxidant defence status during larval development and metamorphosis of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **135C**, 221-233 (2003).
- Dang Minh Phuong. The impacts of pesticides use in rice production on aquaculture in the Mekong Delta: a dynamic model. Faculty of Economics, University of Nong Lam, Thu Duc, Ho Chi Minh City, Vietnam (2002).
<http://www.eepsea.org/uploads/user-S/10516007940Phuong-ReFinaliReport.doc>
- De Graaf, G.J., Xuan, T.T. Extensive shrimp farming, mangrove clearance and marine fisheries in the southern provinces of Vietnam. *Mangroves and Salt Marshes* **2**, 159-166 (1998).

Bibliographie

- Di Giulio, R., Habig, C., Gallagher, E.P. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress and DNA integrity in channel catfish. *Aquatic Toxicology* **26**, 1-22 (1993).
- Dorval, J., Leblond, V.S., Hontela, A. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquatic Toxicology* **63**, 229-241 (2003).
- Dowling, V., Hoarau, P.C., Roméo, M., O'Halloran, J., van Pelt, F., O'Brien, N., Sheehan, D. Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussates* following *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquatic Toxicology* **77**, 11-18 (2006).
- 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 freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* **39**, 93-110 (1997).
- Ela, J-M. A look at the environmental effects of intensive shrimp farming in the Mekong Delta. SIT Study Abroad, Mekong Delta (2005).
- Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S. Polluted-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquatic Toxicology* **49**, 243-250 (2000).
- Flohé, L., Günzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology* **105**, 114-121 (1984).
- Ghezzi, P., Bonetto, V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* **3**, 1145-1153 (2003).
- Giray, B., Gürbay, A., Hincal, F. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol. *Toxicology Letters* **118**, 139-146(2001).
- Glock, G.E., McLean, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochemical Journal* **55**, 400-408 (1953).
- Gräslund, S., Bengtsson, B-E. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimp farming, and their potential impact on the environment-a review. *The Science of The Total Environment* **280**, 93-131 (2001).
- 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).
- Groth, A. Effects of carnitine on growth, survival and body composition of juvenile tiger shrimps, *Penaeus monodon* (Fabricius 1798), in pond culture (Iloilo, Philippines). Thèse de doctorat, Université de Brême (1997).
- Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International* **30**, 605-609 (2004).
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 7130-7139 (1974).
- Hassoun, E.A. and Stohs, S.J. TCDD, Endrin and lindane induced oxidative stress in fetal and placental tissues of C57BL/6J and DBA/2J mice. *Comparative Biochemistry and Physiology* **115C**, 11-18 (1996).
- Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., Girard, J-P. Effect of three xenobiotic compounds on Glutathione S-Transferase in the clam *Ruditapes decussates*. *Aquatic Toxicology* **68**, 87-94 (2004).

Bibliographie

- Johnston, D., Van Trong, N., Van Tien, D., Xuan, T.T. Shrimp yields and harvest characteristics of mixed shrimp- mangrove forestry farms in southern Vietnam: factors affecting production. *Aquaculture* **188**, 263-284 (2000).
- Junqueira, V.B.C., Koch, O.R., Arisi, A.C.M., Fuzaro, A.P., Azzalis, L.A., Barros, S.B.M., Cravero, A., Farré, S., Videla, L.A. Regression of morphological alterations and oxidative stress-related parameters after acute lindane-induced hepatotoxicity in rats. *Toxicology* **117**, 199-205 (1997).
- Kale, M., Rathore, N., John, S., Bhatnagar, 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).
- Kautsky, N., Rönnbäch, P., Tedengren, M., Troell, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* **191**, 145-161 (2000).
- Kestemont, P. Cours d'écotoxicologie, Seconde licence en Sciences biologiques, orientation biologie des organismes, 2005.
- Köprücü, K. and Aydin, R. The toxic effects of pyrethroid deltamethrin on the common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos and larvae. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **80**, 47-53 (2004).
- Köprücü, S.S., Köprücü, Ural, M.S. Acute toxicity of the synthetic pyrethroid deltamethrin to fingerling European catfish, *Silurus glanis* L. *Environmental Contamination and Toxicology* **76**, 59-65 (2006).
- Lagadic L., Caquet T., Amiard J-C., Ramade F. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Lavoisier Tech & Doc, Paris, 320p. (1998).
- Latchoumycandane, C., Chitra, K.C., Mathur, P.P. The effect of methoxychlor on the epididymal antioxidant system of adult rats. *Reproductive Toxicology* **16**, 161-172 (2002).
- Le Moullac, G., Haffner, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* **191**, 121-131 (2000).
- Lightner, D.V., Redman, R.M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**, 201-220 (1998).
- Livingstone, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine Pollution Bulletin* **42**, 656-666 (2001).
- Lombardi, J.V, Machado-Neto, J.G, Brossi-Garcia, A.L., Marques, H.L.A., Kubo, E. Acute toxicity of the pesticides endosulfan and ametryne to the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* De Man. *Environmental Contamination and Toxicology* **67**, 665-671 (2001).
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, N., Randall, R. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275 (1951).
- Mansour, S.A. Pesticide exposure-Egyptian scene. *Toxicology* **198**, 91-115 (2004).
- Mary, J., Vouquier, S., Picot, C. R., Perichon, M., Petropoulos, I., Friguet, B. Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Experimental Gerontology* **39**, 1117-1123 (2004).
- Mc Donagh, B., Tyther, R., Sheehan, D. Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquatic Toxicology* **73**, 315-326 (2005).
- Mohammad, A., Akram, R., Shahin, S., Sherkoufeh, N., Ali, R. Pesticides and oxidative stress: a review. *Medical Science Monitoring* **10**, 141-147 (2004).
- Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D.J. Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Research* **44**, 5086-5091 (1984).

Bibliographie

- Mourente, G., Diaz-Salvago, E. Characterization of antioxidant systems, oxidation status and lipids in brain of wild-caught size-class distributed *Aristeus antennatus* (Risso, 1816) Crustacea, Decapoda. *Comparative Biochemistry and Physiology* **124B**, 405-416 (1999).
- Nguyen Him Huan, Dao Trong Anh. Vietnam promotes solutions to pesticide risks. *Pesticides News* **53**, 6-7 (2001).
<http://www.pan-uk.org/pestnews/pn53/pn53p6.htm>
- Nguyen Huu Dung, Tran Thi Thanh Dung. Economic and health consequences of pesticide use in paddy production in the Mekong Delta, Vietnam. International Development Research Centre, Ottawa, Canada. (1997).
<http://www.idrc.ca/uploads/user-S/10536137480ACF124.pdf>
- Nordberg, J., Arnér, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical Biology and Medicine* **31**, 1287-1312 (2001).
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L. Effects of widely used pharmaceuticals and detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere* **62**, 581-594 (2006).
- Olsson, B., Bradley, B.P., Gilak, M., Reimer, O., Shepard, J.L., Tedengren, M. Physiological and proteomic responses in *Mytilus edulis* exposed to PCBs and PAHs extracted from Baltic Sea sediments. *Hydrobiologia* **514**, 15-27 (2004).
- Ozcan Oruç, E., Üner, N. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **127C**, 291-296 (2000).
- Ozcan Oruç, E., Sevgiler, Y., Üner, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology* **137C**, 43-51 (2004).
- Pandey, S., Ahmad, S., Parvez, B., Bin-Hafeez, R., Haque, R., Raisuddin, S. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **41**, 345-352 (2001).
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Science of the Total Environment* **309**, 105-115 (2003).
- Parihar, M.S., Dubey, A.K. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comparative Biochemistry and Physiology* **112C**, 309-313 (1995).
- Parihar, M.S., Javery, 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**, 151-156 (1997).
- Parvez, S., Raisuddin, S. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20**, 112-117 (2005).
- Parvez, S., Raisuddin, S. Copper modulates non-enzymatic antioxidants in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to deltamethrin. *Chemosphere* **62**, 1324-1332 (2006).
- Pellerin, J. Les biomarqueurs: définitions. (2005a).
http://www3.uqar.quebec.ca/jpellerin/sem/16_biomarqueurs/biomarqueurs_def.htm
- Pellerin, J. Les biomarqueurs : utilisations. (2005b).
http://www3.uqar.quebec.ca/jpellerin/sem/16_biomarqueurs_utilisation.htm
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology* **65**, 337-360 (2003).

Bibliographie

- Pham Binh Quyen, Dang Due Nhan, Nguyen Van San. Environmental pollution in Vietnam: analytical estimation and environmental priorities. *Trends in analytical chemistry* **14**, 8, 383-388 (1995).
- Prasanthi, K., Muralidhara, Rajini, P.S. Fenvalerate-induced oxidative damage in rat tissues and its attenuation by dietary sesame oil. *Food and Chemical Toxicology* **43**, 299-306 (2005).
- Radi, A.A.R. et Matkovic, B. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* **90C**, 69-72 (1988).
- Rehman, H., Ali, M., Atif, F., Kaur, M., Bhatia K., Raisuddin, S. The modulatory effect of deltamethrin on antioxidant in mice. *Clinica Chimica Acta* **369**, 61-65 (2006).
- Rendon-von Osten, J., Ortiz-Arana, A., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M. In vivo evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere* **58**, 627-636 (2005).
- Reyes, G.G., Villagrana, L.C., Alvarez, G.L. Environmental conditions and pesticide pollution of two coastal ecosystems in the Gulf of California, Mexico. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**, 280-286 (1999).
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Livingstone, D.R., O'Hara, S. Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology* **100C**, 177-181 (1990).
- Rudneva, I.I. Antioxidant system of Black Sea animals in early development. *Comparative Biochemistry and Physiology* **122C**, 265-271 (1999).
- Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 295-301 (2003).
- Scandalios, J.G. The rise of ROS. *Trends in Biochemical Sciences* **27**, 483-486 (2002).
- Shang, C.Y., Leung, P., Ling, B-H. Comparative economics of shrimp farming in Asia. *Aquaculture* **164**, 183-200 (1998).
- Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Gupta, S.D., Dogra, T.D. Effects of acute dimethoate administration on antioxidant status of liver and brain of experimental rats. *Toxicology* **206**, 49-57 (2005a).
- Sharma, Y., Bashir, S., Irshad, M., Nag, T.C., Dogra, T.D. Dimethoate-induced effects on antioxidant status of liver and brain of rats following subchronic exposure. *Toxicology* **215**, 173-181 (2005b).
- Shepard, J.L., Olsson, B., Tedengren, M., Bradley, B.P. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Marine environmental research* **50**, 337-340 (2000).
- Silvestre, F. Réponses à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin, *Eriocheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse du protéome. Thèse de doctorat, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur (2005).
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology* **171**, 3-59 (2002).
- Sohn, H-Y., Kwon, C-S., Kwon, G-S., Lee, J-B., Kim, E. Induction of oxidative stress by endosulfan and protective effect of lipid-soluble antioxidants against endosulfan-induced oxidative damage. *Toxicology Letters* **151**, 357-365 (2004).
- Solé, M., Porte, C., Albagnés, J. The use of biomarkers for assessing the effects of organic pollution in mussels. *The Science of the Total Environment* **159**, 147-153 (1995).
- Talent, J.M., Kong, Y., Gracy, R.W. A double stain for total and oxidized proteins for two-dimensional fingerprints. *Analytical Biochemistry* **263**, 31-38 (1998).

Bibliographie

- Tavares-Sánchez, O. L., Gómez-Anduro, G. A., Felipe-ortega, X., Islas-Osuna, M. A., Sotelo Mundo, R. R., Barillas-Mury, C., Yepiz-Plascencia, G. Catalase from the white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*: molecular cloning and protein detection. *Comparative Biochemistry and Physiology* **138B**, 331-337 (2004).
- 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).
- Vandame, R., Meled, M., Colin, M.-E., Belzunces, L.P. Alteration of the homing-flight in the honey bee *Apis mellifera* L. exposed to sublethal dose of deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 855-860 (1995).
- van de Braak, K. Haemocytic defence in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Thèse de doctorat, université de Wageningen. (2002).
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**, 57-149 (2003).
- van der Werf, H. M. G. Assessing the impact of pesticides on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment* **60**, 81-96 (1996).
- Vijayavel, K., Gomathi, R.D., Durgabhavani, K., Balasubramanian, M.P. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. *Marine Pollution Bulletin* **48**, 429-433 (2004).
- Vinagre, T.M., Alciati, J.C., Regoli, F., Bocchetti, R., Yunes, J.S., Bianchini, A., Monserrat, J.M. Effect of microcystin on ion regulation and antioxidant system in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology* **135C**, 67-75 (2003).
- Viran, R., Erkoç, F.U., Polat, H., Kocak, O. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**, 82-85 (2003).
- Wirth, E.F., Lund, S.A., Fulton, M.H., Scott, G.I. Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure. *Aquatic Toxicology* **53**, 9-18 (2001).
- Wirth, E.F., Lund, S.A., Fulton, M.H., Scott, G.I. Reproductive alterations in adult grass shrimp, *Palaemonetes pugio* following sublethal, chronic endosulfan exposure. *Aquatic Toxicology* **59**, 93-99 (2002).
- World Health Organisation Deltamethrin (Environmental Health Criteria No. 97), 1990, Geneva.
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm>
- World Health Organisation Endosulfan (Environmental Health Criteria No. 40), 1984, Geneva
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc40.htm>
- Zenteno-Savin, T., Saldierna, R., Ahuejote-Sandoval, M. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry and Physiology* **142C**, 301-308 (2006).
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J., Xue, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* **55**, 167-174 (2004).

Sites internet:

- http://kosfic.yosu.ac.kr/kos_home/ocean_gis/FAO/mapbrief.html
<http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm>
<http://extoxnet.orst.edu/pips/deltamet.htm>
<http://www.abcbirds.org/pesticides/Profiles/endosulfan.htm>

Annexe 1 : Dosage de la peroxydation des lipides (LPO)

La procédure expérimentale consiste en :

- Mélanger 100 μ l d'homogénat avec 400 μ l d'eau distillée
- mélanger 500 μ l d'échantillon avec du TCA 5% (trichloroacetic acid) suivant le rapport 1 :1 (TCA dans l'eau distillée)
- incuber sur glace pendant 15 minutes
- mélanger la solution avec du TBA (thiobarbituric acid) 0,67 % suivant le rapport 2 :1 (67 mg de TBA dans 1 ml de DMSO + 9 ml d'eau distillée)
- centrifuger à 3000 rpm (2200 g) durant 10 minutes à 4°C
- bouillir le surnageant pendant 10 minutes
- refroidir à température ambiante
- lire l'absorbance à 535 nm à l'aide du spectrophotomètre

La courbe de calibration est obtenue avec des quantités croissantes de 1,1,2,3-méthylmalondialdéhyde (TMOP). Préparer une solution stock 500 μ M (4 μ M de TMOP dans 1ml d'éthanol + 49 ml d'eau).

Diluer dans de l'eau pour obtenir comme concentration finale 10-5-2,5-1,25-0,625 μ M.

Annexe 2 : Dosage du glutathion total (GSH)

La procédure expérimentale consiste en :

	Blanc (µl)	Test (µl)
Tampon phosphate KH_2PO_4 200 mM ; EDTA 0,1 mM ; pH 7.5	740	740
NADPH 0,2 mM final	100	100
DTNB 0,15 mM final	100	100
Echantillon	/	20
SSA 2,5%	20	/
GR 2U/ml final	40	40

Remarque: La GR doit être ajoutée en dernier. Bien mélanger la solution avant de la lire à 412 nm pendant 5 min. L'échantillon, après l'homogénéisation dans le tampon phosphate doit être dilué dans du SSA 5% dans un rapport 1:1 et centrifugé 10 min à 10 000 g.

La concentration de GSH est calculée via la courbe de calibration obtenue avec des quantités croissantes de GSH purifiées :

	0 pmole (blanc)	60 pmoles	120 pmoles	180 pmoles	240 pmoles	300 pmoles
Tampon phosphate	740	740	740	740	740	740
NADPH	100	100	100	100	100	100
DTNB	100	100	100	100	100	100
SSA 2,5%	20	16	12	8	4	0
GSH (15 µM)	0	4	8	12	16	20
GR	40	40	40	40	40	40

Le GSH est diluée dans du SSA 1% pour obtenir une concentration finale de 15µM. Une nouvelle solution doit être préparée chaque mois et tous les échantillons d'une même expérience devront être calculés à partir de la même courbe de calibration.

Annexe 3 : Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

La procédure expérimentale est déterminée ci-dessous :

	Test (µl)	Blanc spectro (µl)
Tampon phosphate 50 mM; EDTA 1 mM; NaN ₃ 1 mM; pH 7.0	550	550
GR 2U/ml final	100	100
GSH 2 mM final	100	100
NADPH 0,2 mM final	100	100
Tampon homogénéisation	/	50
Échantillon	50	/
10 minutes à 37°C ou à température ambiante		
H ₂ O ₂ 0,5 mM final	100	100
Lecture à 340 nm pendant 3 minutes		

La réaction commence avec l'ajout de 100 µl de H₂O₂ et la diminution d'absorbance à 340 nm est mesurée pendant 3 minutes. L'activité est exprimée en nmol de NADPH oxydée par minute et par mg de protéine.

Annexe 4 : Dosage de la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)

La procédure expérimentale est décrite ci-dessous :

	Test (µl)	Blanc test (µl)
Tampon Tris 70 mM pH 7.8; MgCl ₂ 7 mM; NADP 0.7 mM final	540	540
H ₂ O	280	280
Échantillon	20	20
G6P 1.33 mM final	60	/
lecture à 340 nm pendant 3 minutes		

La réaction commence avec l'ajout de 60 µl de G6P. L'augmentation d'absorbance à 340nm est mesurée pendant 3 minutes. L'activité est exprimée en nmol de NADP⁺ réduit par minute et par mg de protéine.

Annexe 5 : Dosage de la glutathion S-transférase (GST)

La procédure expérimentale a été déterminée ci-dessous :

	Test (µl)	Blanc spectro (µl)
Tampon hepès 33mM pH 7.5 (23mM au final)	700	700
CDNB (dans l'éthanol absolut) 1.5 mM final	15	15
GSH 1.5 mM final	10	10
H ₂ O	255	265
Échantillon	20	/
lecture à 340 nm pendant 3 minutes		

La réaction commence avec l'ajout de 20 µl d'échantillon. L'augmentation d'absorbance à 340 nm est mesurée pendant 3 minutes à 25°C.

L'activité est exprimée en nmol de CDNB conjugué formé par minute et par mg de protéine en utilisant le coefficient d'extinction molaire de $9,6 \times 10^3 / \text{M cm}$.

Annexe 6 : Dosage de la catalase (CAT)

La procédure expérimentale a été déterminée comme suit :

Tout d'abord, préparation d'une solution stock appelée BC (blank mixture) contenant 1g de BSA; 100 ml de tampon imidazol 0,2 M pH 7.0 ; 900 ml d'H₂O.

Préparation d'une solution stock de TiOSO₄: 1.7 g de TiOSO₄ dans 500 ml de H₂SO₄ 2N. Bouillir pendant 10 minutes et laisser la solution jusqu'au jour d'après. Diluer 1.5 fois avec du H₂SO₄ et filtrer sur du papier Whatman.

Ensuite, nous avons besoin d'ajuster la quantité d'H₂O₂ ajouté à la solution BC. Nous ajoutons 40 µl de H₂O₂ 30% à 250 ml de BC (la solution s'appelle SC ou sample mixture). Nous additionnons 0.75 ml de TiOSO₄ à 1.3 ml de SC. Lecture à 420 nm. L'absorbance doit être comprise entre 0.75 et 0.95. Il s'agit de l'absorbance maximale possible (avec aucune réduction de H₂O₂ par les catalases). Si non, essayer avec d'autres volumes de H₂O₂.

Ensuite, nous procédons avec les échantillons comme suit :

	Test (µl)	Blanc spectro (µl)	Blanc test (µl)
Triton X-100 0.02 %	25	25	25
Échantillon	25	/	25
Tampon phosphate	/	25	/
SC	1250	/	/
BC	/	1250	1250
6 minutes à 0°C			
TiOSO ₄	750	750	750
lecture à 420 nm après 5 à 10 minutes			

Une unité de catalase est définie comme la quantité d'enzymes causant la destruction de 90% du substrat en 1 minute dans un volume de 50 ml sous les conditions expérimentales. L'absorbance du blanc spectro est prise comme le zéro. L'absorbance du blanc test est soustraite de l'échantillon. Cela correspond à la réaction intrinsèque de l'échantillon avec le TiOSO₄.

Annexe 7 : Dosage des protéines selon la méthode Lowry

Prendre 10 µl de chaque échantillon et ajouter 490 µl d'eau distillée dans un tube à essai.

Ajouter 0,5 ml de NaOH 1N puis attendre 30 min à 2 h.

Ajouter 5 ml par tube d'une solution comprenant du Na₂CO₃ 2 %, du CuSO₄ 1% et du NA K Tartrate 2% en proportion 100 ml, 1 ml et 1 ml respectivement et attendre 15 min.

Ajouter 0,5 ml par tube de Folin dilué 2 fois dans de l'eau et attendre 30 min.

Lire l'absorbance à 660 nm.

Une courbe d'étalonnage est également réalisée à l'aide de concentrations croissantes de BSA (albumine de sérum bovin) et les étalons suivent le même traitement que les échantillons.

Annexe 8 : Dosage des protéines selon la méthode Bradford

10 mg d'albumine de sérum bovin (BSA) sont ajoutés à 1 ml d'eau puis dilués 10 fois dans du tampon de lyse DLA. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec 1 blanc spectrophotomètre (tampon de lyse DLA) et des concentrations croissantes en BSA, le tout dans 1ml de solution Biorad diluée 5 fois. Ensuite, l'absorbance des échantillons (1 μ l) est lue au spectrophotomètre à 595 nm.