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

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Induction des HSP60, 70 et 90 chez la crevette tigrée géante Penaeus monodon des crevetticultures vietnamiennes suite à l'utilisation d'endosulfan et de deltaméthrine

TYBERGHEIN, Anne-Eric

Award date:
2006

Link to publication

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

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

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

Download date: 04. May. 2026

FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

INDUCTION DES HSP60, 70 ET 90 CHEZ LA CREVETTE TIGREE GEANTE *PENAEUS MONODON* DES CREVETTICULTURES VIETNAMIENNES SUITE A L'UTILISATION D'ENDOSULFAN ET DE DELTAMETHRINE

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

Anne-Eric Tyberghein

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)81.72.41.31 –Téléfax : +32(0)81. 72.41.35
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – http://www.fundp.ac.be/fundp.html

INDUCTION DES HSP60, 70 et 90 CHEZ LA CREVETTE TIGREE GEANTE *PENAEUS MONODON* DES CREVETTICULTURES VIETNAMIENNES SUITE A L'UTILISATION D'ENDOSULFAN ET DE DELTAMETHRINE

TYBERGHEIN ANNE-ERIC

Résumé

Nous avons étudié la capacité d'induction des HSPs par deux pesticides fréquemment utilisés dans les crevetticultures vietnamiennes (un pyréthroïde, la deltaméthrine et un organochloré, l'endosulfan) dans le but de pouvoir utiliser ces HSPs comme biomarqueurs de stress chez la crevette tigrée géante (*Penaeus monodon* Fabricius). Pour ce faire, en laboratoire, nous avons soumis des crevettes à 4 jours de contamination aux pesticides suivis de 7 jours de décontamination. Les branchies et les muscles ont été prélevés aux temps 0, 4 jours de contamination et 7 jours de décontamination, afin d'y doser les HSP60, 70 et 90 par 3 techniques d'immunodétection: l'ELISA, le Slot-Blot, l'électrophorèse 1D et 2D suivie d'un Western-Blot. Nous avons pu mettre en évidence une nette augmentation de la concentration en HSP90 (entre 2,5 et 3,5 fois plus élevée après 7 jours de décontamination qu'au jour 0) dans les muscles des crevettes contaminées avec 0,1 et 1µg/l d'endosulfan. Bien que plus faible, nous avons également observé un renforcement des quantités d'HSP70 dans les muscles des crevettes contaminées avec l'endosulfan, à savoir 1,10 ± 0,2ng dans le groupe 1 µg/l d'endosulfan contre 0,66 ± 0,049ng dans le groupe contrôle après 7 jours de décontamination. De plus, nous avons noté un effet important de la captivité sur la production des HSP70 et 60 dans les branchies. Après 11 jours d'expérience, les premières étaient jusqu'à 5 fois plus importantes (1,5 ± 0,34ng d'équivalent HSP70/µg de protéines totales) qu'au jour 0 (0,28 ± 0,08ng) tandis que les secondes allaient jusqu'à augmenter 15 fois (0,136 ± 0,013ng d'équivalent HSP60/µg de protéines totales) par rapport au jour 0 (0,01 ± 0,0037ng). Un effet plus faible a également été observé pour les HSP70 et 60 dans les muscles. Alors que la deltaméthrine ne semble pas induire davantage les HSPs, l'endosulfan a un effet positif sur les HSP70 et 90 dans les muscles, suggérant que ce pesticide a une action protéotoxique. Parmi les 3 HSPs étudiées, les HSP90 présentes dans les muscles sont les plus aptes à servir de biomarqueurs d'exposition à l'endosulfan.

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)81.72.41.31 –Téléfax : +32(0)81. 72.41.35
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – http://www.fundp.ac.be/fundp.html

INDUCTION OF HSP60, 70 AND 90 IN THE BLACK TIGER SHRIMPS *PENAEUS MONODON* FROM A VIETNAMESE SHRIMP FARM FOLLOWING ENDOSULFAN AND DELTAMETHRIN EXPOSURE

TYBERGHEIN ANNE-ERIC

Abstract

The ability of two pesticides (deltamethrin and endosulfan) frequently used in Vietnamese shrimp farms to induce the expression of HSP70, 60 and 90 in the black tiger shrimps (*Penaeus monodon* Fabricius) was investigated in laboratory conditions. The shrimps were exposed to endosulfan (organochlorine) and deltamethrin (pyrethroïd) during 4 days, and then decontaminated for 7 days. The gills and the muscles have been removed after different periods of time to assay the HSPs with three different immunodetection techniques: ELISA, Slot-blot and 1D and 2D electrophoresis followed by a Western-blot. HSP90 increased (between 2.5 and 3.5 times after 7 days of decontamination) in the 0,1 and 1µg/l endosulfan contaminated shrimps'muscles. Although lower, an increase of the HSP70 was found in the muscles of contaminated shrimps after 7 days of decontamination (i.e. 1.10 ± 0.2ng versus 0.66 ± 0.049ng/µg total proteins in 1µg/l endosulfan treated and control shrimps respectively). Furthermore, an important captivity effect on HSP70 and 60 productions in the gills was noticed. After 11 days of experiment, HSP70 were up to 5 times higher (1.5 ± 0.4ng of equivalent HSP70/µg of total proteins) than before any contamination (0.28 ± 0.08ng) while HSP60 were up to 15 times higher (0.136 ± 0.013ng of equivalent HSP60/µg of total proteins) than at day 0 (0.01 ± 0.0037ng). A weaker captivity effect was observed on the HSP70 and 60 from the muscles. Although deltamethrin had no major effect on the HSPs production, endosulfan had an effect on HSP70 and 90 from muscles suggesting a proteotoxic effet. Among the 3 HSPs investigated, HSP90 assayed in the muscles were the best biomarkers for endosulfan contamination.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques
Août 2006
Promoteur : P. Kestemont

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

Arrivant au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée à la réalisation de ce travail…

Merci à Mr Kestemont pour ses paroles rassurantes lorsque nous n'arrivions pas à obtenir les crevettes et merci pour son suivi et ses conseils durant les 6 mois qui ont suivi ;

Un merci tout particulier à Frédéric Silvestre. Merci tellement pour ton aide, tes conseils précieux, ta patience et ta disponibilité (même quand tu es en vacances…là tu m'épates trop). Mais merci également pour tous les bons moments de discussion et de rire passés avec toi, que ce soit au Vietnam (avec ton KaKoTeu et ta glave du VIP) ou au labo de Namur (avec tes remarques pas discrètes sur les bonnes odeurs qui y règnent) ;

Merci au Professeur Nguyen Thanh Phuong et à Mademoiselle Huynh Thi Tú de m'avoir accueillie à l'université de Can Tho et de m'avoir suivie durant mon magnifique séjour au Vietnam ;

Merci à Martine et Marie-Claire pour leur sympathie, leur patience et leurs bons conseils ;

Merci à tous ceux qui travaillent au labo URBO pour la chouette ambiance qui y règne ;

Merci à mes parents de m'avoir permis de partir et de réaliser une partie de ce mémoire au Vietnam. Merci également de vous être intéressés à mon travail. Merci à vous 2 et « au gros » de m'avoir aidée pour la correction ;

Merci tellement Jenny pour tous les super-moments passés avec toi au Vietnam. Merci d'avoir été là dans les moments un peu plus difficiles ;

Merci tout spécial à la petite famille de St-Prex. Votre accueil et votre sympathie étaient vraiment bons pour le moral ;

Merci Julien pour ton soutien quotidien et pour l'énorme intérêt que tu as porté à ce mémoire ;

Merci les petits URBO pour ces 2 dernières années passées ensemble, pour la bonne humeur et les coups de gueule, pour tout ce qui fait que j'ai passé 2 années géniales avec vous ;

Merci spécial à Nath et Marraline pour les nombreux soupers qui ont rendus nos « vacances » à « Namur les bains » nettement plus agréables ;

Je finirai en remerciant les centaines de crevettes qui ont fait don de leur corps à la science.

Liste des abréviations

ABTS – 2,2'-azino-di-(3ethylbenzthiazoline sulfonic acid)
AchE – acétylcholinestérase
ADN – acide désoxyribonucléique
ADN – adénosine diphosphate
Ag – argent
APS – ammonium persulfate
ATP – adénosine triphosphate
BSA – albumine de sérum bovin
CHAPS – 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CL_{50} – concentration létale 50%
DL_{50} – dose létale 50%
DTT – dithiothreitol
ECL – chémiluminescence
ECOD – 7-ethoxycoumarine-O-deethylase
EDTA – *ethylene diamine tetraacetic acid*
ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*
GABA – acide gamma-aminobutyrique
Gel 1D – gel d'électrophorèse à une dimension
GST – glutathion-S-transférase
ha – hectare
H_2O – eau
H_2O_2 – peroxyde d'hydrogène
HRP – *horse radish peroxydase*
HSC – protéine de stress constitutive
HSE – *heat shock element*
HSF – *heat shock factor*
HSP – protéine de stress (*heat shock protein*)
IEF – isoelectric focusing
IPG – gradient de pH immobilisé
KDa – kilodalton
LPO – peroxydation lipidique
M66 – 66 microgrammes d'homogénat de muscle
µg – microgramme
µl – microlitre
ml – millilitre
µM – micromolaire
mM – millimolaire
MT – metallothionéine
ng – nanogramme
nm – nanomètre
PBS – *phosphate buffer saline*
PI – point isoélectrique
PM – poids moléculaire
Ppm – *part per million* ($1g/m^3$)
Ppt – *part per thousand* (1g/l)
Temed – tétraméthylène diamine
Tris – tris-(hydroxyméthylamino-méthane)
SDS – sodium dodécyl sulphate
SDS-page – *sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
SM – spectrométrie de masse

Table des matières

I. Introduction 1
1. Introduction générale 1
2. L'aquaculture au Vietnam 1
2.1 Historique 1
2.2 Les principales espèces de Pénéides cultivées 2
2.3 Différentes méthodes de culture 3
2.4 Principales limites au développement de la crevetticulture 4
3. Utilisation de pesticides 5
3.1 En aquaculture 5
3.2 Risques et effets connus des pesticides 6
3.3 Utilisation de pesticides dans les élevages riz-crevettes 6
3.4 La deltaméthrine et l'endosulfan 7
3.4.1 Deltaméthrine 7
3.4.1.1 Identité, propriétés physiques et chimiques et usages 7
3.4.1.2 Présence dans l'environnement 7
3.4.1.3 Absorption, métabolisme, excrétion et bioaccumulation 8
3.4.1.4 Effets sur les organismes sauvages 9
3.4.1.5 Mode d'action 9
3.4.2 Endosulfan 10
3.4.2.1 Identité, propriétés physiques et chimiques et usages 10
3.4.2.2 Présence dans l'environnement 10
3.4.2.3 Absorption, métabolisme, excrétion et bioaccumulation 11
3.4.2.4 Effets sur les organismes dans l'environnement 12
3.4.2.5 Mode d'action 12
4. Les biomarqueurs 13
4.1 Que sont-ils ? Pourquoi les utilise-t-on en général? 13
4.2 Pourquoi utiliser des biomarqueurs en aquaculture? 14
5. Les protéines de choc thermique 14
5.1 Que sont-elles? Quel sont leurs rôles 14
5.1.1 Familles et rôles des HSPs 15
5.2 Induction des protéines de stress 16
5.2.1 Mécanisme de l'activation transcriptionnelle des gènes HSP 16
5.2.2 Les inducteurs de HSPs 17
5.3 HSPs comme biomarqueurs 18
6. HSPs et pesticides 19
6.1 Induction des HSPs par les pesticides 19
6.2 Induction des HSPs par l'endosulfan et la deltaméthrine 19
7. Objectifs 20

II. Matériel et méthodes 21
1. Les animaux 21
2. Contaminations 21
3. Echantillonnage et homogénéisation 22
4. Dosage des protéines selon la méthode Bradford 23
5. Dosage des HSPs 23

5.1 Dosage à l'aide de la technique enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 23
5.2 Dosage à l'aide de la technique Slot Blot 24
5.2.1 Les HSP70 24
5.2.2 Les HSP60 25
5.2.3 Les HSP90 25
5.2.4 Les analyses statistiques 26
6. Western blot 26
7. L'analyse protéomique 27
7.1 Préparation des échantillons 27
7.2 La réhydratation des strips 28
7.3 La réduction des échantillons 28
7.4 Electrophorèse en IEF (IsoElectric Focusing) (1ère dimension) 28
7.5 Electrophorèse SDS-PAGE (2ème dimension) 28
7.6 Le Western-Blot 29
7.7 Révélation des HSP90 29
7.8 Coloration des gels 29
7.8.1 Coloration au bleu 29
7.8.2 Coloration à l'argent 30

III. Résultats 31
1. Mises au point du dosage des HSPs par la méthode ELISA 31
1.1 La solution révélatrice 31
1.2 Les anticorps secondaires 32
1.3 Type de plaque ELISA 33
1.4 Tampon d'homogénéisation 33
1.5 Tampon de coating et temps d'incubation 33
1.6 Tampon d'anticorps secondaires 34
1.7 Dilutions des anticorps primaires 34
1.8 Reproductibilité 35
1.9 Différentes HSPs 35
2. Dosage des HSPs par la méthode Slot Blot 36
2.1 Induction des HSP70 36
2.2 Induction des Hsp60 38
2.3 Induction des HSP90 40
3. Western Blot 43
3.2 HSP70 43
3.3 HSP60 et HSP90 43
4. Analyses protéomiques 43

IV. Discussion et perspectives 45
1. Les contaminations 45
2. Le dosage des protéines de stress... 46
2.1 ...à l'aide de l'ELISA 47
2.2 ...à l'aide du Slot Blot 48
2.3 Vérification des résultats grâce au Western-blot 51
3. L'analyse protéomique en 2 dimensions 52
4. Les HSPs comme biomarqueurs? 53

V. Conclusions 55

VI. Références bibliographiques 56

I. Introduction

1. Introduction générale

Ces dernières années, au Vietnam, la culture des crevettes tigrées géantes *Penaeus monodon* s'est vue augmenter de manière exponentielle. En 2004, la surface et la production totale de crevettes étaient respectivement de 550 000 hectares et 290 000 tonnes, la majeure partie provenant du Delta du Mékong. De janvier à juin 2005, environ 57 000 tonnes de crevettes ont été exportées, essentiellement vers le Japon (45,8%), les Etats-Unis (21,3%) et l'Europe (12,3%). Au Vietnam, de nombreux produits chimiques (pesticides, désinfectants, antibiotiques,...) sont utilisés en aquaculture, principalement dans le but de faire face aux fréquentes maladies. Hélas, ces produits posent des problèmes au niveau des écosystèmes environnants et nous poussent à douter de la qualité des animaux exportés (résidus de produits chimiques dans leur chair).
C'est dans ce contexte qu'est né le projet de recherche interuniversitaire (FUNDP- ULg- Can Tho University- Hanoï Agricultural University) visant à atteindre une aquaculture durable. Nous avons pour but d'étudier les réponses physiologiques, biochimiques et moléculaires de ce crustacé aux principales substances utilisées par les cultivateurs. A terme, l'objectif est de mettre au point des biomarqueurs qui renseignent sur l'utilisation ou non de pesticides et d'antibiotiques. Ceux-ci permettraient également de dévoiler l'état physiologique des crevettes d'élevage et des populations sauvages.
Ce travail vise plus précisément à étudier l'impact de 2 pesticides régulièrement utilisés en crevetticulture au Vietnam, l'endosulfan et la deltaméthrine, sur les crevettes *P.monodon*. Ces dernières ont été prélevées dans une ferme extensive et contaminées en laboratoire à différentes concentrations. Etant donné que la toxicité des contaminants se fait généralement remarquer en premier lieu au niveau biochimique, moléculaire et cellulaire, nous avons étudié la production de protéines de stress, les HSPs (Heat Shock Proteins) afin de voir si les 2 pesticides (un organochloré et un pyréthroïde) affectent les crevettes au niveau cellulaire. La compréhension des mécanismes mis en place à ce niveau, pourrait nous aider à utiliser les HSPs comme biomarqueur cellulaires, capables, comme déjà dit précédemment, de nous renseigner sur l'utilisation ou non de pesticides dans les crevetticultures. Cela nous permettrait d'atteindre une meilleure gestion des systèmes de production et in fine, de mettre en place une aquaculture durable.

2. L'aquaculture au Vietnam

2.1 Historique

La crevetticulture débuta par hasard, il y a plusieurs siècles, en Asie du Sud-Est, lorsque des crevettes juvéniles furent emportées par une marée et qu'elles aboutirent dans des étangs destinés à la pisciculture. Celles-ci étaient éventuellement récoltées, constituant ainsi un revenu secondaire pour les fermiers. (Groth, 1997)

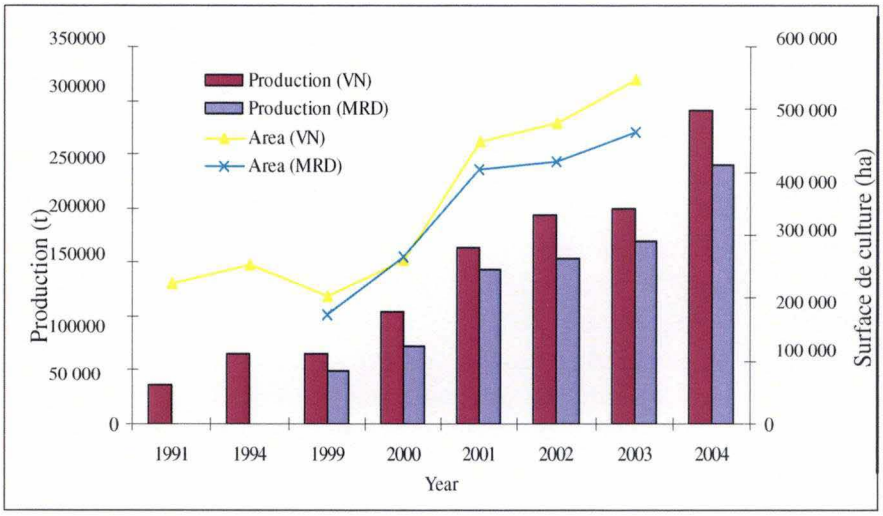


Fig 1 : Evolution de la production (en tonnes) et de la surface (en ha) destinée à la culture de la crevette au Vietnam (VN) et dans la région du Delta du Mékong (MRD) (Huynh Thi et Nguyen Thanh, 2005).

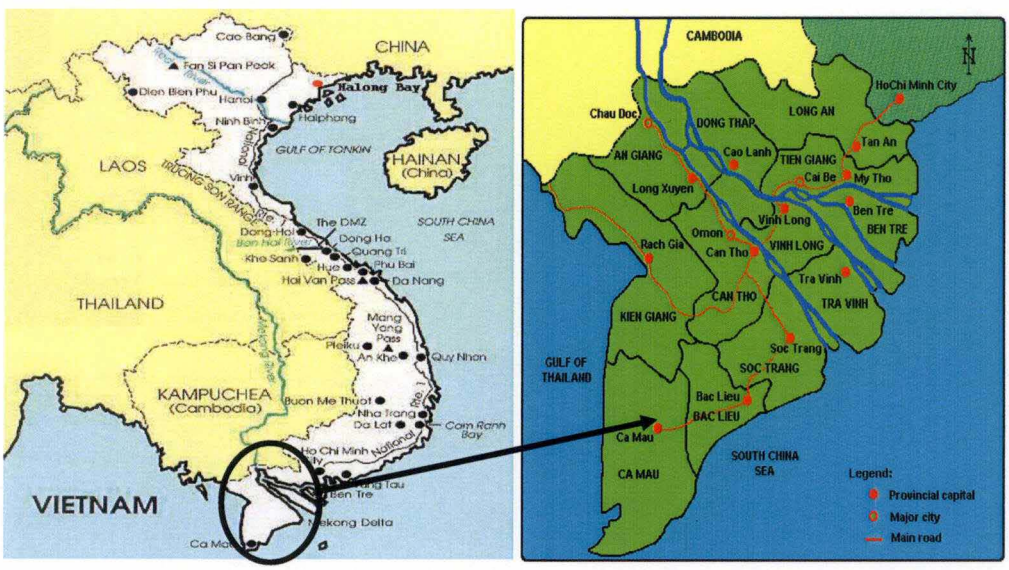


Fig 2 : Carte du Vietnam et situation du Delta du Mékong

Dans les années 80, suite aux progrès techniques (nurseries, nourriture...), la culture de la crevette connut un essor particulièrement important en Asie, en Amérique latine et dans d'autres régions tropicales.
Au Vietnam, le gouvernement encouragea le développement de l'aquaculture dans le but de créer de l'emploi et de réduire la pauvreté. La culture des crevettes a joué un rôle important dans la croissance économique du pays, qui est rapidement devenu un des premiers producteurs d'Asie. En 2004, la surface et la production totale de crevettes étaient respectivement de 550000 ha et 290000 tonnes, la majeure partie provenant du Delta du Mékong *(Figures 1 et 2)* (Huynh Thi et Nguyen Thanh, 2005).
De janvier à juin 2005, environ 57 000 tonnes de crevettes ont été exportées, principalement vers le Japon (45,8 %), les Etats-Unis (21,3%) et l'Europe (12,3%).

2.2 Les principales espèces de Pénéides cultivées

Faisant partie de l'ordre des Décapodes, la crevette tigrée *Penaeus monodon* (*Figure 3*), membre de la famille des Penaeidae (Rafinesque 1815), se distingue par sa grande taille (elle peut atteindre 33,6 cm de long) et par un corps de couleur gris-vert tranché par des bandes transversales jaunes et noires. Ses 5 paires de pléiopodes, utiles pour la nage, sont de teintes bleue et jaune.
Les espèces de Crustacés Malacostracés du genre *Penaeus* sont distribuées dans les eaux tropicales et subtropicales mondiales, approximativement entre 40°N et 40°S de latitude (Provenzano, 1985). Actuellement, la majeure partie de la production mondiale de Pénéides est assurée par 3 espèces : la crevette tigrée géante (*Penaeus monodon*), la crevette blanche du Pacifique (*P. vannamei*) et la crevette blanche chinoise (*P. chinensis*).
Les deux premières espèces représentent respectivement 57 et 20% de la production mondiale de Pénéides. (Rosenbery, 1995 in Shang et *al.*, 1998)



Fig 3 : Photo de la crevette tigrée, *Penaeus monodon*.

Le cycle de vie des Pénéides comprend de nombreux stades qui se déroulent dans divers habitats : les crevettes juvéniles préfèrent les estuaires et les mangroves tandis que les adultes s'éloignent du littoral (*Figure 4*).
Les femelles pondent entre 50 000 et 1 000 000 d'œufs de 0,03 cm de diamètre par frai. Les larves passent successivement par 6 stades nauplii, 3 stades protozoé et 3 stades mysis. Le terme post-larve regroupe les stades mégalope et juvénile précoce.

Tableau 1 : Comparaison des différents systèmes de culture (modifié d'après Groth, 1997) (Gräslund et Bengtsson, 2001 ; Huynh Thi, T. et Nguyen Thanh, P., 2005)

	Systèmes de culture		
	Extensif	**Semi-intensif**	**Intensif**
Installations pour la culture	Étangs naturels	Etangs	*Etangs (imperméabilisés avec 1 bâche en plastique ou du béton) *Bacs
Surface des bassins et profondeur	1-10 ha 30-100 cm	1-2 ha 80-150 cm	0,1-1 ha 120-150 cm
Densité de stockage (juvéniles/ha)	10 000-30 000	30 000-100 000	100 000-500 000
Productivité (kg/ha/an)	600-1500	1500-6000	7000-15 000
Nombre de cycle(s)/an	1	1	2
Nourriture	Naturelle	Naturelle+ suppléments de nourriture (granulés ou fraîche)	Alimentation artificielle
Méthode pour le changement de l'eau	Grâce aux marées	Marées et pompes	Pompes
Taux d'échange d'eau (% par jour)	0-5	5-10	≥30
Aération	Aucune	Mécanique lorsque nécessaire	Mécanique en continu
Coût de maintenance (énergie, main d'œuvre,...)	Faible	moyen	Elevé
Décharge d'effluents	Faible	Moyenne	Elevée
Quantité de Produits chimiques utilisés	Aucun ou addition de fertilisants pour augmenter la croissance de nourriture naturelle	Large gamme de produits chimiques	Large gamme de produits chimiques
Origine des larves	Naturelle	Artificielle	Artificielle

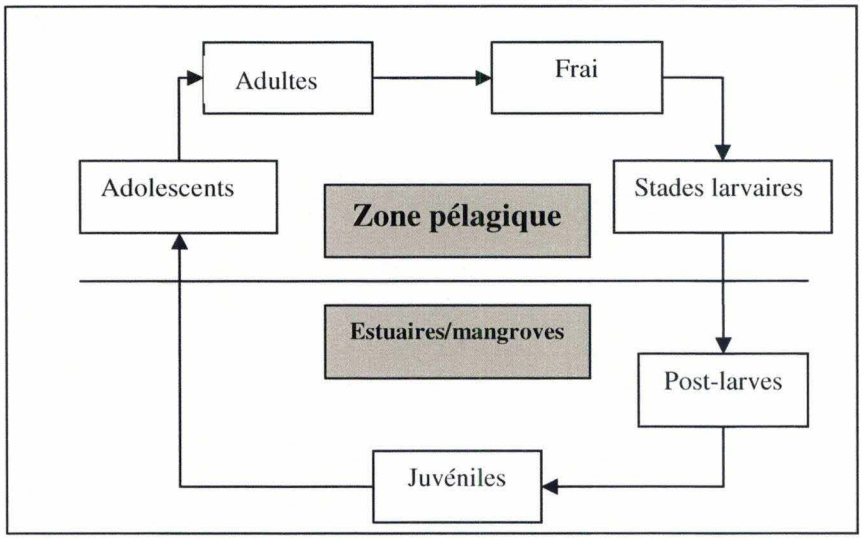


Fig.4: Cycle de vie des crevettes Pénéides. (modifié d'après Provenzano, 1985)

Quatre-vingt-cinq pourcents de la nourriture ingérée par *P. monodon* sont constitués de crustacés et mollusques, les 15% restants étant composés de matières végétales, polychètes, poissons, débris et sable. La crevette tigrée est donc avant tout une espèce prédatrice (Solis, 1988 in van de Braak, 2002).
Plusieurs de ses caractéristiques, telles que sa taille, son taux de croissance élevé (elle peut peser 25-30 g après 3-4 mois d'élevage post-larvaire) et sa tolérance face à de larges gammes de salinité, favorisent son utilisation en aquaculture (van de Braak, 2002).

2.3 Différentes méthodes de culture

La plupart du temps, la culture de la crevette se fait en deux étapes. La première consiste en la larviculture et la seconde durant laquelle les fermiers font grandir ces larves jusqu'à une taille commercialisable (Ela, 2005).
Cette phase de croissance est généralement scindée en trois classes distinctes, principalement basées sur des différences économiques et techniques : cultures intensive, semi-intensive et extensive.
Le *tableau 1* résume les principales caractéristiques de ces différentes pratiques.
Dans les principaux pays producteurs d'Asie, plus de 90% des fermes sont définies comme étant extensives ou semi-intensives (Rosenbery, 1995 in Shang et *al.*, 1998).
Au Vietnam, 75% des fermes pratiquent la culture extensive alors que les cultures extensives améliorées (22%) (équivalentes aux cultures extensives mais avec une densité d'élevage plus élevée, une production supérieure et un apport de larves qui peut être artificiel), semi-intensives et intensives (3%) sont de moindre importance (Huynh Thi, T. et Nguyen Thanh, P., 2005 ; Brkic, 2003).
Il ne faut pas négliger d'autres pratiques culturales telles que la culture en cage, la polyculture avec des poissons herbivores (ex : tilapias, carpes) et la culture intégrée (rotation entre culture de riz et de crevettes) qui a été adoptée par bon nombre de fermiers dans le Delta du Mékong (104000 ha dévoués à cette pratique) (Brennan et *al.*, 2002).

2.4 Principales limites au développement de la crevetticulture

La culture de la crevette a beaucoup d'effets positifs mais son futur a récemment été remis en question suite à l'apparition de nombreuses conséquences négatives. Les maladies se sont avérées être un des obstacles majeurs à la croissance de la crevetticulture. Plusieurs de ces maladies sont liées à la détérioration environnementale et au stress associé à l'intensification des cultures (Shang, 1998).
Dans le Delta du Mékong, l'émergence de maladies, principalement d'origine virale et bactérienne, a induit de très faibles taux de survie. Par exemple, d'après une étude de 3 ans réalisée dans 2 provinces, le taux de survie était de 15-20 % à Tran et de 1-5 % à Hiep (Brennan et *al.*, 2002).

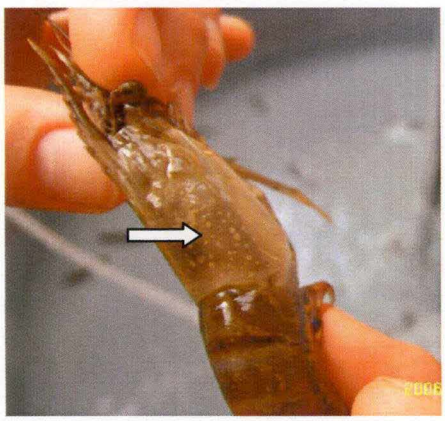


Fig 5 : Crevette tigrée atteinte de la maladie des points blancs

En Asie, les virus des points blancs « white spot virus » (WSSV group) (*Figure 5*), de la tête jaune « yellowhead » (YHV), monodon baculovirus (MBV), parvo virus hépatopancréatique « hepatopancreatic parvo » (HPV) et les virus de la nécrose hématopoïétique et hypodermale infectieuse « Infectious hypodermal and hematopoetic necrosis » (IHHNV) ont causé d'importants dégâts dans beaucoup de pays, et une variété de bactéries vibrioses cause des problèmes intermittents (Gräslund et Bengtsson, 2001).

De plus, de nombreux problèmes environnementaux tels que la destruction de mangroves et d'écosystèmes naturels, la salinisation des sols et le rejet de produits chimiques et de nutriments dans l'environnement, remettent en cause la durabilité de la culture de la crevette.

Les mangroves représentent une protection contre l'érosion côtière, les tempêtes et les marées. Elles jouent un rôle de tampon et de filtre contre les produits chimiques et les rejets, elles abritent de nombreuses espèces côtières qui contribuent à augmenter la biodiversité et regorgent de plantes utilisées en médecine traditionnelle. En 1975, les mangroves recouvraient 200 000 hectares dans le Delta du Mékong alors qu'aujourd'hui, il n'en reste que 60 000 suite à leur conversion en fermes destinées à la crevetticulture.
Actuellement, de 1 700 000 à 2 100 000 hectares, c'est-à-dire 42-52 % de la surface du Delta du Mékong sont affectés par l'intrusion d'eau salée. Cela s'explique par le fait que beaucoup de fermiers pompent de l'eau de mer à l'intérieur des terres pour élever *P. monodon* dans une eau avec un niveau de salinité compris entre 15 et 25 g/l (=15 et 25 ppt).
Un des effets les plus directs de la culture de la crevette est l'accumulation importante de déchets organiques et de sédiments (contenant souvent des résidus de pesticides et d'antibiotiques) dans les étangs étant donné que seuls 17 % du poids sec de la nourriture distribuée aux crevettes sont assimilés par celles-ci. Le rejet de ces déchets et sédiments dans les rivières proches constitue une importante source de pollution (Ela, 2005).

3. Utilisation de pesticides

3.1 En aquaculture

Le terme « pesticide » désigne des substances chimiques qui ont pour cible certains groupes d'organismes. Des pesticides très spécifiques peuvent être utilisés dans les cultures de crevettes pour tuer des organismes tels que des poissons, des crustacés, des escargots, des champignons et des algues (Gräslund et Bengtsson, 2001).
Au Vietnam, de nombreux produits chimiques (pesticides, désinfectants, antibiotiques,...) sont utilisés en aquaculture, principalement dans le but de faire face aux fréquentes maladies. Les produits utilisés sont fonction du système de culture et de l'espèce cultivée et généralement leur utilisation croît proportionnellement à l'intensification du système. Cette corrélation peut être illustrée par le *tableau 2* : en crevetticulture, 80% des fermiers adeptes de la culture extensive utilisent entre 3 et 10 produits différents, de 11 à 20 produits sont appliqués dans 60 % des cultures semi-intensives alors qu'en pratique intensive, une moyenne de 21 à 31 produits sont administrés dans 70 % des cas.

Tableau 2 : Nombre de produits chimiques différents utilisés en fonction du système de culture. D'après (Pham Kim et *al., 2005*)

Nombre de produits utilisés / Type de pratique	3-10	11-20	21-31
	%	%	%
Extensive (n=10)	***80***	***20***	***0***
Semi-intensive (n=10)	***10***	***60***	***30***
Intensive (n=10)	***0***	***30***	***70***
Total (n=30)	**30,0**	**36,7**	**33,3**

D'après une étude réalisée en Thaïlande par Gräslund et *al.* (2003), les produits les plus fréquemment utilisés dans les cultures de crevettes sont des produits impliqués dans le traitement de l'eau et du sol (100% des fermiers les utilisent), des pesticides et désinfectants (employés dans 96% des cas) et des antibiotiques (74%).
Dans le Delta du Mékong, un nombre total de 64 pesticides différents furent identifiés lors d'un sondage auprès des fermiers pratiquant la culture intégrée riz-poissons. Approximativement 50% de ces pesticides sont des insecticides, 25% des fongicides et 25% des herbicides. Les premiers sont principalement représentés par les pyréthroïdes (42%), les carbamates (23%) et le cartap (19%) (Berg, 2001).

3.2 Risques et effets connus des pesticides

Malgré les effets positifs, supposés [car pour beaucoup de produits chimiques, il n'a pas encore été démontré que leur utilisation a un effet positif sur la production (Gräslund et Bengtsson, 2001)] ou réels, qu'a l'utilisation de produits chimiques sur la productivité des exploitations aquacoles, ces produits peuvent également avoir des impacts négatifs sur l'environnement aquatique, les écosystèmes adjacents, la santé des crevettes cultivées et la santé humaine (Redshaw, 1995).
Concernant les crevettes, leur exposition à des produits chimiques risque de les mener à un état de stress et dès lors, de diminuer leur croissance et/ou d'augmenter leur susceptibilité aux maladies (Bainy, 2000 ; Gräslund et *al.*, 2003). Pouvant définir « l'état de stress » comme « une condition dans laquelle un organisme lutte afin de s'adapter à une nouvelle condition environnementale » (Silvestre, 2005), il est compréhensible que l'énergie dévolue à cet effet ne soit plus disponible pour d'autres processus physiologiques tels que la croissance et la lutte contre les maladies.
De plus, certains pesticides (comme l'endosulfan) peuvent s'accumuler dans les tissus de ces crustacés et y persister après la récolte, présentant alors un risque pour la santé humaine lorsqu'ils sont ingérés (Holmström et *al.*, in press in Gräslund et *al.*, 2003).
Les pesticides et autres produits utilisés en crevetticulture pour leurs propriétés toxiques peuvent représenter une menace pour la flore et la faune sauvages (Baticados et *al.*, 1986 in Gräslund et Bengtsson, 2001). Leur impact sur les organismes non ciblés dépend de leur toxicité et de leur taux de dégradation et de dispersion (c'est-à-dire de la concentration à laquelle l'organisme est réellement exposé). Ils peuvent induire différents niveaux de stress à différents groupes d'organismes, changeant ainsi la structure de la communauté présente dans les sédiments marins (Knapp et *al.*, 2005). Caquet et *al.* (1992) mirent en évidence que l'utilisation d'insecticides avait non seulement un impact direct sur les arthropodes visés, mais également un impact indirect sur d'autres organismes de la chaîne alimentaire via un contrôle « bottom-up » et « top-down ». Par exemple, lorsqu'il y a élimination d'arthropodes herbivores, la pression due au broutage est réduite, ce qui peut provoquer une augmentation du nombre de producteurs primaires tels que le périphyton et le phytoplancton (= contrôle « top-down » c'est-à-dire qu'il y a une influence de la part d'organismes situés à un niveau supérieur dans la chaîne trophique sur les animaux de niveaux inférieurs). D'un autre côté, la mort des organismes visés peut représenter une nouvelle source de nutriments disponibles pour l'activité microbienne, induisant un « bloom » microbactérien et/ou d'autres modifications de l'écosystème non escomptées lors de l'application du pesticide.
Malgré tous les effets négatifs des pesticides, il est compréhensible que par peur de pertes financières majeures, ceux-ci soient utilisés afin d'éviter d'importants dégâts aux cultures.
De plus, l'active promotion des produits chimiques par leurs vendeurs, à des fermiers souvent très peu informés, contribue à l'accroissement de l'utilisation de ces produits (Gräslund et *al.*, 2003).

3.3 Utilisation de pesticides dans les élevages riz-crevettes

Dans le Delta du Mékong, certains fermiers s'adonnent à un élevage combiné de riz et de crevettes. Suite à cette association, les cultivateurs doivent limiter l'utilisation de pesticides afin d'assurer la survie et la croissance des crustacés. Dans ces polycultures, l'emploi de pesticides décroît d'environ 77,5% et les bénéfices sont nettement plus importants (1,5 à 2,5

fois plus élevés) que pour les monocultures de riz. Néanmoins, ce type d'élevage n'est pas évident à mettre en œuvre, principalement suite à deux facteurs majeurs :

-le niveau d'eau doit toujours rester stable car même si le riz peut survivre 3 semaines sans eau, les crevettes, elles, ne survivent que quelques heures hors de l'eau

-les rizières adjacentes doivent être exemptes de tout pesticide afin d'éviter des contaminations externes (Minh Phuong, 2002).

3.4 La deltaméthrine et l'endosulfan

3.4.1 Deltaméthrine

3.4.1.1 Identité, propriétés physiques et chimiques et usages

La deltaméthrine est un insecticide de la classe des pyréthroïdes, provenant de modifications de structure des pyréthrines naturelles (= composés provenant de plantes de la famille des chrysanthemum). Elle fut synthétisée pour la première fois en 1974 et commercialisée en 1977. Sur le plan chimique, c'est un ester de l'analogue dibromé de l'acide chrysanthémique (Br_2CA) et de l'alcool alpha-cyano-phénoxy-3benzylique ; plus précisément, c'est l'isomère {1R, *cis* ; alpha S} parmi les huit stéréoisomères que compte cet ester (*Figure 6*).

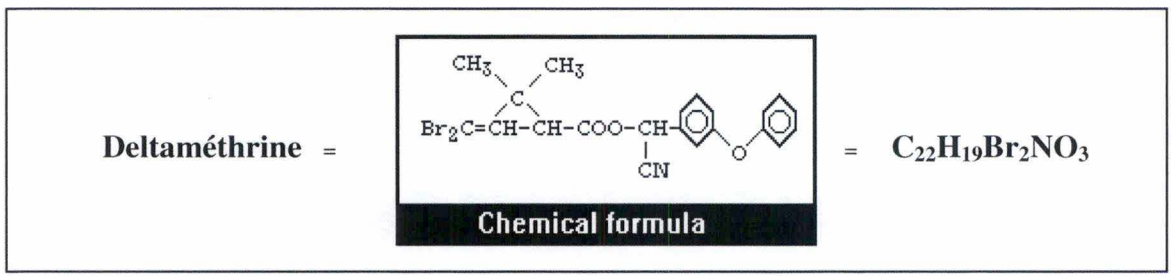


Fig 6 : Formule chimique de la deltaméthrine, modifié d'après WHO, 1990

La deltaméthrine présente une masse molaire de 505,24 g/mole, elle est très peu soluble dans l'eau (< 0,002 mg/l), mais très soluble dans les solvants organiques tels que l'acétone (500g/l). Elle est stable à la lumière, à la chaleur (6 mois à 40°C) et à l'air, mais par contre, elle est instable dans les milieux alcalins. Elle est essentiellement utilisée pour traiter le coton, le café, le maïs, les céréales, les fruits et les légumes, mais également pour l'hygiène des animaux, la lutte contre les vecteurs (contrôle de la malaria, de la maladie de Chagas) ainsi qu'à des fins de santé publique (WHO, 1990).

3.4.1.2 Présence dans l'environnement

Toutes les études montrent que la deltaméthrine est rapidement dégradée dans le sol. Son temps de demi-vie est fonction de la nature du sol et de la température. En général, sa demi-vie

peut varier de 11 à 72 jours sous conditions aérobiques, alors que sous conditions anaérobiques, sa dégradation est beaucoup plus lente (WHO, 1990).
Les principaux métabolites consistent en Br_2CA libre et conjugué, en trans-hydroxyméthyl-Br_2CA et en acide (hydroxy-4phénoxy)-3 benzoïque résultant du clivage de l'ester, d'une oxydation et d'une conjugaison.
Chapman et Harris (1981 in WHO, 1990) étudièrent la rémanence de la deltaméthrine sous conditions de laboratoire, à 28°C. Ils constatèrent que, 8 semaines après la fin d'un traitement, il demeurait respectivement 52 et 74% de l'insecticide dans du sable et du terreau.
Suite à sa forte adsorption sur les particules du sol et son insolubilité dans l'eau, ce produit n'est que très peu mobile dans l'environnement.

3.4.1.3 Absorption, métabolisme, excrétion et bioaccumulation

La deltaméthrine est rapidement absorbée par voie orale, mais l'est moins par voie trans-cutanée. Une fois absorbée, elle est rapidement métabolisée et excrétée. Ruzo et *al.* (1978 in WHO 1990) ont administré à des rats, par voie orale, de 0,64 à 1,60 mg de deltaméthrine/kg marquée au ^{14}C au niveau des fonctions acide, alcool et nitrile. Endéans 2 à 4 jours, les radiocarbones provenant de la fraction acide et de la fraction alcoolique ont été totalement éliminés et leurs taux de résidus tissulaires étaient généralement faibles, sauf dans les graisses où ils étaient légèrement plus élevés (0,1-0,2 mg/kg). Le groupement nitrile quant à lui fut excrété plus lentement, le taux d'excrétion étant de 79% en 8 jours (respectivement 43 et 36 % dans les urines et fèces). La rémanence de ce groupement dans les tissus était, d'une manière générale, relativement élevée, mais particulièrement au niveau de la peau et de l'estomac.
Les principales réactions métaboliques sont l'oxydation (au niveau du méthyl-trans, du cycle cyclopropane et des positions 2', 4' et 5' du groupement alcoolique), le clivage de l'ester et la conversion du nitrile en thiocyanate. Les acides carboxyliques et les phénols résultants sont conjugués à l'acide sulfurique, à la glycine et à l'acide glucuronique.
Les principales réactions métaboliques sont similaires chez les souris, les vaches et les volailles (Ruzo et *al.*, 1979 in WHO, 1990). Grâce aux transformations métaboliques qui se produisent dans leur organisme et grâce aux faibles taux de deltaméthrine disponibles dans l'eau, le facteur de bioconcentration de ce pesticide chez les poissons est assez faible. Cary (1978 in WHO, 1990) étudia la cinétique métabolique chez *Ictalurus punctatus*. Il inonda un sol après que celui-ci ait été contaminé pendant 30 jours avec des doses de 125 g/ha. Après 30 jours d'exposition au pesticide, et malgré une eau contenant une concentration allant jusqu'à 2,19 µg/l, aucun des 300 poissons ne mourut ou ne montrait un comportement anormal. Il procéda à une 3ème phase de décontamination afin de connaître la vitesse d'élimination du produit (*Tableau 3*).

Tableau 3 : Bioconcentration de la deltaméthrine chez des poissons exposés pendant 30 jours et % d'élimination après 1 et 14 jours, modifié d'après Cary (1978 in WHO, 1990)

Organes	Valeurs des facteurs de bioconcentration après 30 jours d'exposition	Elimination du ^{14}C (%) après décontamination de	
		1 jour	14 jours
Muscles	25	<50	77
Viscères	972	67	86
Carapace	41	>50	93
Corps entier	144	>50	93

3.4.1.4 Effets sur les organismes sauvages

La deltaméthrine s'est avérée très toxique pour les poissons, avec une CL_{50} (=la concentration léthale moyenne s'applique pour des composés volatiles et elle indique la dose du toxique à laquelle 50% d'une population meurent) de 96 heures comprise entre 0,4 et 2,0 µg/l. Sa toxicité est également importante pour les invertébrés aquatiques puisque 50% des daphnies exposées à une concentration de 5µg/l de deltaméthrine meurent après 48h (L'Hotellier et Vincent, 1986 in WHO, 1990) (*Tableau 4*). Cependant, sur le terrain, les populations d'invertébrés aquatiques ont tendance à se reconstituer assez rapidement (Smies et *al.*, 1980). La deltaméthrine semble avoir un impact mineur sur les oiseaux étant donné des valeurs de DL_{50} (idem que la CL_{50} mais utilisée pour des composés non volatiles) élevées (supérieures à 1000 mg/kg) lors de l'administration d'une dose unique par voie orale (David, 1981 in WHO, 1990). Lors d'expériences en laboratoire, cet insecticide fut considéré comme très toxique pour les abeilles *Apis mellifera* (DL_{50} de contact de 0,051 µg/abeille) alors qu'en situation réelle, la deltaméthrine exerce une action répulsive sur ces insectes, ce qui réduit la probabilité de contact et de ce fait, le danger de mort (Stevenson et *al.*, 1978 in WHO, 1990).

Tableau 4 : Toxicité aiguë de la deltaméthrine sur les poissons et crustacés. Modifié d'après L'Hotellier et Vincent (1986 in WHO, 1990).

	Espèces	CL_{50} 96h (µg/l) de deltaméthrine technique	CL_{50} 96h (µg/l) de deltaméthrine formulée[a]
Poissons	*Cyprinus carpio*	1,84	0,65
	Ictalurus punctatus	0,63	/
	Salmo gairdneri	0,39	2,2
	Salmo salar	1,97	0,59
Crustacés	*Crassostrea virginica*	/	12,0
	Gammarus pulex	/	0,03[b]
	Penaeus duorarum	/	0,35

a : 25 g d'ingrédient actif/l ; **b** : LC50 après 48h

3.4.1.5 Mode d'action

Les pyréthroïdes sont divisés en 2 groupes principaux en fonction de leur mode d'action : les pyréthroïdes qui induisent un syndrome neurologique de type I (également appelé syndrome-T) et ceux qui provoquent un syndrome de type II (= syndrome-CS) caractérisé chez les humains par une salivation excessive, de rapides mouvements de jambes et une convulsion progressive. Au niveau structural, ils se distinguent par la présence (type II) ou l'absence (type I) d'un groupement alpha-nitrile sur l'alcool phénoxy-3 benzylique. La deltaméthrine fait donc partie des pyréthroïdes de type II. Parmi ses premiers sites cibles dans le système nerveux des vertébrés ont retrouve les canaux à sodium se situant dans la membrane des axones et qui sont à la base de la génération et de la conduction de chaque impulsion nerveuse. L'ouverture et la fermeture des canaux à sodium sont contrôlées par deux « barrières » distinctes, appelées « porte » d'activation et « particule » d'inactivation. La deltaméthrine affecte les canaux à sodium durant la dépolarisation en maintenant les portes d'activation en position ouverte. Cela

induit de longs trains d'impulsions répétitives dans les organes, mais également une diminution de la fréquence des impulsions dans les fibres nerveuses (Soderlund et *al.*, 2002). Chez les mammifères, il est prouvé que la deltaméthrine possède de nombreux sites d'action : les canaux à sodium, les récepteurs GABA, les récepteurs nicotiniques d'acétylcholine et les récepteurs glutamates excitateurs (Soderlund et *al.*, 2002). De plus, Liu et Shi (2006) ont récemment démontré qu'il est fort probable que ce produit induise des dommages spécifiques aux cellules nerveuses dopaminergiques, causant alors l'inhibition de la synthèse de dopamine.

3.4.2 Endosulfan

3.4.2.1 Identité, propriétés physiques et chimiques et usages

L'endosulfan (6,7,8,9,10,10-hexachloro-1,5,5a,6,9,9a-hexahydro-6,9-méthano-2,4,3-benzadioxathiepin3- oxide) (*Figure 7*) est un insecticide et acaricide synthétique qui appartient à la classe des pesticides cyclodiènes organochlorés et qui présente une masse molaire de 406,96 g/mole. Il fut décrit pour la première fois dans la littérature scientifique en 1954. Il est fabriqué à partir d'hexachlorocyclopentadiène par réaction diénique avec le butane-diol, suivie d'une cyclisation avec du chlorure de thionyle et cis-butène-1,4-diol. L'endosulfan généralement utilisé consiste en un mixte de 2 stéréoisomères (endosulfan α et β) dans un rapport 7 :3. Ils sont tous deux beaucoup plus solubles dans les solvants organiques (65 g/l d'éthanol à 20°C) que dans l'eau (± 0,33 mg/l à 22°C).
On utilise l'endosulfan principalement pour traiter les cultures de céréales, de thé, de fruits, de légumes, de tabac et de coton contre une grande variété d'insectes. En plus de son utilisation en agriculture, l'endosulfan est employé pour la préservation du bois et pour le contrôle de la mouche Tsé-Tsé (WHO, 1984). Au Vietnam, malgré l'existence d'un décret bannissant l'endosulfan depuis 1993, 3% des fermiers du Delta du Mékong continuent à l'utiliser[1].

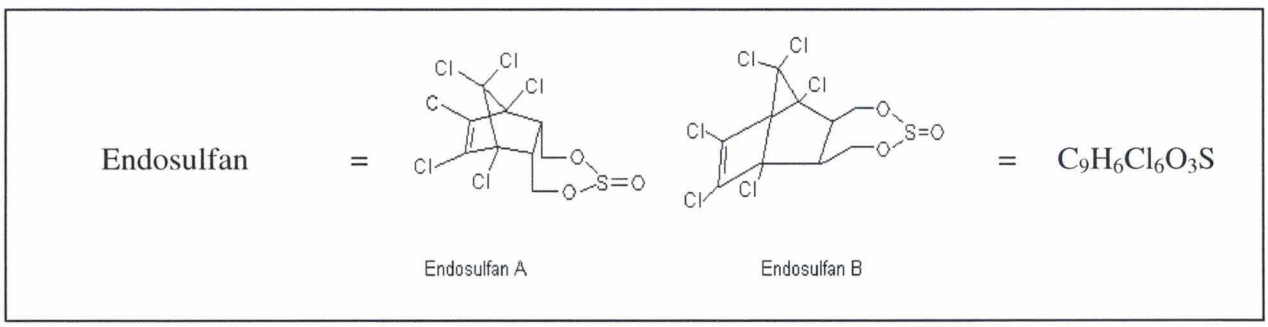


Fig 7 : Formule chimique de l'endosulfan

3.4.2.2 Présence dans l'environnement

Avec son temps moyen de demi-vie de 50 jours dans les sols, l'endosulfan est considéré comme moyennement persistant, mais celui-ci peut adhérer aux particules d'argile et demeurer dans le sol et l'eau pendant plusieurs années (Naqvi et Vaishnavi, 1993). Les deux isomères se

[1] : dglover@idrc.org.sg

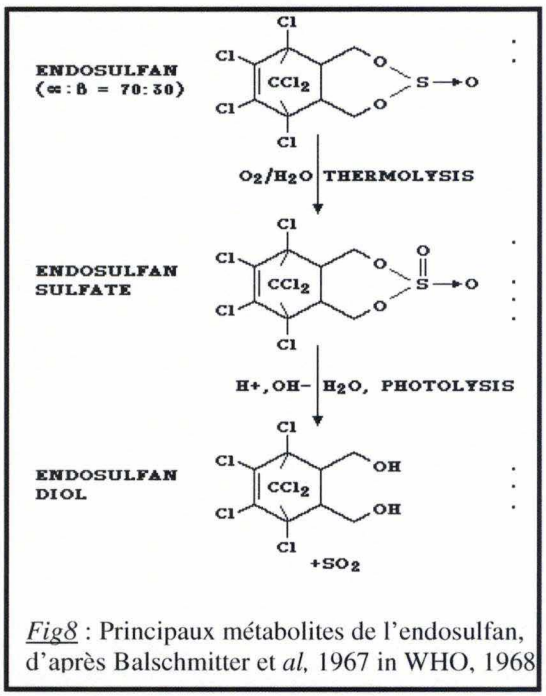


Fig8 : Principaux métabolites de l'endosulfan, d'après Balschmitter et *al,* 1967 in WHO, 1968

Ref ?

dégradent à un rythme différent dans le sol, la demi-vie de l'isomère-α étant de 35 jours tandis que celle de l'isomère-β est de 150 jours sous pH neutre. Sous conditions acides, leur dégradation se fait plus lentement (Kidd et James, 1991 in extoxnet, 1996[2]). Dans le sol, les isomères parentaux se font principalement dégrader en sulfate d'endosulfan (plus résistant que le produit de base) tandis que dans l'eau, le métabolite majeur est l'endosulfan diol (*Figure 8*). D'après une étude réalisée par Pennington et *al.* (2004) sur des mésocosmes, l'endosulfan α et β se dégradent très rapidement dans l'eau avec une demi-vie de moins d'un jour à pH 8,0. De plus, les auteurs mirent en évidence qu'après 96 heures de contamination à des concentrations nominales de 3,34 µg/l d'eau de mer, aucune trace d'endosulfan (α, β et sulfate) n'avait pu être détectée dans les sédiments des mésocosmes (limite de détection= 0,6 ± 0,22 ng/g). Par contre, Barry et Logan (1998) obtinrent des résultats positifs quant à la détection d'endosulfan dans les sédiments de microcosmes. Toutes les 3 semaines, ils ont contaminé des microcosmes avec différentes concentrations (1, 10 et 50 µg/l) d'endosulfan et 10 semaines après la première contamination, ils ont mesuré la quantité de résidus d'endosulfan dans les sédiments et les macrophytes (*Tableau 5*).

Tableau 5 : Rémanence de l'endosulfan dans les sédiments et dans les macrophytes après contamination, modifié d'après Barry et Logan (1998)

Concentration d'endosulfan dans les microcosmes (µg/l)	**Résidus d'endosulfan (ng/g de poids sec)**		**Endosulfan total (µg)**	**Quantité d' endosulfan rémanent après 10 semaines par rapport à l'apport total (%)**
	Sédiments	**Macrophytes**		
1	1,49	0,57	0,70	11,6
10	6,97	27,47	3,69	6,15
50	35,73	61,44	17,95	5,98

Dans les plantes, ce pesticide est rapidement dégradé en son équivalent sulfate. Dans la majorité des fruits et légumes, 50 % des composés parentaux disparaissent endéans 3 à 7 jours.

3.4.2.3 Absorption, métabolisme, excrétion et bioaccumulation

L'endosulfan peut être absorbé après ingestion, inhalation et contact cutané. Ce composé a un potentiel de bioaccumulation relativement modéré car il se dégrade rapidement (plus vite que les autres organochlorés) et son excrétion est hâtive. D'ailleurs, après administration de 2 ou 0,5 mg de ^{14}C-endosulfan/kg par voie orale ou intraveineuse, à des rats femelles et mâles, plus de 80% (en intraveineuse) ou 90% (par voie orale) de la dose initiale furent éliminés dans les urines et fèces en 7 jours (IPCS,1998 in WHO, 2000). Les principales voies de dégradation sont l'oxydation et l'hydrolyse et conduisent à la formation de produits métaboliques tels que l'endosulfan-sulfate, -diol, -hydroxyéther, -lactone, -éther et l'hydroxy endosulfan carboxylique acide.
Après 49 jours de contamination de souris avec de l'aliment contenant 10 ppm d'endosulfan, toutes contenaient de l'endosulfan sulfate dans le foie et les graisses viscérales, des métabolites sulfates et diols dans leurs fèces et uniquement des métabolites diols dans leurs urines (Deema

[2] : http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm

Tableau 7 : toxicité de l'endosulfan sur les poissons et crustacés

Espèces	Durée du test (heure)	CL50 (µg/l)	Auteurs
Gammarus lacustris	96h	6,4	U.S. EPA, 1980 in Naqvi et Vaishnavi, 1993
Gammarus fasciatus	96h	6,0	idem
Daphnia magna	96h	62	idem
Palaemon macrodactylus	96h (flux d'eau)	3,4	idem
Penaeus duorarum	96h (flux d'eau)	0,04	idem
Palaemonetes pugio	96h (flux d'eau)	0,62	Wirth et *al.*, 2001
Salmo gairdneri	96h	1,5	Johnson et Finley, 1980[3]
Pimephales promelas	96h	1,4	Johnson et Finley, 1980[3]
Ictalurus punctatus	96h	1,5	Johnson et Finley, 1980[3]
Lepomis macrochirus	96h	1,2	Johnson et Finley, 1980[3]

et *al.*, 1966 in WHO, 2000). A la fin d'une étude de 24 mois réalisée sur des souris nourries avec de la nourriture contenant 0, 2, 6 ou 18 ppm d'endosulfan, la concentration de celui-ci et de ses principaux métabolites fut mesurée dans le foie et les reins de chaque individu (*Tableau 6*). Aucune trace d'endosulfan ne fut détectée, ni dans le foie, ni dans les reins.

Tableau 6 : Concentration en **endosulfan sulfate** dans les reins et le foie de rats nourris avec de la nourriture contenant de l'**endosulfan**, modifié d'après (Leist, 1989 in WHO, 2000)

Concentration en endosulfan dans la nourriture ingérée pendant 24 mois (ppm)	**Concentration en endosulfan sulfate dans :**	
	les reins (ppm)	**le foie (ppm)**
0	0	0
2	0,2 à 0,4	0,06 à 0,07
6	0,04 à 0,1	0,12 à 0,45
18	0,1 à 0,2	0,7 à 1,1

D'une manière générale, la majorité des animaux exposés à une concentration sub-léthale d'endosulfan accumule ce produit jusqu'à un certain plateau et l'évacue dès que la source de contamination disparaît (Schoettger, 1970 in WHO, 1984).

3.4.2.4 Effets sur les organismes dans l'environnement

L'endosulfan présente une toxicité aiguë très importante pour les organismes aquatiques et plus particulièrement pour les poissons (*Tableau 7*)[3]. De nombreuses études réalisées sur des espèces de Téléostéens ont mis en évidence des valeurs de CL50-96 h comprises entre 0,67µg/l et 4,8 µg/l. Singh et Narain (1982 in WHO, 1984) ont découvert que la tolérance des poissons à ce produit chimique augmentait durant les mois les plus froids de l'année et que la toxicité de l'endosulfan était directement proportionnelle à la longueur et au poids des poissons. Dans des estuaires pollués chroniquement avec de l'endosulfan, Wirth et *al.* (2002) ont constaté une réduction significative de la densité de *Palaemonetes pugio* ainsi que d'animaux situés à un niveau trophique supérieur (le crabe bleu (*Callinectes sapidus*) et le choquemort (*Fundulus heteroclitus*). Ce pesticide est déterminé comme modérément toxique pour les abeilles, mais modérément à hautement toxique pour les oiseaux sous conditions de laboratoire alors qu'en milieu naturel, aucun empoisonnement n'ait été enregistré (WHO, 1984).

3.4.2.5 Mode d'action

En se liant aux récepteurs $GABA_A$ situés dans les membranes post-synaptiques des neurones, l'endosulfan agit comme une neurotoxine en inhibant l'action du neurotransmetteur GABA (acide gamma-aminobutyrique ; NH_2-CH_2-CH_2-CH_2-COOH). Le récepteur $GABA_A$ est un membre de la famille des récepteurs-canaux ioniques. En temps normal, la fixation de 2 molécules GABA sur leur site de reconnaissance provoque l'ouverture d'un canal chlore (Cl^-),

[3]: Johnson et Finley, 1980 in http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf/htm

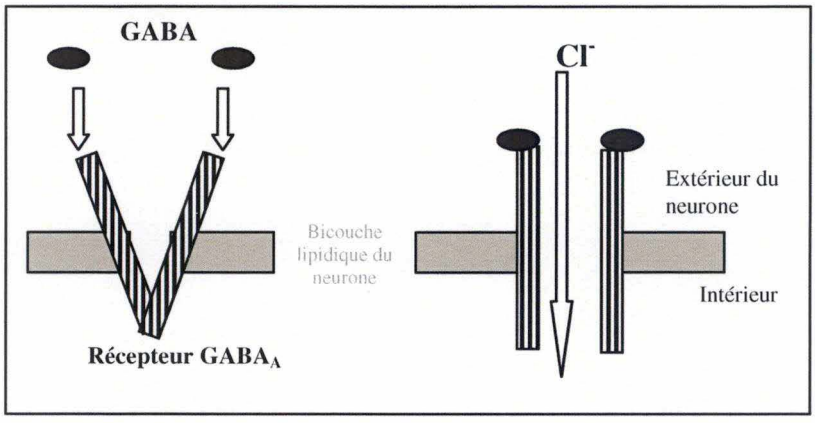


Fig 9 : Mode d'action du GABA

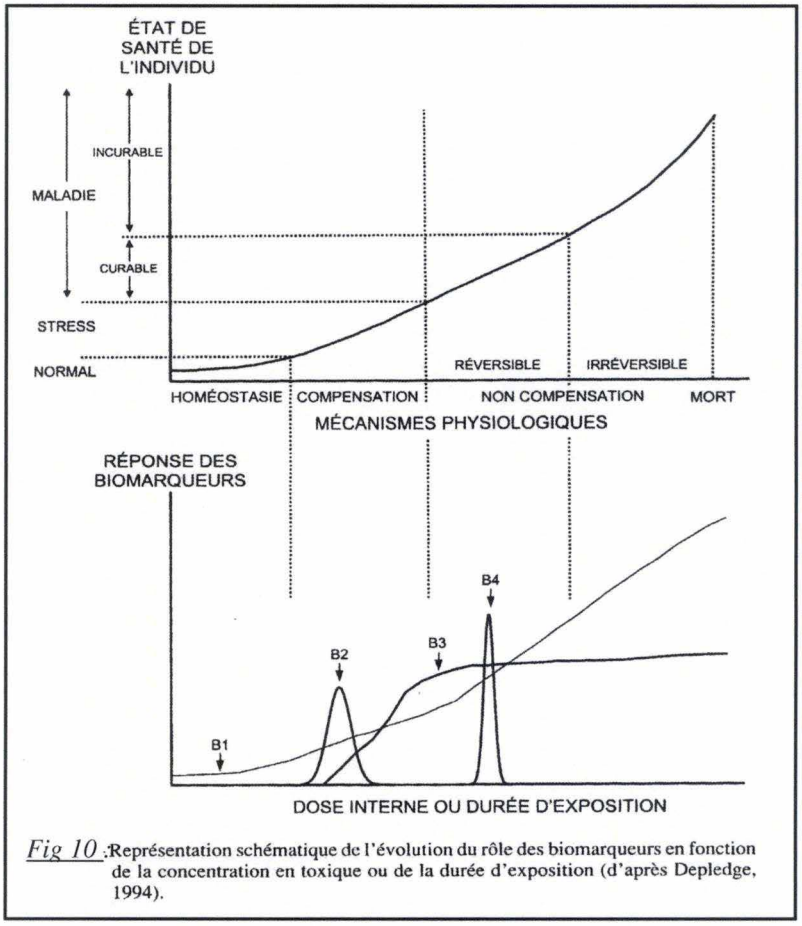


Fig 10 : Représentation schématique de l'évolution du rôle des biomarqueurs en fonction de la concentration en toxique ou de la durée d'exposition (d'après Depledge, 1994).

qui, laissant passer les ions Cl^-, produit l'hyperpolarisation de la cellule cible (*Figure 9*). Leur activation est donc responsable de potentiels postsynaptiques inhibiteurs classiques, entraînant ainsi une inhibition de la neurotransmission[4]. Le blocage de cette activité par les insecticides cyclodiènes résulte en une repolarisation seulement partielle du neurone et en un état d'excitation incontrôlable (Klassen et Watkins, 1999 in WHO, 2000).
Lors de contaminations humaines, des symptômes tels que des convulsions, des vomissements, de l'incoordination, de l'excitation et dans certains cas, un coma et une hypotension peuvent être observés.

4. Les biomarqueurs

4.1 Que sont-ils ? Pourquoi les utilise-t-on?

Un des problèmes majeurs abordés par l'écotoxicologie est l'évaluation de l'exposition de communautés naturelles à des polluants et des impacts qui en résultent. Pour y faire face, en plus d'études de « biomonitoring », l'écotoxicologiste étudie de plus en plus souvent les réponses des organismes face à un ou plusieurs contaminants présents dans l'environnement. Ces réponses, définies comme biomarqueurs, constituent un changement observable et/ou mesurable aux niveaux 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). Le fait que la toxicité d'un contaminant se fasse généralement remarquer en premier lieu à un niveau biochimique et moléculaire (ex : changement de l'activité enzymatique, expression génique,...) et seulement plus tard, au niveau des cellules, des tissus, des organismes et éventuellement au niveau des populations, permet aux biomarqueurs d'être utilisés comme indicateurs précoces de disfonctionnements ultérieurs au niveau des populations. Ils constituent un outil précieux pour les scientifiques et gouvernements qui tentent d'instaurer des règlementations pour éviter des dommages à l'environnement.
Les biomarqueurs sont généralement divisés en 2 types : les biomarqueurs **d'exposition** à un xénobiotique et les biomarqueurs **d'effets** de l'exposition. Les premiers permettent la mise en évidence d'une exposition présente ou passée de l'organisme au polluant. Les seconds sont utilisés pour évaluer les effets des xénobiotiques sur les individus (ex : l'inhibition de l'AchE, les protéines de stress) (Forbes et *al.*, 1995).
Bien qu'encore fort théorique, l'approche des biomarqueurs par Depledge (1994) est fort intéressante. Il les replace dans un contexte fonctionnel et considère leur rôle par rapport à l'état d'homéostasie de l'organisme (*Figure 10*)
En dessous d'une certaine concentration du contaminant et/ou d'une certaine durée d'exposition, les biomarqueurs modèrent l'action des polluants sur les individus et contribuent principalement au maintien de l'homéostasie. Lorsque la dose interne et/ou la durée d'exposition augmentent, certains biomarqueurs interviennent pour compenser l'action des contaminants, notamment en limitant leur toxicité (ex : cytochrome P450, métallothionéines, protéines de stress). D'autres biomarqueurs, appelés biomarqueurs de non-compensation, ne contribuent en rien à limiter l'action des toxiques et ne font que la subir (ex : inhibition de l'AchE).

[4] : http://neurobranches.chez-alice.fr/neurophy/aainhib2.html

4.2 Pourquoi utiliser des biomarqueurs en aquaculture ?

En aquaculture, les scientifiques deviennent de plus en plus conscients de la nécessité de développer des outils précis pour estimer les effets toxiques des produits chimiques fréquemment utilisés (Bainy, 2000). Les risques ne peuvent pas être évalués uniquement après des analyses chimiques d'échantillons prélevés dans l'environnement car cette approche n'apporte aucune information concernant les effets néfastes des contaminants sur le biotope (Cajaraville et *al.*, 2000). La compréhension des mécanismes mis en place au niveau métabolique par les crevettes lors de l'exposition à différents produits chimiques aide à développer des biomarqueurs moléculaires et cellulaires précis et sensibles, capables d'anticiper les changements qui pourraient se produire à des niveaux supérieurs de l'organisation biologique (c-à-d population, communauté ou écosystème). Donc, ceux-ci peuvent être utilisés comme outil de prédiction, permettant la mise en œuvre de stratégies de remédiation avant que des dommages environnementaux irréversibles ne se produisent. Nous pouvons donc dire des biomarqueurs qu'ils sont des indicateurs à court terme d'effets biologiques à long terme (Cajaraville et *al.*, 2000). Ils peuvent être utilisés dans le but d'atteindre une meilleure gestion des systèmes de production et in fine, de mettre en place une aquaculture durable.

5. Les protéines de choc thermique

5.1 Que sont-elles ? Quels sont leurs rôles ?

Les protéines de choc thermique (« heat shock proteins » ou HSPs), qui, comme leur nom l'indique, ont été initialement découvertes suite à un stress thermique (Tissières et *al.*, 1974), font partie des « protéines de stress ». Pour certains, ce terme désigne toutes les protéines inductibles par un stress comme par exemple, les protéines « glucose-régulées », les ubiquitines, les métallothionéines, les HSPs,...alors que d'autres l'utilisent pour parler des protéines de choc thermique uniquement. En effet, plus tard, il a été découvert que les HSPs peuvent être induites par une multitude de stress environnementaux autres que la chaleur. Dans ce travail, seules les HSPs seront reprises sous le vocable de protéines de stress. Les HSPs, exprimées de manière constitutive (c'est-à-dire qu'elles peuvent être présentes dans la cellule en absence de tout stress) ou inductible, sont capables de se lier à d'autres protéines intracellulaires quand ces dernières se trouvent dans une conformation non-native, soit suite à un stress ou soit parce que les peptides les constituant n'ont pas encore été totalement synthétisés, pliés, assemblés ou localisés dans le compartiment cellulaire approprié (Feder et Hofmann, 1999 ; Hightower, 1993 in Dhainaut et *al.*, 1997). A ce titre, elles appartiennent à la super-famille des chaperones moléculaires (Gething et Sambrook, 1992 in Aït-Aïssa, 2000).
En conditions physiologiques non stressantes, elles jouent un rôle central dans la régulation de l'homéostasie protéique et remplissent de nombreuses fonctions dans le maintien de l'intégrité cellulaire et la prévention contre tout dysfonctionnement intracellulaire. En cas de stress, les HSPs sont surexprimées et elles vont protéger les protéines fonctionnelles, réparer les protéines altérées ou acheminer les protéines trop sérieusement endommagées aux lysosomes afin d'y dégrader ces dernières et contribuer ainsi à la restauration progressive des fonctions cellulaires normales et donc à la survie de la cellule.

Tableau 8 : Localisations et rôles cellulaires des différentes protéines de choc thermique (modifié d'après Hartl et *al.*, 1994 ;Liautard, 1994; Ait-Aissa, 2000)

Familles d' HSP	Localisations	Rôle constitutif	Rôle après induction par un stress
HSP90	Cytoplasme Réticulum endoplasmique	Formation de complexes protéiques avec plusieurs enzymes, récepteurs (ex : hormonaux) et composants du cytosquelette	Serait impliquée dans le développement de thermotolérance/résistance au stress
HSP70	Cytoplasme Réticulum endoplasmique Mitochondrie Noyau Chloroplaste	- Régule l'homéostasie protéique : • mise en forme • assemblage • transport intracellulaire • réparation des protéines - Rôle de chaperone moléculaire qui prévient et protège de la dénaturation protéique -Impliquée dans la réponse immunitaire (transport de l'antigène), phagocytose.	Protection contre toute forme de protéotoxicité : • formation de complexes protéiques qui évitent la dénaturation (notamment pour des molécules vitales pour la cellule) • empêche la formation d'agrégats insolubles (létaux pour la cellule) • destruction des agrégats formés, renaturation des protéines endommagées • transport des protéines très endommagées vers la dégradation lysosomiale.
HSP60 (chaperonine)	Cytoplasme Mitochondrie Chloroplaste	Chaperone moléculaire : • mise en forme et assemblage des protéines • prévention de l'agrégation des peptides naissants	• Renaturation des protéines altérées • Protection contre la dénaturation et l'agrégation mais incapable, contrairement aux HSP70, de casser les agrégats formés
sHSP	Cytoplasme	• Protéines de liaison du collagène • Chaperone moléculaire potentiel	• Intéraction avec les filaments d'actine : stabilise le cytosquelette après traitement toxique • Impliquée dans la thermotolérance

Les protéines de choc thermique ainsi que les gènes correspondant sont extrêmement conservés et sont retrouvés chez tous les organismes examinés jusqu'à ce jour, depuis la bactérie jusqu'à l'homme (Schlesinger et al, 1982 in Dhainaut et *al.*, 1997).

5.1.1 Familles et rôles des HSPs

Les protéines de stress se répartissent en plusieurs familles selon leur poids moléculaire, les principales familles d'HSP étant d'environ 90, 70, 60 et 16-24 kiloDaltons (kDA) (Sanders, 1993), respectivement nommées HSP90, HSP70, HSP60 (chaperonines) et sHSP (small HSP). Notons que d'autres protéines de stress, non présentées dans ce travail, sont connues et appartiennent à la famille des HSPs. L'ubiquitine (Sanders, 1990 in Dhainaut et *al.*, 1997) et les nucléoplasmines (Liautard, 1994 in Dhainaut et *al.*, 1997) en font notamment partie. Les différentes isoformes retrouvées au sein de chaque groupe varient selon leur localisation intracellulaire, leur fonction et les espèces dans lesquelles elles sont décrites (Aït-Aïssa, 2000). Le *tableau 8* résume la localisation et les rôles des 4 principales familles de protéines de stress sous conditions physiologiques normales et après induction par un stress.

***La protéine HSP90** est impliquée dans la régulation de plusieurs activités cellulaires en se liant plus particulièrement à des protéines engagées dans la transduction du signal, formant ainsi divers complexes multiprotéiques régulateurs de fonctions particulières (Lewin, 2004). Par exemple, dans le cytoplasme, elle est fréquemment associée aux récepteurs nucléaires d'hormones tels que les oestrogènes, la progestérone et assure leur inactivation en l'absence de ligand. Lorsqu'ils sont activés par le ligand, il y a dissociation du complexe HSP90-récepteur et translocation du récepteur vers le noyau où il se fixe à l'ADN pour moduler l'expression de gènes spécifiques. Faiblement inductible par le stress (augmente d'un facteur 3-5) en comparaison aux HSP70, son potentiel en tant que marqueur de toxicité est controversé (Bagchi et *al.*, 1996).

***La protéine HSP70** est la plus abondante et la mieux conservée des HSPs (près de 50% d'homologie entre toutes les espèces caractérisées) (Morimoto, 1993 in Aït-Aïssa, 2000). La HSP72 et la HSP73 (ou HSC70) constituent les deux isoformes majeures de cette famille. La première est absente en conditions physiologiques normales et fortement inductible par le stress tandis que la seconde est exprimée constitutivement dans toutes les cellules ou tissus et est faiblement inductible (Aït-Aïssa, 2000). Une HSP70 typique comprend 2 domaines: le domaine N-terminal qui est une ATPase et le domaine C-terminal qui se lie au polypeptide cible. La HSP70 vacille entre 2 états: un durant lequel elle est jointe à de l'ATP et se lie rapidement à son substrat et un second état durant lequel elle est jointe à de l'ADP et réagit lentement. Le changement entre ces deux états est régulé par deux autres protéines, les HSP40 et le GrpE (Lewin, 2004). Dans tous les cas, l'ATP est requise afin de fournir l'énergie nécessaire aux intéractions entre les HSP70 et leurs protéines-cibles au niveau de sites hydrophobes et pour moduler leur repliement, leur transport au travers des membranes biologiques et/ou leur réparation (Kiang et Tsokos, 1998). Sous conditions de stress, les HSP70 qui se trouvent dans le cytoplasme migrent dans le noyau où elles se lient aux pré-ribosomes ou autres complexes protéiques pour les protéger contre la dénaturation (Gething et Sambrook, 1992 in Aït-Aïssa, 2000). Elles empêchent également la formation d'agrégats insolubles qui sont particulièrement nuisibles pour la cellule (Ellis et *al.*, 1989 et Pelham, 1990 in Dhainaut et *al.*, 1997). Il a été mis en évidence que les HSP70 sont capables de casser les agrégats présents et que de plus, elles permettent à des protéines abîmées de se replier et de

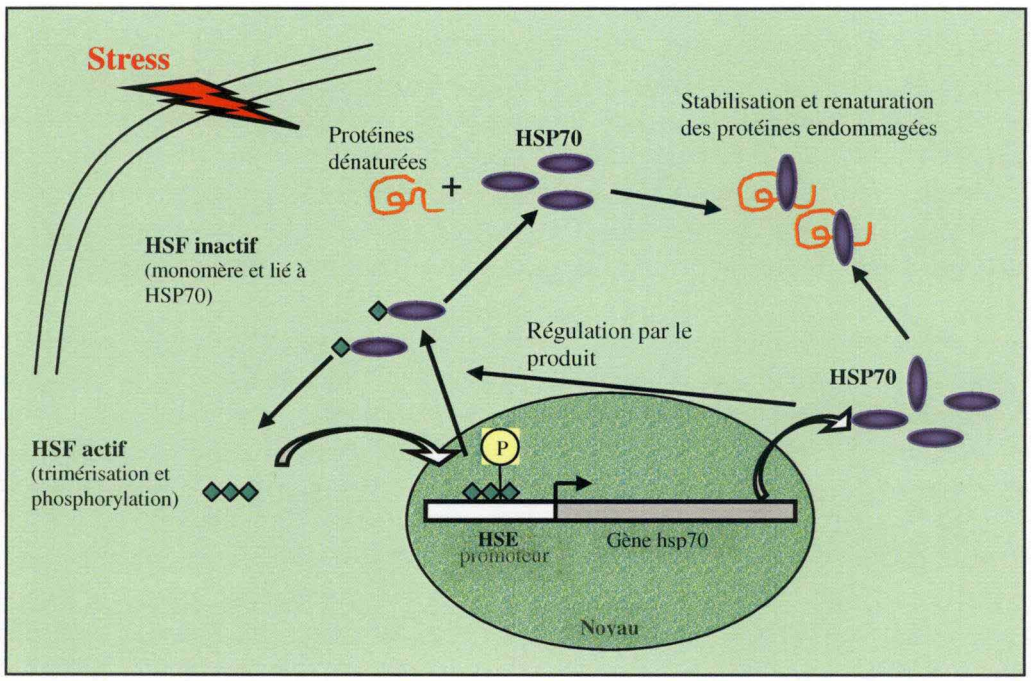


Fig 11: Régulation de la réponse à un choc thermique (ou autre stress). Modifié d'après (Aït-Aïssa, 2000 ; Santoro, 2000 ; Olsson, 2005)

retrouver leur activité biologique originelle (Gaitanaris et *al.*, 1990 ; Skowyra et *al.*, 1990). Finalement, les HSP70 acheminent les protéines très endommagées jusqu'aux lysosomes pour qu'elles y soient dégradées (Chiang et *al.*, 1989).

*Les protéines de **la famille des HSP60** (ou **chaperonines**) ont également une fonction de chaperone moléculaire et assurent le repliement et l'assemblage des protéines non natives selon un mécanisme ATP-dépendant. Ces fonctions sont assurées par une structure oligomèrique de 14 sous-unités de 60 kDa arrangées en 2 anneaux heptamériques inversés. La synthèse des chaperonines s'accroît notablement lors d'agressions responsables d'une dénaturation des protéines. Lorsqu'elles sont induites, elles ont un rôle préventif contre toute dénaturation ou agrégation mais ne semblent pas capables, comme les HSP70, de dégrader les agrégats protéiques formés (Morimoto et *al.*, 1994 in Aït-Aïssa, 2000).

***Les HSP de faible poids moléculaire** sont très spécifiques, étant dès lors les moins bien conservées des protéines de stress (Lindquist, 1986). Au cours du cycle cellulaire, elles ont un rôle majeur dans la transduction du signal vers les microfilaments du cytosquelette. La stabilisation du cytosquelette par interactions avec les microfilaments d'actine constituerait leur rôle principal dans la participation à la survie cellulaire après un stress toxique (Arrigo et Landry, 1994 in Aït-Aïssa, 2000).

5.2 Induction des protéines de stress

5.2.1 Mécanisme de l'activation transcriptionnelle des gènes HSP

Chez les eukaryotes, l'induction des gènes HSP nécessite l'activation et la translocation dans le noyau d'une protéine particulière, le HSF (heat shock factor), qui reconnaît des séquences spécifiques d'ADN appelées « heat shock elements » (HSE) présentes en plusieurs exemplaires dans les promoteurs des gènes HSP (*Figure 11*) (Wu, 1995 et Morimoto et *al.*, 1996 in Santoro, 2000). Plusieurs HSF ont été clonés chez les vertébrés (HSF1, HSF2, HSF3 et HSF4) mais c'est principalement le HSF1 qui est impliqué dans l'activation des gènes HSP lors de la réponse au stress (Satyal et Morimoto, 1998 in Aït-Aïssa, 2000). Les HSFs ont 2 caractéristiques hautement conservées: un domaine de fixation à l'ADN d'environ 100 acides aminés du côté N-terminal et un motif hydrophobe qui permet l'oligomérisation des HSF (Clos et *al.*, 1990 in Morimoto et *al.*, 1992).
En conditions physiologiques normales, le HSF inactif, ne pouvant pas lier l'ADN, est présent dans le cytoplasme sous forme de monomère associé à une HSP70.
Mais comment la cellule eucaryote perçoit-elle un changement de température (ou autre stress) dans l'environnement et induit-elle dès lors l'activation du HSF? Une hypothèse prédomine: l'accumulation de protéines intracellulaires endommagées accroît le besoin de protéines chaperones telles que les HSP70 et HSP90 afin d'empêcher l'apparition et l'agrégation de protéines dénaturées. Cela entraîne une diminution du pool intracellulaire en chaperones libres, annulant ainsi la régulation négative qu'elles exercent sur l'activité du HSF. Ce dernier s'oligomérise alors sous forme de trimère, migre dans le noyau où il est enclin à une phosphorylation sur des résidus sérine (ce qui lui confère son activité transcriptionnelle), se lie aux HSE, induisant une augmentation de la synthèse des protéines de stress dans la cellule (Kiang et Tsokos, 1998). Au fur et à mesure que le nombre d'HSP augmente et atteint un niveau proportionnel à la quantité de protéines dénaturées, les HSP70 et autres chaperones

retournent dans le noyau pour se lier aux HSF activés, inactivant ces derniers (dissociation du trimère et retour à un état monomérique inerte) et réprimant dès lors la transcription des gènes de choc thermique (Morimoto et Santoro, 1998 et Shi et al, 1998 in Santoro, 2000).

5.2.2 Les inducteurs de HSPs

Comme déjà dit précédemment, la réponse cellulaire au stress a été mise en évidence à l'origine dans le cas d'un stress thermique, mais cette réponse s'observe en fait pour une grande variété de stress. Les différentes conditions susceptibles d'induire la synthèse d'HSP ont été classées en 3 catégories par Morimoto et *al.*(1992):

- les stress environnementaux
- les conditions non stressantes
- les états de pathophysiologie et de maladie (infection par un parasite ou un virus (Garry et *al.*, 1983).

La première catégorie regroupe donc des stress tels que la salinité (Werner, 2004), l'anoxie (Ma et Haddad, 1997), le stress oxydant, les métaux lourds ou les métalloïdes (Yu et *al.*, 2006), les agents tératogènes (Bournias-Vardiabasis et Buzin, 1986 in Dhainaut et al ., 1997), les rayonnements ultraviolets (Keyse et Tyrrell, 1989 in Dhainaut et *al.*, 1997), les micropolluants organiques (Sanders, 1993)...L'activation de la transcription des gènes HSP peut également être modulée sous des conditions non stressantes telles que le cycle cellulaire, le développement, la différentiation...

Pour Voellmy (1996 in Aït-Aïssa, 2000), les stress environnementaux peuvent être scindés en 2 groupes majeurs, avec d'un côté, les composés qui agissent spécifiquement au niveau de la synthèse protéique en provoquant la **synthèse de protéines aberrantes** (ex : analogues d'acides aminés, éthanol,...) et d'un autre côté, les agents et traitements qui sont susceptibles **d'altérer la conformation des protéines natives**. Ces derniers peuvent à nouveau être subdivisés car certains d'entre eux induisent une **altération directe** de la **structure tertiaire** des protéines (ex : la température) tandis que d'autres le font via la **perturbation** du **statut d'oxydation/réduction** (rédox) intracellulaire (ex: les composés thiols-réactifs, le stress oxydant, les toxiques du foie, les dérivés quinones, les inhibiteurs des phosphorylations oxydatives).

Dans un bon nombre de cas, l'induction des HSPs par des agents chimiques fait intervenir un changement au niveau du statut rédox de la cellule en faveur des conditions oxydantes (Voellmy, 1996 in Aït-Aïssa, 2000). La génération de protéines malformées serait due à l'oxydation de leurs groupements thiols (SH). L'oxydation de ces groupements aboutit à la formation de ponts disulfures aberrants et provoque des changements de conformation des protéines qui constitueraient alors le signal déclencheur de l'activation des gènes HSP (Ait-Aissa, 2000). Il faut savoir que tous les organes ne présentent pas la même intensité de réponse à l'action du stress. Dans le cas d'un stress toxique par exemple, la réponse est souvent maximale au niveau des organes cibles (Stringham et Candido, 1994 in Dhainaut, 1997). Par ailleurs, la capacité d'un contaminant à induire la synthèse d'HSP varie avec l'espèce considérée. Cette variabilité provient pour une part des capacités d'accumulation et de détoxication propres à chaque espèce (Sanders, 1993).

5.3 HSPs comme biomarqueurs

Puisque l'induction de la synthèse des HSPs constitue une réponse protectrice primaire et qu'elle précède l'apparition d'effets toxiques importants *in vivo*, son utilisation en tant que marqueur d'effets précoces dans l'évaluation du risque écotoxique représente un véritable potentiel (Sanders, 1993).
Pour Sanders (1993), l'utilisation des HSPs en tant que biomarqueurs suppose que l'induction de ces protéines réponde à un certain nombre de critères de base :

- leur synthèse doit être induite par une large variété d'agents stressants
- leur quantité doit s'accroître lorsque les organismes sont exposés aux contaminants pendant une longue période
- la relation entre l'accumulation des HSPs, l'exposition au contaminant et le stress subi par l'organisme doit être connue.

Comme vu précédemment, les exemples disponibles dans la littérature permettent de penser que la synthèse des HSPs peut être provoquée par la plupart des contaminants majeurs de l'environnement (Dhainaut et *al.*, 1997). En ce qui concerne le deuxième critère, bien que cela nécessite des études supplémentaires, plusieurs preuves laissent à penser que la réponse persiste au cours du temps. Chez des moules, par exemple, les chaperonines et les HSP70 restent élevées dans les tissus durant au moins 8 semaines lorsqu'elles sont continuellement soumises à une augmentation de température de 10°C (Sanders et *al.*, 1992).
Néanmoins, de nombreuses considérations doivent être prises en compte lorsque les HSPs sont utilisées comme biomarqueurs (Sanders, 1993 ; Feder et Hofmann, 1999) :

- vu la grande variété de stress induisant la production d'HSP, le risque de ne pas pouvoir attribuer un changement dans l'expression des HSPs à un stress particulier est assez élevé (éviter les faux positifs) ;
- la présence de HSC (= protéines de stress constitutives) peut masquer une induction des HSPs ;
- différentes HSPs peuvent être induites en absence de stress par des hormones stéroïdiennes dans divers tissus cibles (des jeunes organismes ou des femelles à un certain stade de reproduction peuvent exprimer de fortes concentrations en HSP comme conséquence d'un processus physiologique normal) ;
- des fluctuations naturelles de la température peuvent induire la synthèse d' HSP ;
- la nourriture consommée semble également modifier leur synthèse ;
- les HSPs induites par un certain stress peuvent induire une tolérance face au toxique étudié.

Comme déjà dit plus haut, l'induction des HSPs n'est pas spécifique à un substrat et ne peut donc pas servir d'alarme d'exposition à certains composés particuliers. Bien que certaines études aient pu mettre en évidence une nette relation entre l'exposition à une substance toxique

et l'expression d'HSP chez des espèces d'invertébrés (Köhler et *al.*, 1992 in Pyza et *al.*, 1997) et de vertébrés (Williams, 1996 in Pyza et *al.*, 1997), il n'en reste pas moins que l'induction des HSPs constitue une réponse générale au stress et que son utilisation en tant qu'unique biomarqueur d'exposition à un polluant risque d'être limité. Néanmoins, les HSPs peuvent être utiles comme indicatrices d'un stress non spécifique ou en tant qu'élément d'un système multiple de biomarqueurs (Eufemia et Epel, 2000).

6. HSPs et pesticides

6.1 Induction des HSPs par les pesticides

Bien qu'il soit maintenant admis que les protéines dénaturées constituent le signal déclencheur d'une réponse de stress, il existe toujours un manque de connaissances en ce qui concerne les mécanismes de toxicité menant à ces altérations, et donc à l'activation des HSF, en particulier dans le cas des polluants organiques. Etant donné l'importante diversité d'initiateurs, nous pensons que la réponse cellulaire au stress est déclenchée par différents mécanismes de toxicité, parmi lesquels la protéotoxicité serait le lien commun (Aït-Aïssa et *al.*, 2000). L'induction d'une réponse cellulaire suite à un stress chimique peut être due à des perturbations du **statut rédox** de la cellule suite à un stress oxydant, d'altérations de l'homéostasie ionique ou d'inhibiteurs du métabolisme énergétique (Voellmy, 1996 in Aït-Aïssa et *al.*, 2000). De tels agents inducteurs interagissent soit directement, soit indirectement avec les protéines et conduisent à l'oxydation des groupements thiols, à la formation de ponts disulfures entre les protéines et subséquemment, à leur déstabilisation. De plus, certaines études ont suggéré un lien entre l'induction des HSPs et le métabolisme de certains toxiques par le **cytochrome P450**, qui génère des **métabolites réactifs** capables de se lier de manière covalente aux protéines (Salminen et *al.*, 1996, 1998). Ces associations de xénobiotique-protéine seraient reconnues par le système de choc thermique comme des protéines non natives et activeraient dès lors la réponse. En outre, il a été démontré que des **interactions directes** entre des produits chimiques lipophiles et les **centres hydrophobes des protéines** peuvent conduire à la déstabilisation de la structure de ces dernières et dès lors, induire la synthèse d'HSP.

6.2 Induction des HSPs par l'endosulfan et la deltaméthrine

Lors d'une étude réalisée par Bhavan et Geraldine (2001) sur la réponse au stress induite dans les tissus de la crevette d'eau douce *Macrobrachium malcolmsonii* suite à une exposition à de l'endosulfan (10,6 ; 16,0 et 32,0 ng/l durant 21 jours), il ressort que la toxicité de ce dernier se manifestait par une détérioration de différents polypeptides se trouvant dans les tissus des crevettes testées, aboutissant à une augmentation de la quantité d'acides aminés libres et à une diminution du niveau d'ADN et d'ARN. Une autre étude, réalisée sur la même espèce, a enregistré une augmentation de la production d'HSP70 dans les branchies (mais pas dans les muscles, ni dans l'hépatopancréas) lorsque l'exposition à des concentrations subléthales d'endosulfan correspond à 1/5 (0,032µg/l) et 1/10 (0,016µg/l) de la valeur de la CL_{50} (Selvakumar et *al.*, 2005). D'autres études encore ont été réalisées sur l'induction des HSP70

Tableau 9: Impact de pesticides organochlorés et d'un pyréthroïde (l'esfenvalerate) sur la synthèse d'HSP

Pesticide	Organisme étudié	Quantité du pesticide	Effet(s)	Auteurs
Endosulfan	*Macrobrachium malcolmsonii*	1/5 et 1/10 de la LC_{50}	Induction d'HSP70 dans les branchies mais pas dans les muscles ni dans l'hépatopancréas	Selvakumar et *al.*, 2005
Endosulfan	Cellules HeLa	Exposées 16h au toxique de 25µM	Pas d'effet observé	Aït-Aïssa et *al.*, 2000
Endosulfan	*Chironomus tentans (Diptera chironomidae)*	5 et 50 µg/l ⇨ Induction des HSP70 50 µg/l ⇨ Induction des HSC70		Lee et *al.*, 2006
Lindane	*Raphidocelis subcapitata* (=une algue)	200 mM durant 6 jours	Induction des HSP70	Bierkens et *al.*, 1998
Esfenvalerate	Saumon Chinook juvéniles (4-5 mois)	0,1µg/l	Induction d'HSP 60, 70 et 90 dans les muscles mais pas dans les branchies	Eder et *al.*, 2004

par l'endosulfan ainsi que par le lindane, qui fait également partie de la famille des pesticides organochlorés. Nous n'avons trouvé aucune étude en rapport avec l'induction des autres HSPs telles que les HSP90 et 60 suite à une exposition à des pesticides. De même, en ce qui concerne la deltaméthrine, nous n'avons trouvé aucune étude traitant de son éventuelle capacité d'induction d'HSP. Seule une étude réalisée avec de l'esfenvalerate, appartenant aux pyréthroïdes, a été trouvée (*Tableau 9*).

7. Objectifs

A notre connaissance, bien que les protéines de choc thermique (HSPs) soient très largement étudiées, très peu de travaux ont tenté de connaître l'impact des pesticides sur la production des HSPs chez les crustacés et plus particulièrement chez la crevette géante tigrée *P. monodon*, espèce à haute valeur ajoutée.

Dans ce travail, nous avons voulu approfondir les connaissances existantes sur ce sujet en étudiant l'influence de 2 pesticides largement utilisés par les fermiers, l'endosulfan et la deltaméthrine, sur la production des HSP70, 60 et 90 dans différents organes de la crevette *P. monodon*. A terme, l'objectif est de pouvoir se servir des HSPs comme biomarqueur de stress afin de détecter d'éventuelles contaminations en endosulfan et/ou deltaméthrine dans les crevetticultures et dans les crevettes des mangroves. Cela éviterait de devoir doser les résidus de pesticides dans les tissus, technique coûteuse et difficilement applicable en routine dans les pays producteurs de crevettes tels que le Vietnam.

Pour ce faire, nous avons testé 3 techniques différentes mais toutes 3 basées sur l'immunodétection des HSPs par un anticorps spécifique: l'ELISA, le Slot-Blot, l'électrophorèse 1D et 2D suivie d'un Western-Blot. La première priorité était de mettre au point une technique relativement simple à mettre en œuvre au Vietnam, afin de doser les HSPs dans les organes des crevettes géantes tigrées prélevées dans les fermes ou dans les mangroves. A ce titre, l'ELISA nous semblait être la technique la plus appropriée, étant donné le matériel de laboratoire disponible à l'Université de Can Tho.

Des gels en 2 dimensions ont été réalisés dans l'espoir de découvrir d'éventuelles modifications post-traductionnelles des HSPs telles que la phosphorylation ou d'éventuelles isoformes appartenant à la famille des HSP90 présentes dans les muscles et surtout dans l'espoir de savoir si parmi ces isoformes, certaines enregistrent une modulation de leur expression après exposition des crevettes à des pesticides.

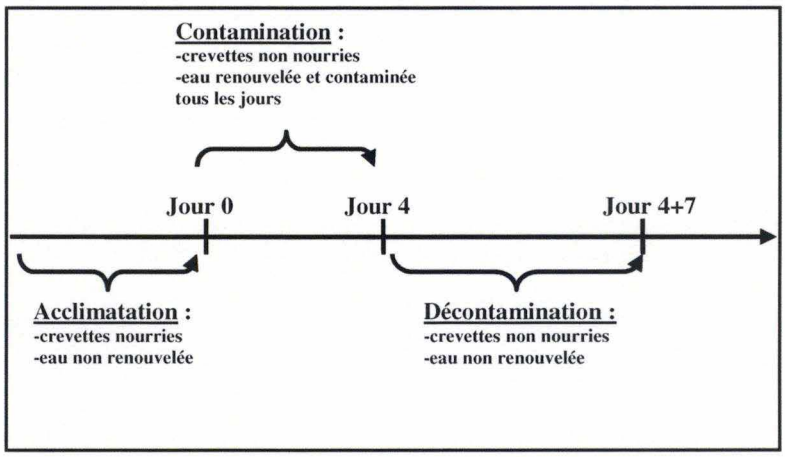


Fig 13: Schéma du déroulement des expériences pour les contaminations à l'endosulfan et à la deltaméthrine

II. Matériel et méthodes

1. Les animaux

Les crevettes tigrées géantes (*Penaeus monodon* Fabricius, 1798) provenaient d'un élevage extensif de la province de Ca Mau. Les individus, mâles et femelles confondus, pesaient en moyenne 8,5 g ± 0,45 g. Des lots de 25 crevettes ont été répartis dans 12 bassins remplis de 200 litres d'eau salée (15ppt). Cette eau a été constituée d'eau naturelle (80ppt) diluée à l'eau de ville. Trois de ces bassins étaient destinés aux crevettes contrôles et les 9 autres étaient destinés aux triplicats des 3 conditions de contamination. Tous les bassins étaient soumis à une photopériode naturelle (12 heures de clarté, 12 heures de nuit) et à une faible aération continue (*Figure 12*).



Fig12: Bassins de 200 litres dans lesquels sont réparties les crevettes

2. Contaminations

Les contaminations ont été menées au Vietnam, au collège d'aquaculture et pêche de l'université de Can Tho. Après le transport, les crevettes ont été stockées dans 3 bassins de $2m^3$ d'eau salée (15ppt). Une première partie d'entre elles a rapidement été répartie dans les 12 bassins de 200 litres afin qu'elle s'y acclimate pendant une semaine avant de commencer la première expérience. Durant cette semaine, les animaux étaient nourris 5 fois par jour (8 :00, 11 :30 ; 14 :00 ; 17 :30 et 21 :00) avec des granulés commerciaux (Greenfeed) contenant 30% de protéines. La portion qui leur était distribuée chaque jour correspondait à 6% de leur poids moyen, soit 11g de granulés par jour par bassin de 200 litres contenant 25 crevettes. Durant les phases de contamination (4 jours) et de décontamination (7jours), les crevettes n'ont plus été nourries (*Figure 13*).

Pour la phase de contamination à l'endosulfan, les différentes concentrations du pesticide dans l'eau étaient de 1µg/l, 0,1µg/l et 0,01 µg/l. La concentration la plus élevée avait été testée au préalable sur quelques crevettes afin de s'assurer qu'elle ne causait aucune mortalité. La répartition des bassins en fonction de leur concentration en pesticides a été réalisée au hasard, évitant de cette façon d'avoir 3 bassins sous la même condition, les uns à côté des autres. L'endosulfan a été solubilisé dans de l'acétone (1mg/10ml= solution stock) avant d'être réparti comme suit dans les bassins :

- contrôle : 20 ml d'acétone ;
- 1µg/l : 2 ml de la solution stock + 18 ml d'acétone ;
- 0,1µg/l : 200µl de la solution stock + 19,8 ml d'acétone ;
- 0,01 µg/l : 20µl de la solution stock + 19,98 ml d'acétone.



Fig 14 : Prélèvement de l'hémolymphe (a), des branchies (b) et de l'hépatopancréas (c).

Chaque jour de la période de contamination, l'eau était renouvelée et le pesticide était à nouveau ajouté au bassin afin de garder une concentration nominale la plus constante possible. Avant le changement de l'eau et une heure après sa contamination, un échantillon de cette dernière était prélevé dans chaque bassin afin de pouvoir déterminer la concentration réelle du pesticide. Ces analyses seront réalisées par le Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires (Prof. Maghuin-Rogister) de l'Université de Liège. Une fois la période de contamination terminée, l'eau des bassins était renouvelée et ensuite laissée telle quelle durant toute la période de décontamination.
Après la première expérience, tous les bassins ont été lavés et décontaminés pour pouvoir entamer la deuxième expérience. Pour la contamination des crevettes à la deltaméthrine, le protocole était identique à celui de la première expérience, si ce n'est que la durée d'acclimatation après avoir transféré les animaux des bassins de $2m^3$ à ceux de 200 litres, n'était que de 2 jours et que les concentrations du pesticide dans l'eau étaient différentes :
- contrôle
- 0,1 µg/l
- 0,01 µg/l
- 0,001 µg/l : 2µl de la solution stock + 20ml d'acétone.

Au cours de ces expériences, nous n'avons noté aucune mortalité parmi les crevettes.

3. Echantillonnage et homogénéisation

Le prélèvement des organes des crevettes a été réalisé juste avant le premier jour de contamination (jour 0), après 4 jours de contamination (jour 4) et 7 jours après l'arrêt des contaminations (jour 4+7).
Le jour des prélèvements, 6 crevettes provenant de chacun des 12 bassins étaient placées dans des seaux distincts et la dissection des organes fut réalisée le plus rapidement possible et par ordre de concentration de contamination croissante. L'hémolymphe a été prélevée dans les vaisseaux ventraux et mélangée à une solution d'anticoagulant (6,2mM EDTA, 19,3mM citrate de sodium, 240mM NaCl et 182,5mM glucose) dans une proportion d'environ 0,3 ml d'anticoagulant par ml d'hémolymphe. L'hépatopancréas, les branchies et les muscles furent prélevés tels quels (*Figures 14*).
Par la suite, tous les organes ont été homogénéisés, soit à l'aide d'un ultraturax (branchies, hépatopancréas et muscles), soit grâce à un piston adapté aux eppendorfs (hémolymphe). Les branchies, les hépatopancréas et les muscles ont été homogénéisés dans du tampon d'homogénéisation (Trizma 50mM, NP-40 1%, H_2O et pH de 7,6) auquel des inhibiteurs de protéases (Sigma P2714) ont été ajoutés dans une proportion 1 :9 après que ceux-ci aient déjà été dilués 10 fois dans de l'eau distillée. Les concentrations finales en inhibiteurs étant dès lors : AEBSF 2mM ; EDTA 1mM ; bestatin 130µM ; E-64 14µM ; leupeptin 1µM ; aprotinin 0,3µM. Lors de l'utilisation de l'ultraturax, chaque échantillon a été homogénéisé 4 fois durant 15 secondes et placé sur glace entre temps. La vitesse d'homogénéisation a été modifiée en fonction des organes : 13500 tours/minute pour les muscles et les branchies tandis qu'elle n'était que de 9500 tours/minute pour l'hépatopancréas.
Après cela, nos échantillons ont été centrifugés, une première fois à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C pour les organes gras tels que l'hépatopancréas et ensuite tous les organes à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les surnageants, constituant la partie post-mitochondriale, ont ensuite été récupérés avant d'être répartis en aliquots de 100 µl et congelés à -80°C.

Et... ?

4. Dosage des protéines selon la méthode Bradford

Dix mg d'albumine de sérum bovin (BSA) ont été dissous dans 1 ml d'eau, et ensuite 10 fois dans du tampon d'homogénéisation (Trizma 50mM, NP-40 1%, H_2O et pH de 7,6) avant de les utiliser pour réaliser notre courbe d'étalonnage (10- 5- 3- 1 µl dans les cuvettes contenant une solution Biorad diluée 5 fois dans de l'eau). Trois « blancs tampons d'homogénéisation » ont également été conçus en ajoutant 5 µl de ce tampon aux cuvettes. Après dilution des échantillons (5 fois pour les muscles, 25 fois pour les branchies, 10 fois pour l'hépatopancréas et 50 fois pour l'hémolymphe) dans du tampon d'homogénéisation, 5µl étaient ajoutés dans les cuvettes avant de lire leur absorbance (2 minutes à 1 heure plus tard) au spectrophotomètre à 595 nm. Chaque échantillon et chaque courbe d'étalonnage furent réalisés en duplicats. La quantité de protéines fut calculée à l'aide du programme Excel™ et exprimée en µg de protéines/µl de surnageant.

5. Dosage des HSPs

5.1 Dosage à l'aide de la technique enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Nous nous sommes basés sur le protocole décrit par Cimino et *al.* (2002) pour doser la quantité d'HSP présente dans nos échantillons, à l'aide de la technique ELISA. Avant d'être posés dans les puits (plaque NUNC Maxi Sorp et un essai sur une plaque Falcon), les échantillons ont été dilués dans du tampon de coating (= tampon carbonate 100mM, pH 9,6: Na_2CO_3 64mM; $NaHCO_3$ 136mM + eau) et d'homogénéisation (déjà décrit précédemment) afin d'obtenir 33 µg de protéines totales dans 100µl de tampon. Une courbe d'étalonnage a été réalisée avec des HSPs purifiées (200-100-50-25 ng d'HSP/100µl de tampon de coating et d'homogénéisation (Recombinant Chinook Salmon Hsp70-Stressgen, SPP-763B; Recombinant Human Hsp60-Stressgen, NSP-540B; Recombinant Human Hsp90-Stressgen, SPP-770B)) ainsi que des blancs tampons (proportion 1 :1 des deux tampons). Cent microlitres de blancs, d'HSPs purifiées et de solution d'échantillon ont été déposés dans des puits distincts. La plaque a été recouverte d'un parafilm et a incubé une nuit à 37°C. Le deuxième jour, le reste de tampon a été vidé et chaque puits a été rincé 3 fois avec 200µl de PBS (Phosphate-Buffered Saline, Ca/Mg free; pH 7,4: 137mM NaCl ; 2,6mM KCl; 8,1mM Na_2HPO_4; 1,47mM KH_2PO_4 + eau) qui a subséquemment été évacué. Nous avons ensuite ajouté dans chaque puits 125µl d'un tampon de bocage (PBS avec du BSA 1%) que nous avons laissé incuber 2 heures à température ambiante avant de retirer le surplus et de rincer 3 fois chaque puits avec 200µl de tampon de rinçage (PBS avec 0,05% de Tween). Ensuite, nous avons appliqué 100µl d'anticorps primaires (Mouse monoclonal IgG1-Bioreagent, MA3-006; Mouse Anti-Hsp60 monoclonal-Stressgen, SPA-807D; Mouse Anti-Hsp90 monoclonal-Stressgen, SPA-830D) préalablement dilués 5000 fois dans du tampon d'anticorps (PBS avec 1% de BSA) que nous avons laissé dans les puits durant 1 heure. Après 3 rinçages au tampon de rinçage, ce sont des anticorps secondaires (ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody, de mouton) couplés à une Horse Radish Peroxydase (HRP), dilués 1000 fois, qui ont été pipetés dans chaque puits (100µl) et qui y ont incubé 1 heure. Le dernier rinçage a été réalisé 4 fois. Cent µl de la solution d'ABTS (2,2'-azino-di-(3 ethylbenzthiazoline sulfonic acid) (Sigma A1888) 1mM dans du tampon citrate-phosphate 70mM, pH 4,2; 29,4mM

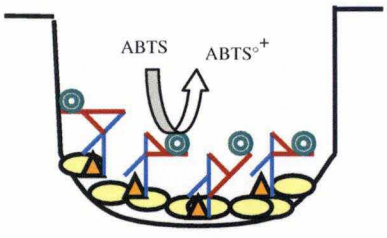


Fig 15 : Illustration du fonctionnement de l'ELISA dans un puits: =protéines; = Hsp; = anticorps I; = anticorps II couplé à 1 HRP.

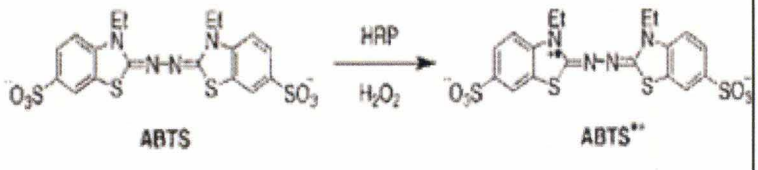


Fig 16 : Réaction d'oxydation de l'ABTS



Fig 17: Montage pour la réalisation d'un Slot Blot: Slot Blot surélevé raccordé à une pompe à vide.

$C_6H_8O_7$; 41,2mM $Na_2HPO_4.12H_2O$ + eau), à laquelle est ajouté de l'H_2O_2 (1µl d'H_2O_2/ml de solution d'ABTS), ont été déposés dans chaque puits. La peroxydase conjuguée à l'anticorps secondaire induit l'oxydation de l'ABTS en un radical cation, dont l'accumulation est responsable de la coloration verte du puits (*Figure 15 et 16*). La densité optique du produit de réaction a été mesurée à plusieurs intervalles de temps (jusqu'à 24 heures) à deux longueurs d'onde (410nm et 492nm en Belgique ; 405nm et 492nm au Vietnam) distinctes.
La valeur d'absorbance obtenue avec la seconde longueur d'onde était soustraite de celle obtenue avec la longueur d'onde de 410nm. Les concentrations en HSP des échantillons ont été calculées après comparaison avec les valeurs de densité optique obtenues avec une courbe d'étalonnage constituée d'HSP purifiées à différentes concentrations.
Nous avons tenté d'optimiser cette technique en testant différents facteurs tels que :

- la nature du tampon de coating ;
- le pH du tampon de coating ;
- la dilution des anticorps ;
- la concentration en protéines dans les puits ;
- le temps et la température de l'incubation de l'anticorps primaire ;
- la solution révélatrice ;
- la composition du tampon d'anticorps pour l'anticorps secondaire ;
- la nature du tampon d'homogénéisation ;
- le type de plaque utilisée.

5.2 Dosage à l'aide de la technique Slot Blot

5.2.1 Les HSP70

Les échantillons ont été dégelés et dilués dans du tampon de dilution (0,1 mg/ml de SDS et 1,6 mg/ml de DTT (DL-Dithiothreitol, Sigma-Aldrich) dans du TBS (Trizma 10 mM, NaCl 150 mM dans de l'eau à pH 7,5)) afin d'obtenir 3µg de protéines totales pour les homogénats de muscles et 2 µg pour les homogénats de branchies dans 300 µl de tampon. Un blanc (tampon d'homogénéisation et tampon de dilution dans un rapport 1 :25) et une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide d'HSP70 purifiées (5ng ; 2,5ng ; 0,5ng et 0ng/300µl) (Recombinant, Chinook salmon, Stressgen, SPP-763B) ont également été préparés. Les échantillons, le blanc et les étalons ont été bouillis pendant 5 minutes. Les 3 filtres (papier-filtre BIO-RAD) et la membrane (=nitrocellulose, 0,45µm; BIO-RAD) ont été mouillés dans du TBS pendant quelques minutes avant d'être placés sur le slot blot surélevé et raccordé à une pompe à vide (*Figure 17*). Après avoir procédé à la fermeture en croix du couvercle, la membrane a été réhydratée en ajoutant 200µl de TBS dans chaque puits. Une fois que les échantillons (tous réalisés en duplicat), le blanc et les étalons bouillis étaient refroidis, ils ont été vortexés avant d'être chacun posé (300µl) dans des puits distincts. Le vide a été fait et il a fallu attendre que tous les échantillons soient absorbés avant de procéder au rinçage en ajoutant 300µl de TBS dans chaque puits et en faisant à nouveau le vide. La nitrocellulose a ensuite été enlevée du slot blot et placée dans une solution de blocage (5% de lait en poudre dans du TBST (TBS + 0,05% de Tween)) pendant 1 heure. Avant d'ajouter la solution d'anticorps primaires anti-HSP70 (2% de lait en poudre dans du TBST et des anti-HSP70 à une dilution 1/1000) (Mouse monoclonal IgG1, Affinity Bioreagents, MA3-006), nous avons procédé au lavage en trempant la nitrocellulose 2 fois 5 minutes dans du TBST puis une fois 5 minutes dans du TBS. Après

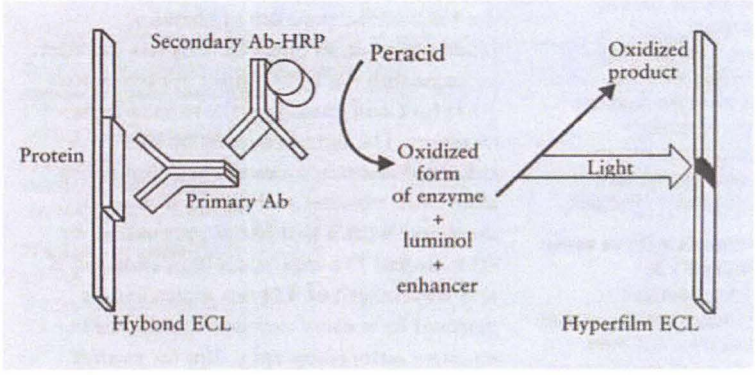


Fig 18: Fonctionnement du slot Blot et de la révélation

une heure dans la solution d'anticorps primaires, des lavages tels que décrits plus haut (2 fois TBST, 1 fois TBS) ont à nouveau été réalisés avant d'immerger la nitrocellulose dans une solution d'anticorps secondaires (ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody, de mouton) (2% de lait en poudre dans du TBST et des anticorps secondaires à une dilution 1/2000) pour une durée d'une heure. Après cela, les lavages étaient de 3 fois 5 minutes dans du TBST et une fois 5 minutes dans du TBS.
La révélation a été effectuée par chémiluminescence (ECL) en imbibant la membrane de 2 réactifs ECL (« enhanced luminol reagent et oxidizing reagent », PerkinElmer™) en proportion 1 :1 pendant une minute. Cette dernière a été rapidement placée dans une chemise transparente qui est ensuite glissée dans une cassette. La révélation a été terminée en chambre noire sous lumière rouge : 1/3 de film (Hyperfilm™ ECL, Amersham Biosciences) était placé contre la membrane tout en étant gardé au sec grâce à la chemise plastique. La cassette était refermée et l'impression s'est opérée pendant une durée comprise entre 1 à 5 minutes, en fonction des échantillons (*Figure 18*).
Le film a ensuite été baigné dans le révélateur (Ilford Rapid Fixer) (dilué 10 fois dans de l'eau) jusqu'à apparition des bandes, puis dans l'eau, dans le fixateur (Ilford PQ Universal) (dilué 10 fois dans de l'eau) et finalement à nouveau dans l'eau.
Les films ont ensuite été scannés à l'aide du programme Labscan5 (Amersham) et analysés grâce au programme TotalLab (Amersham). Après analyse, les volumes des bandes obtenues avec nos échantillons ont été convertis en ng d'équivalent HSP/µg de protéines totales étant donné que les HSP70 utilisées ne provenaient pas de la même espèce que notre espèce d'intérêt.

5.2.2 Les HSP60

Pour les HSP60, la même méthode a été utilisée, seuls quelques détails ont différé: les quantités d'HSP60 purifiées (Recombinant, Human, Stressgen, NSP-540B) utilisées pour la courbe d'étalonnage étaient moindres (0,5 ng; 0,25 ng ; 0,1 ng et 0 ng/300µl) et les anticorps primaires étaient des anti-HSP60 (Mouse Anti-Hsp60 Monoclonal, Stressgen, SPA-807D) alors que les anticorps secondaires sont restés identiques.

5.2.3 Les HSP90

Pour le dosage des HSP90 dans nos échantillons, nous avons calculé une abondance relative par rapport à un échantillon de référence (un mélange d'échantillons de muscles). Dès lors, les concentrations exactes en HSP90 n'ont pu être calculées et nous avons exprimé nos résultats sous forme d'un rapport (volume de la bande obtenue avec 3µg d'échantillon/volume de la bande obtenue avec 3µg de l'échantillon de référence). Les anticorps primaires utilisés étaient des anti-HSP90 monoclonaux de souris (Stressgen, SPA-830D) et l'anticorps secondaire est resté le même que pour les autres HSPs.

5.2.4 Les analyses statistiques

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 2 critères (ANOVA II) pour des mesures répétées. Le premier facteur, le « temps », avait une valeur différente pour chaque échantillonnage (jour 0 ; 4 jours de contamination ; 7 jours de décontamination) ; le second facteur, le « traitement », avait 4 valeurs distinctes correspondant aux 4 concentrations de pesticide utilisées (y compris le contrôle) ; chaque bassin de contamination était échantillonné aux 3 différents temps et correspondait donc aux mesures répétées. 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 les variances n'étaient pas homogènes, une transformation logarithmique des valeurs a été effectuée. Lorsque l'interaction entre le temps et le traitement était significative, cela exprimait un effet « temps » différent en fonction du « traitement », et donc que l'exposition au pesticide influençait la variable dépendante sélectionnée. 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 indépendant du « temps » dans certains bassins, et donc indépendant du pesticide.

Lorsque les ANOVA ont mis en évidence un effet significatif, le test de Scheffé a été réalisé afin de distinguer quelles moyennes différaient des autres. Une différence entre 2 moyennes a été considérée comme non significative lorsque le « *P*-level » c'est à dire le niveau de probabilité était supérieur à 0,05, significative quand *P* était compris entre 0,05 et 0,01, hautement significative quand *P* était compris entre 0,01 et 0,001 et la différence était très hautement significative lorsque *P* était inférieur à 0,001.

6. Western blot

expliquer ?

Afin de vérifier qu'il n'y avait pas de réactions croisées entre les anticorps primaires et des protéines autres que nos HSPs d'intérêt, nous avons réalisé plusieurs Western blot.
Pour ce faire, nous avons coulé un « running » gel de 1,5mm d'épaisseur contenant 10% d'acrylamide (acrylamide 10%; 0,375M Tris HCl pH 8,8; APS 1%; Temed 0,0139%; SDS 0,1%). Une fois ce dernier polymérisé, nous lui avons superposé un « stacking » gel (acrylamide 3%; 0,125M Tris HCl pH 6,8; APS 1%; Temed 0,0139%; SDS 0,1%) dans lequel nous avons placé un peigne à 15 puits. Entre temps, nous avons procédé à la réduction de nos échantillons. Ces derniers ont été dilués dans du tampon Laemmli 2X concentré (225mM Tris pH 6,8; SDS 4%; DTT 4%; Glycérol 20%; Bleu de bromophénol 0,02%) dans une proportion 1:1 et bouillis durant 5 minutes. Après avoir réalisé le montage dans la cuve à électrophorèse et après y avoir versé du tampon d'électrophorèse (25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS + eau), les puits ont été chargés avec 10 µl d'un marqueur de poids moléculaire (Kaleidoscope Standards-Bio-Rad), 250ng d'HSP70 purifiées (références données précédemment), 200ng d'HSP60 purifiées, 150µg de protéines totales du mélange de référence pour les HSP90 et entre 85 et 110µg de protéines totales pour les échantillons testés (branchies et muscles). Après une migration de 5 heures à 45mA/gel, nous avons démoulé le gel, retiré le « stacking » et équilibré le gel dans du tampon de transfert Towbin (Tris 25mM ; Glycine 192mM ; SDS

0,1% ; méthanol 20% et H_2O). Nous avons également équilibré 6 papiers blot avant d'en placer 3 sur l'anode (+). Nous avons alors superposé une membrane de nitrocellulose (0,45µm) équilibrée durant 5 minutes dans du tampon avant de placer le gel et de finalement le recouvrir des 3 derniers papiers blot. La migration a été effectuée durant 1h30 à 0,8mA/cm^2, soit 180mA dans notre cas. Les membranes ont été récupérées et bloquées une nuit dans du tampon de blocage à 4°C. Ensuite, le même protocole que celui utilisé pour le Slot blot a été suivi : lavages, anticorps primaires, lavages, anticorps secondaires et lavages. Seule la méthode de révélation a été modifiée. Nous avons opté pour la révélation Opti-4CN. Nous avons mélangé 1ml de « Opti-4CN diluent » (Bio-Rad) avec 9ml d'eau et 0,2ml de « Opti-4CN substrate » (Bio-Rad) avant de l'appliquer durant 30 minutes sur notre membrane, jusqu'à coloration maximale. Cette dernière a ensuite été plongée dans l'eau pendant 15 minutes et scannée grâce au programme Labscan5 (Amersham). Nous avons néanmoins réalisé une révélation en ECL afin de voir si les résultats différaient en fonction de la technique utilisée. Pour ce faire, nous avons utilisé le kit de détection « ECL Advance Western Blotting » (RPN2135-Amersham Biosciences). Le protocole est resté le même que pour les Slot Blot (5.2) si ce n'est que les anticorps secondaires ont été dilués 100000 fois étant donné que le kit « ECL Advance » était de 40 à 200 fois plus sensible que le kit ECL utilisé pour la révélation des Slot Blot.

7. L'analyse protéomique

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence une modification de l'expression (ou modifications post-traductionnelles) d'éventuelles isoformes d'HSP90 suite à une exposition à l'endosulfan. Les gels 2D permettent la séparation des protéines en fonction de leur point isoélectrique (1ère dimension) et de leur poids moléculaire (2ème dimension). La réalisation de ces gels se fait en plusieurs étapes, décrites ci-dessous.

7.1 Préparation des échantillons

Nous avons choisi de réaliser l'analyse protéomique sur 6 échantillons : les triplicats des échantillons de muscles soumis à des concentrations de 1µg/l d'endosulfan prélevés au jour 0 (donc avant toute contamination) correspondant aux contrôles et les triplicats des échantillons de muscles soumis à la même concentration mais prélevés au jour 4+7. Ce choix est basé sur les résultats obtenus après analyse des échantillons en slot blot (cfr. Résultats 3.3).
Les échantillons ont été dilués 6 fois dans du tampon de lyse DLA (urée 7M, thiourée 2M, CHAPS 4% 40mg/ml, Tris 30mM à pH 8,5) auquel ont été ajoutés des inhibiteurs de protéases (Sigma P2714) préalablement resuspendus dans 10ml d'eau, dans une proportion 1:9. Les concentrations finales en inhibiteurs devenaient alors : AEBSF 2mM ; EDTA 1mM ; bestatin 130µM ; E-64 14µM ; leupeptin 1µM ; aprotinin 0,3µM.
Les muscles, une fois dilués, ont été homogénéisés à l'aide d'un potter en verre/verre (2X25 secondes), soniqués durant 15 secondes puis centrifugés 15 minutes à 12000 g à température ambiante. Le surnageant a été récupéré et la concentration en protéines y a été dosée à l'aide de la méthode Bradford. Les cuvettes ont été préparées de la manière suivante, après y avoir déposé 1 ml de solution Biorad dilué 5X dans de l'eau:

- une cuvette « blanc tampon » : 10µl de tampon de lyse DLA
- une cuvette avec 10µl de BSA

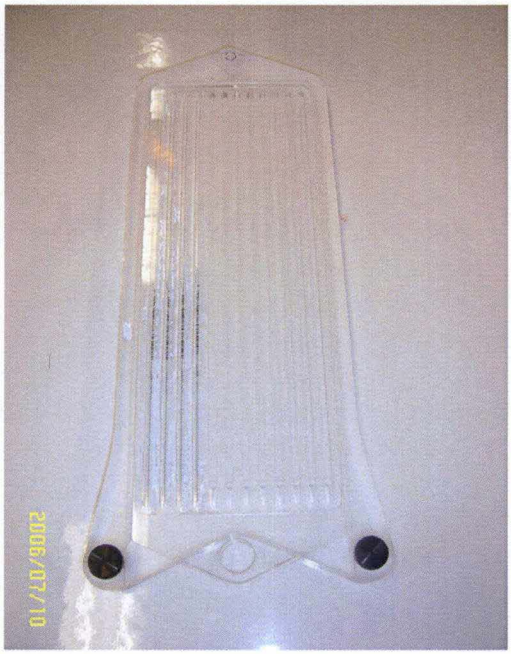


Fig 19: Réhydratation des strips sur le « reswelling tray »



Fig 20: Un « manifold » placé sur un « IPGphor »

- une cuvette « blanc tampon » : 1µl de tampon de lyse DLA
- 6 cuvettes avec 1 µl des différents échantillons.

Le tout fut réalisé en duplicat et lu à une longueur d'onde de 595nm.

7.2 La réhydratation des strips

Afin de réhydrater nos gels 1D (= Immobiline^{TM} Dry Strip-Amersham) de 11cm, 200µl de tampon de réhydratation (urée 7M, thiourée 2M, CHAPS 2%, bleu de bromophénol 0,002%, IPG 4-7 0,5%, DTT 2,8 mg/ml) ont été ajoutés dans chaque bande du « reswelling tray ». Les « strips » ont été placés sur le tampon, gel vers le bas et recouverts ensuite d'huile (3ml/bande) avant d'être réhydratés durant une nuit (*Figure 19*).

7.3 La réduction des échantillons

Les échantillons ont été dilués dans un volume équivalent au leur de tampon de réduction (urée 7M, thiourée 2M, CHAPS 2%, DTT 2%, IPG 4-7 2%). Ils ont ensuite été laissés 15 minutes à température ambiante, pour permettre au tampon contenant du DTT de réduire les ponts disulfures des protéines. Le mélange a par après été centrifugé 10 minutes à 12000 g et le surnageant a été prélevé.

7.4 Electrophorèse en IEF (IsoElectric Focusing) (1ère dimension)

Le gel réhydraté a été placé, gel vers le haut, dans un « manifold » (Amersham Biosciences) lui-même placé sur l'«IPGphor » (Amersham Biosciences) (*Figure 20*). Le manifold a été recouvert de 108ml d'huile. Les puits ont été placés du côté acide du gel et légèrement enfoncés pour être sûr qu'ils soient bien appliqués contre le gel et que les protéines rentrent dans le gel. Deux papiers « wick » imbibés de 150µl d'eau désionisée ont été placés sur le gel, un derrière le puits et le second du côté basique. Ils doivent dépasser les « strips » et se superposer aux gels. Les électrodes ont été placées du côté + sur les papiers « wick » et sur les gels. Le voltage a été testé avant de charger les échantillons (300µg) dans les puits. Pour les gels de 11cm (pH 4-7), la migration a pris environ 5h, avec le programme suivant :

- 1h à 500V step and hold
- 1h à 1000V gradient
- 2h30 à 6000V gradient
- 6000V pour 3000Vh (30min) step and hold

Une fois la migration terminée, les « strips » ont été enlevés du manifold et congelés à -80°C.

7.5 Electrophorèse SDS-PAGE (2ème dimension)

La solution d'acrylamide (Acryl 7,5% ; Tris HCl pH 8,8 0,375M ; APS (Ammonium persulfate) 0,1% ; Temed 0,016 ; SDS 0,1%) a été préparée dans le but d'obtenir un gel 7,5 % (sépare entre ± 30 et 300 KDa) afin de permettre une séparation optimale de nos protéines

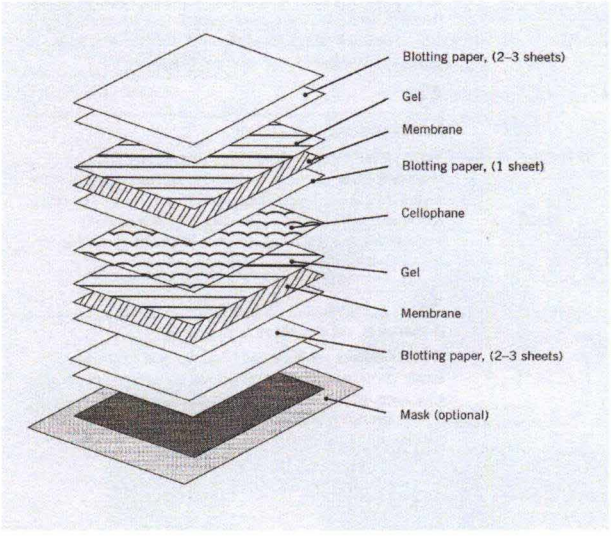


Fig 21 : montage pour le Western-Blot de 2 gels simultanément

d'intérêt, les HSP90. La solution d'acrylamide a été coulée entre 2 plaques en verre préalablement assemblées, jusqu'à 0,5 cm du bord des plaques. Du butanol saturé en eau a été versé sur le dessus de chaque gel afin d'empêcher tout contact avec l'oxygène et permettre la polymérisation. Cette dernière s'est produite après 20 à 50 minutes. Le gel 1D a été placé dans le tampon d'équilibration (Tris 50mM pH8,8 ; Urée 6M ; glycérol 30% ; SDS 2% + une trace de bleu de bromophénol) deux fois 15 min. Durant les 15 premières minutes, le gel a été placé dans 5 ml de tampon auquel a été ajouté du DTT 1%. Les 15 minutes suivantes, le gel a été placé dans 5ml de tampon comprenant de l'iodoacétamide 2,5%. Ensuite, le gel 1D fut rincé dans du tampon d'électrophorèse (25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS + eau) et superposé au gel d'acrylamide. Une solution d'agarose (250ml tampon d'électrophorèse ; 0,5% d'agarose ; 0,002% bleu de Bromophénol) a été ajoutée afin de recouvrir le « strip ». Les plaques comprenant les gels ont ensuite été placées dans la cuve à électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse. La migration s'est effectuée durant environ 5 h à 45 mA/gel.

7.6 Le Western-Blot

Une fois l'électrophorèse terminée, le gel fut démoulé et équilibré dans du tampon de transfert Towbin (Tris 25mM ; Glycine 192mM ; SDS 0,1% ; méthanol 20% et H_2O). Après avoir été trempée dans l'eau, la membrane de nitrocellulose (0,45µm) fut équilibrée dans du tampon de transfert, ainsi que les papiers blot. Ensuite, le tout a été disposé comme indiqué sur la *figure 21.*

La migration s'est déroulée pendant une durée d'1h30 sous un ampérage de 0,8 mA/cm^2, soit 180 mA dans notre cas.

Une fois la migration terminée, nous avons pu opérer à la révélation des protéines d'intérêt sur les membranes de nitrocellulose.

7.7 Révélation des HSP90

Après le Western-Blot, les membranes furent trempées dans du tampon de blocage (solution de TBST avec 5% de lait en poudre) durant une nuit à 4°C. Ensuite, pratiquement tout le déroulement fut le même que celui utilisé pour la révélation en chémiluminescence (ECL) après le Slot Blot (décrit au point 5.2.1), si ce n'est que ce sont les HSP90 qui ont été étudiées en 2 dimensions et que dès lors, ce sont des anticorps anti-HSP90 qui ont été utilisés (voir 5.2.3). Les membranes ont été scannées grâce au programme Labscan5 (Amersham).

7.8 Coloration des gels

7.8.1 Coloration au bleu

Une fois l'électrophorèse terminée, pour nous permettre de déterminer si le Western-Blot avait été efficace, nous avons procédé à la coloration au bleu des gels. Ces derniers ont été trempés dans une solution d'acide acétique 3% durant une nuit. Pour la coloration, les gels ont été placés durant une heure dans un mélange de solvants eau bidistillée/ méthanol/ acide acétique

(55/35/10) auquel a été ajouté le colorant (bleu de Coomassie R250) à raison de 0,05%. Le méthanol a chassé peu à peu le SDS des protéines qui deviennent alors plus avides de colorant. La décoloration s'est opérée avec les mêmes solvants. Plusieurs bains de rinçage dans un faible volume pendant quelques minutes, ont permis d'éliminer l'excès de colorant. Un bain d'une nuit dans un grand volume (environ 400 ml) a décoloré efficacement le gel, permettant l'apparition sur le gel transparent, de toutes les protéines non transférées sur les membranes après le Western-Blot.

7.8.2 Coloration à l'argent

Cette coloration fut réalisée dans le but de pouvoir situer notre protéine d'intérêt par rapport au reste des protéines présentes dans les muscles de *P.monodon*.
Après avoir été démoulés, les gels ont été placés dans une solution de fixation (40% éthanol, 10% acide acétique, 50% eau) sous la hotte durant 30 minutes. La solution de fixation a été éliminée et remplacée par une solution d'incubation (33,3% éthanol; 0,531M $CH_3COONa.3H_2O$; 8,46 mM $Na_2S_2O_3.5H_2O$; 0,13% glutaraldéhyde (50%); 66,6% eau). Les gels ont été placés dans cette solution toute la nuit. Après avoir été rincés 3 fois 10 minutes avec de l'eau distillée, les gels ont incubé dans une solution d'argent (5,88 mM nitrate d'argent; 0,012% formaldéhyde (37%); 99,9% eau) pendant 30 minutes, à l'abri de la lumière. Les gels ont à nouveau été rincés 2 fois 10 minutes à l'aide de l'eau ultra pure (milliQ). Ensuite, ils ont été placés dans la solution de « developing » (0,235M Na_2CO_3; 0,007% formaldéhyde (37%); 99,9% eau) environ 8 minutes, jusqu'à ce que les spots soient bien visibles. La révélation des spots fut arrêtée par l'incubation dans une solution « stop » (39,2mM EDTA; 100% eau). Enfin, les gels ont été rincés 3 fois 5 minutes dans de l'eau et scannés à l'aide du logiciel Labscan5 (Amersham).

III. Résultats

Avant d'appliquer les concentrations maximales (1µg/l d'endosulfan et 0,1µg/l de deltaméthrine) de pesticides aux crevettes des bassins tests, nous les avons testées sur un échantillon de crevettes. N'ayant constaté aucune mortalité, nous avons pu contaminer les bassins tests. Durant les phases de contamination à l'endosulfan ou à la deltaméthrine, aucune mort n'a été répertoriée. Il faut toutefois noter que quelques crevettes ont mué durant les expériences. Jusqu'à la fin des manipulations, les crevettes semblaient être en forme, avec une vitesse de nage soutenue et des sauts importants lors de leur capture.

1. Mises au point du dosage des HSPs par la méthode ELISA

Pour rappel, le but de ce travail était de mettre au point une technique relativement simple pour doser les HSPs (Heat Shock Protein) dans différents tissus des crevettes géantes tigrées afin de mettre en évidence un éventuel stress cellulaire induit par 2 pesticides (l'endosulfan et la deltaméthrine) régulièrement utilisés par les fermiers au Vietnam. Le principal objectif était, bien entendu, d'être capable de réaliser ces dosages au Vietnam, avec les infrastructures et le matériel disponible. L'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) a été sélectionné parmi d'autres techniques pour certaines de ses caractéristiques telles que :

- le nombre important d'échantillons pouvant être analysés en une fois ;
- le peu de matériel et d'infrastructures nécessaires à sa réalisation (plaques multi-puits, multi-pipette, lecteur de plaques multi-puits);
- la facilité des manipulations ;
- le peu de temps nécessaire pour un dosage.

Néanmoins, l'ELISA ne présente pas toutes les vertus et celui-ci revête quelques inconvénients dont le principal consiste en l'utilisation d'anticorps, ces derniers étant chers et très facilement altérés si ils ne sont pas gardés au frais (anticorps secondaires=AII) voire congelés à -20°C (anticorps primaires =AI).

Avant notre départ pour le Vietnam, un premier ELISA a été réalisé (point 5.1 du matériel et méthodes) sur des échantillons tests. Ce dernier avait fonctionné mais nécessitait encore beaucoup de mises au point avant d'arriver à un dosage optimal.

A cause des difficultés d'approvisionnement rencontrées au Vietnam, nous avons transporté les anticorps de Belgique jusqu'au Vietnam, soit dans de la carbo-glace, pour les AI, soit à 4°C, pour les AII. Hélas, nous avons constaté qu'à la fin du voyage, les AII avaient été soumis à des températures supérieures à 4°C.

Le premier ELISA entrepris au Vietnam n'a donné aucun résultat, aucune coloration ne fut observée. Cela nous a alors poussés à passer en revue tous les paramètres qui auraient pu varier par rapport au test réalisé en Belgique et à analyser la technique, paramètre par paramètre, afin d'obtenir une réponse positive.

1.1 La solution révélatrice

Nous avons d'abord pensé qu'il était possible que l'H_2O_2, n'ayant pas été gardé constamment à 4°C, ait été dégradé, perturbant ainsi la révélation avec la solution d'ABTS. Nous avons dès

lors comparé les résultats obtenus avec cette dernière et avec un autre révélateur, le peroxide/TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine). Deux puits, contenant 200 ng d'Hsp70 purifiées diluées dans du tampon d'homogénéisation et du tampon de *coating* (= **tampon carbonate 100mM pH9,6**) ont été coatés toute une nuit à 37°C. La dilution des AI et AII utilisés était de **1 :1000** et ils ont **tous deux incubé 1h à température ambiante**. Après révélation avec les différents produits, la densité optique (D.O.) obtenue avec l'ABTS était de 0,098 tandis qu'elle était de 0,491 avec le p/TMB.
Par après, alors que nous avons réalisé un ELISA dans les mêmes conditions, mais sur une plus grande variété d'échantillons (HSP70 purifiées à différentes concentrations, des homogénats de muscles, de branchies, d'hépatopancréas et de l'hémolymphe), la révélation au p/TMB n'a pas fonctionné.

1.2 Les anticorps secondaires

Un autre paramètre qui aurait pu expliquer le manque de résultats, était la détérioration des AII durant le voyage, étant donné qu'ils n'ont pas été gardés à 4°C tout au long de ce dernier. Pour ces anticorps, deux éléments devaient être vérifiés : est-ce que leur site de reconnaissance aux AI était encore fonctionnel ? Est-ce que l'HRP qui leur était conjuguée était toujours active ? Pour répondre à cette dernière question, nous avons procédé comme illustré à la *figure 22*. Dans 2 puits, nous avons procédé à la dernière étape de l'ELISA afin de voir si l'HRP oxydait bien l'ABTS en un radical cation. Vu les résultats de D.O. obtenus, nous avons pu conclure que les **HRP** étaient **toujours fonctionnelles** ainsi que l'**H_2O_2 et l'ABTS**.

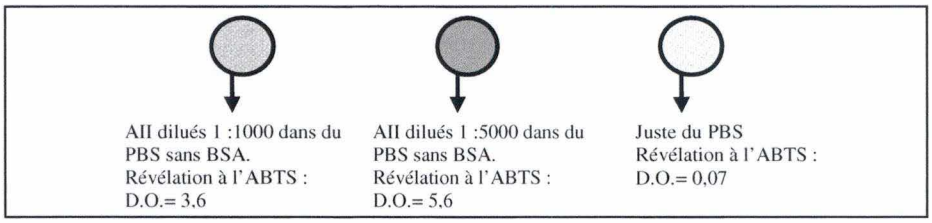


Fig 22 : Trois puits avec leur contenu et les valeurs de D.O. obtenues

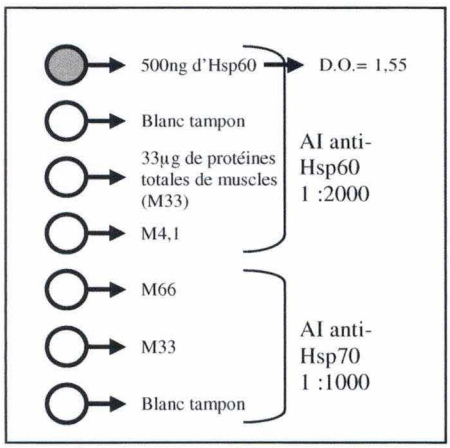


Fig 23 : Contenu des puits afin de tester les anticorps II.

Afin de répondre à la première question, nous avons réalisé un ELISA avec des Hsp60 purifiées jusqu'alors non testées. Nous avons émis l'hypothèse que si un signal était observé, les AII étaient toujours capables de « reconnaître » les AI et ils étaient dès lors fonctionnels. Par contre, si aucune coloration ne se produisait, le problème se situait soit au niveau de l'AII, soit au niveau de l'étape de *coating*. Après avoir procédé à tout le protocole avec les échantillons indiqués sur la *figure 23*, seul un puits nous a donné une densité optique élevée, signifiant dès lors que les **anticorps II fonctionnaient** mais que nous avions plutôt affaire à un **problème de sensibilité**.

1.3 Type de plaque ELISA

Pensant que ce problème de sensibilité était peut-être dû au type de plaque ELISA employée, nous en avons testé 2 différentes. Jusque là, nous avions uniquement utilisé des plaques NUNC maxi Sorp et nous avons dès lors décidé de lancer un ELISA sur une plaque FALCON. Les échantillons placés dans les puits des 2 plaques ont suivi exactement le même traitement (200 et 100ng d'HSP70, tampon de coating carbonate pH9,6, coating pendant 2h à 37°C, AI dilué 1 :5000, AII dilué 1 :1000, révélation à l'ABTS), mais aucune coloration n'est apparue sur aucune des 2 plaques. Nous avons dès lors décidé de réaliser nos expériences ultérieures sur les plaques NUNC maxi Sorp.

1.4 Tampon d'homogénéisation

Le tampon d'homogénéisation utilisé jusqu'ici contenait du détergeant NP-40 (nonidet) 1%. Sachant qu'il était possible que ce détergent interfère avec nos protéines, nous avons tenté un ELISA en utilisant des échantillons homogénéisés dans du tampon phosphate 50mM pH 7,5, ne contenant pas de détergent. Mais une fois encore, aucun résultat n'a pu être obtenu après cet essai.

1.5 Tampon de *coating* et temps d'incubation

Nous avons décidé de tester des tampons de *coating* présentant un pH se rapprochant du point isoélectrique (P.I.) de la protéine d'intérêt. Sachant que le P.I. des HSPs se situe entre un pH de 4,2 et 5,3, nous avons testé les tampons de *coating* suivant:

a. tampon carbonate 100mM pH 9,6
b. Tris HCl 100mM pH 8,6
c. PBS 10mM pH 7,4
d. PBS 10mM pH 5,7

Chaque tampon a été essayé sur un puits contenant 66µg de protéines totales d'homogénat de muscles (M66) et sur un puits « blanc tampon ». Les AI anti-Hsp70 ont été dilués 2000x et les AII 1000x. Les résultats obtenus sont illustrés à la *figure 24*.

M66	Tampon a pH 9,6	D.O.=0,072
Blanc		0,069
M66	Tampon b pH 8,6	0,076
Blanc		0,069
M66	Tampon c pH 7,4	0,109
Blanc		0,074
M66	Tampon d pH 5,7	0,110
Blanc		0,068

Fig 24: D .O. mesurées après réalisation d'un ELISA sur 66µg de protéines totales de muscles (M66) avec différents tampons de coating.

Bien que les valeurs de D.O. ne soient pas très élevées, nous pouvons néanmoins remarquer une différence en fonction du pH des tampons de *coating*. Les résultats les plus convaincants étant ceux obtenus avec le tampon PBS 10mM pH 5,7.

Nous avons alors décidé de continuer dans cette voie et d'essayer des pH supplémentaires afin de trouver celui qui nous donnera la réponse optimale. De plus, nous avons modifié quelques temps d'incubation : nos **échantillons** ont incubé **une nuit + une matinée** à 37°C ; les **AI anti-Hsp70** (dilution 1 :2000) ont été laissés durant **une nuit à 4°C** dans les puits. Les valeurs de D.O. obtenues sont détaillées à la *figure 25*.

Echantillons	M66	Blanc	M66	Blanc	M66	Blanc	M66	Blanc
Tampons	PBS pH 5,0		PBS pH 5,3		PBS pH 5,7		PBS pH 6,5	
D.O. après 28h	0,325	0,112	0,395	0,129	0,416	0,127	0,336	0,106

Fig 25 : Valeurs de D.O. obtenues après 28h de révélation avec de l'ABTS (M66= 66µg de protéines totales d'homogénats de muscles).

Au vu des résultats obtenus, nous avons continué la suite de nos mises au point avec le tampon de *coating* PBS pH 5,7 et avec un temps d'incubation de 18h (à 37°C) pour nos échantillons et d'une nuit (à 4°C) pour les AI.

1.6 Tampon d'anticorps secondaires

Nous avons ensuite testé une autre alternative: l'ajout de Tween20 à raison de 0,05% au tampon d'anticorps II. Seul ce paramètre a été modifié par rapport aux conditions optimales déterminées jusqu'alors. Les résultats obtenus furent positifs, mais néanmoins inférieurs à ceux obtenus lors de l'expérience précédente, sans le Tween20. Par exemple, la D.O. pour 66µg de protéines de muscles, après 7h30 de réaction, avec du Tween20, était de 0,252 par rapport à une D.O. de 0,416 sans le Tween. Nous avons dès lors abandonné cette idée pour la suite des analyses.

1.7 Dilutions des anticorps primaires

Nous avons testé 2 dilutions différentes d'anticorps primaires (1/2000 et 1/5000) dans le but de savoir si la dilution influençait la qualité des résultats. La dilution de l'AII (1/1000) est restée quant à elle constante. Ces 2 dilutions ont été testées sur plusieurs quantités de protéines totales d'homogénats de muscles (66µg, 45µg, 33µg, 16,5µg et blanc tampon). Les résultats de D.O. (*Figure 26*) ont montré qu'une plus faible dilution apportait un peu plus de sensibilité aux dosages. Cependant, avec la dilution 5000X, à part pour la D.O.des M66 qui diminuait, les valeurs décroissaient logiquement alors qu'avec les AI dilués 2000X, aucune logique n'a été notée.

	M66	M45	M33	M16,5	Blanc
Dilution AI 1:5000	0,378	0,424	0,367	0,247	0,202
Dilution AI 1:2000	0,425	0,446	0,447	0,23	0,189

Fig 26 : Valeurs de D.O. obtenues après 7h de réaction avec l'ABTS.
Comparaison de 2 dilutions d'anticorps primaires.

1.8 Reproductibilité

Dans le but de savoir si le dosage était reproductible au sein de la même expérience, nous avons réalisé un ELISA avec 10 X le même échantillon (33µg de protéines d'homogénat de muscles) et 3 « blancs tampon ». La dilution de l'AI était de 5000 X. Nous avons pu remarquer que la reproductibilité était assez bonne au sein de la même expérience (*Figure 27*), mais que par contre, entre expériences avec exactement les mêmes paramètres, elle ne l'était pas (comparaison entre les valeurs obtenues à la figure 26 pour M33 et celles de la figure 27).

Blanc	Blanc	Blanc	M33	M33	M33	M33	M33	M33	M33	M33	M33	M33
0,121	0,110	0,110	0,178	0,197	0,201	0,196	0,186	0,200	0,195	0,198	0,189	0,176

Fig 27 : D.O. obtenues après 7h30 de réaction avec l'ABTS. Test de reproductibilité.

1.9 Différentes HSPs

Nous avons finalement entrepris 3 ELISA pour mettre en évidence les 3 HSPs étudiées dans divers échantillons. Pour chacune des HSPs, nous avons réalisé une courbe d'étalonnage, mais aucune d'entre elles n'a arboré de coloration lors de la révélation (*Figure 28*).

Blanc	250ng	200ng	150ng	100ng	50ng
0,144	0,148	0,161	0,155	0,162	0,172

Fig28: Valeurs de D.O. obtenues lors de la réalisation d'une droite d'étalonnage avec des HSP60 purifiées. (AI dilué 2000X, AII 1000X)

Les résultats obtenus pour les différents échantillons étaient dépourvus de toute logique et les relations entre la quantité de protéines déposées dans le puits et la D.O. mesurée n'étaient pas linéaires (*Figure 29*).

B100	B66	B33	B16,5
0,233	0,265	0,213	0,187

Fig 29: Valeurs de D.O. obtenues avec des échantillons de branchies à différentes concentrations (100µg, 66µg, 33µg et 16,5µg de protéines totales) (AI dilué 2000X, AII 1000X)

Après tous ces essais et ce manque de fiabilité (reproductibilité très faible entre dosages, même si elle était assez élevée à l'intérieur d'un même dosage, droites d'étalons qui ne fonctionnaient pas, non linéarité des résultats de concentrations croissantes en protéines...), nous avons préféré, vu le temps qui nous était imparti pour ce travail, opter pour une technique mise au point antérieurement et obtenir des résultats plus fiables. C'est pourquoi nous avons continué la suite de ce travail en utilisant la méthode Slot Blot, antérieurement utilisée pour les dosages d'HSPs.

2. Dosage des HSPs par la méthode Slot Blot

Après notre retour en Belgique, nous avons décidé, vu le manque de temps, d'entreprendre les dosages d'HSP 70, 60 et 90 sur 2 organes parmi les 4 prélevés (les muscles et les branchies) et sur 3 conditions parmi les 4 expérimentées (les conditions contrôles et les 2 concentrations les plus élevées). Chaque dosage a été réalisé en duplicat. Pour chaque graphe représenté ci-dessous, nous avons déterminé statistiquement un éventuel effet du temps, du traitement et de l'interaction de ces 2 derniers paramètres, sur la production d'HSPs. Les lettres situées au-dessus des histogrammes sont utilisées pour représenter les effets significatifs de l'interaction entre le temps et le traitement et non pour représenter les effets des paramètres pris séparément.

2.1 Induction des HSP70

Lorsque nous avons analysé les muscles de crevettes contaminées à l'endosulfan, nous avons observé une diminution de la quantité d'HSP70 après 7 jours de décontamination (*Figure 30*). La réduction la plus importante se situe au niveau des crevettes contrôles. En effet, avant toute contamination (au jour 0), la concentration en HSP70 dans les muscles des crevettes contrôles était de 1,55 ± 0,16ng d'équivalent HSP70 par µg de protéines totales alors qu'après 7 jours de décontamination, nous en avons mesuré seulement 0,660 ± 0,049ng. Par contre, au jour 0 des crevettes destinées à être contaminées avec 1µg/l, nous avons obtenu une concentration en HSPs de 1,45 ± 0,07ng et seule une faible diminution a pu être mise en évidence au jour 4+7 (1,10 ± 0,20ng). L'ANOVA 2 nous a indiqué que nous avions un effet du temps hautement significatif (P=0,0019 pour l'interaction) en fonction des conditions de contamination. L'effet du temps seul sur la production d'HSPs pouvait être considéré comme très hautement significatif (P=0,53.10^{-10}) et l'effet des différentes concentrations comme significatif (P=0,012).

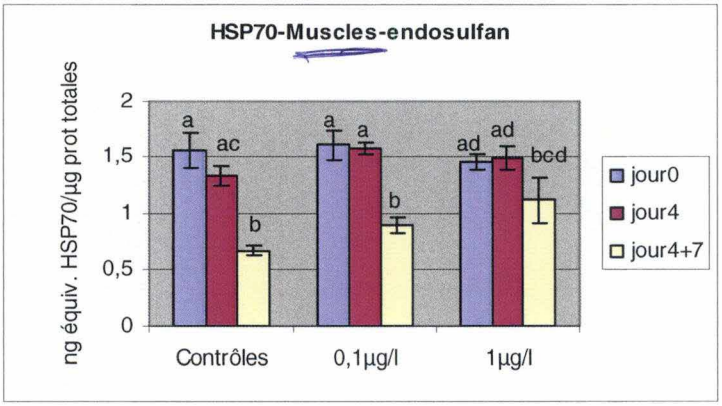


Fig 30: Concentrations en HSP70 (exprimées en ng d'équivalent HSP70 par µg de protéines totales) mesurées dans les muscles de crevettes contaminées à l'endosulfan. Deux lettres différentes signifient qu'il y a une différence au moins significative entre les valeurs. Toutes les lettres peuvent être comparées entre elles. Moyenne ±écart-type.

Les concentrations en HSP70 mesurées dans les branchies des individus contaminés à l'endosulfan ont, d'une manière générale, augmenté avec le temps (ex : chez les individus soumis à 1µg/l, au jour 0, nous avons mesuré 0,28 ± 0,08ng d'HSP70 tandis qu'au jour 4+7, nous avions 1,50 ± 0,34ng) (*Figure 31*). L'effet temps seul est d'ailleurs très hautement significatif avec un $P = 0,0002$. Nous n'avons pas pu observer de différences significatives en fonction des concentrations en endosulfan ($P= 0,48$). De plus, l'effet du temps était relativement identique pour les différents schémas de contamination ($P= 0,629$ pour l'interaction).

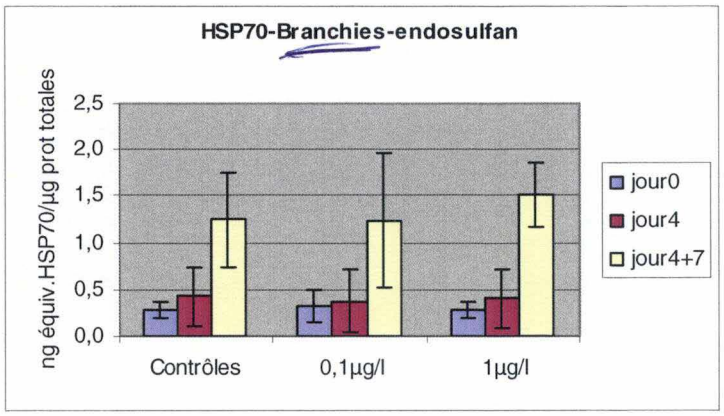


Fig 31: Concentrations en HSP70 mesurées dans les branchies de crevettes soumises à différentes concentrations d'endosulfan.

Dans le cas des contaminations à la deltaméthrine, les concentrations en HSP70 présentes dans les muscles même pour les contrôles, diminuent au jour 4+7 par rapport aux deux premiers prélèvements (*Figure 32*). Comme nous l'avons déjà observé précédemment, au jour 4+7, la diminution est plus prononcée pour les contrôles (62% en moins) que pour les individus exposés à 0,1µg/l de deltaméthrine (32,5% en moins). En effet, au jour 0, dans les muscles des contrôles, la concentration en HSPs était de 1,07 ± 0,09ng/µg de protéines totales pour ensuite diminuer au jour 4+7 jusqu'à une concentration de 0,41 ± 0,04ng. Pour celles exposées à la plus forte dose de deltaméthrine, la concentration en HSP70 dans les muscles était de 1,31 ± 0,17ng à l'origine et a décru jusqu'à 0,88 ± 0,06ng. Nous avons donc un effet du temps seul très hautement significatif ($P= 0,12.10^{-6}$), mais cet effet n'est pas significativement différent ($P=0,39$ pour l'interaction) entre les différentes concentrations. Nous avons pu observer un effet « traitement » hautement significatif sur les concentrations en HSPs ($P= 0,0025$). Cela signifiant, que d'une manière générale, indépendamment du temps, les concentrations en HSPs dans les bassins traités avec 0.1µg/l de deltaméthrine sont supérieures à celles des bassins contrôles.

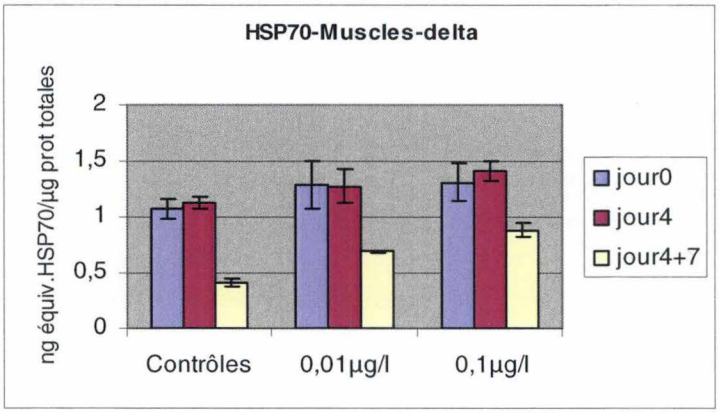


Fig 32: Concentrations en HSP70 mesurées dans les muscles de crevettes soumises à différentes concentrations en deltaméthrine.

Contrairement à ce qui s'est passé dans les muscles, la production d'HSP70 dans les branchies a augmenté au cours de l'expérience (effet temps seul très heutement significatif, « *P* »= $0{,}81.10^{-9}$). Nous avons noté que l'effet du temps, en interaction avec le traitement, était significativement différent (*P*= 0,0306) bien que nous n'ayons pas observé d'effet Scheffé. Nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet du traitement seul (*P*=0,162).

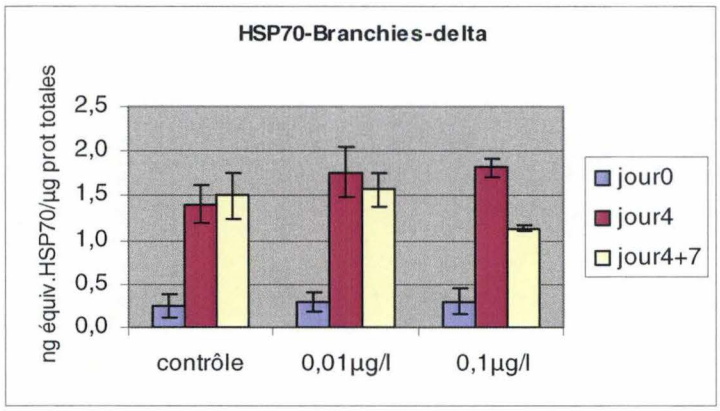


Fig 33: Concentrations en HSP70 mesurées dans les branchies de crevettes contaminées avec différentes concentrations de deltaméthrine.

2.2 Induction des Hsp60

D'une manière générale, il est intéressant de constater que la production d'HSP60 est nettement inférieure à celle d'HSP70. La concentration des secondes se rapproche souvent de 1-1,5 ng d'équivalent HSP70/µg de protéines totales tandis que la concentration en HSP60 tend vers 0,1ng.

Dans les muscles des crevettes soumises aux traitements à l'endosulfan de 0,1 et 1µg/l, nous avons noté une faible diminution de la concentration en HSP60 au jour 4+7 par rapport au jour 4 (*Figure 34*). L'effet du temps est le même pour les 3 conditions (*P*= 0,228 pour l'interaction)

et nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet significatif des différentes concentrations sur la production d'HSP60 (P= 0,537). Un effet temps hautement significatif (P= 0,0016) a néanmoins été détecté suite à notre analyse statistique.

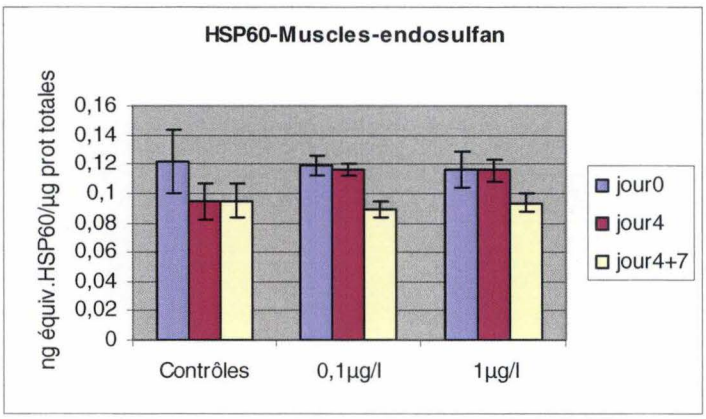


Fig 34: Concentrations en HSP60 dans les muscles de crevettes soumises à différentes concentrations d'endosulfan.

Pour les 3 concentrations, nous avons observé une forte augmentation des HSP60 entre les jours 0 et 4 (*Figure 35*). Au jour 4+7 les concentrations sont maintenues au même niveau, voire même légèrement augmentées. Ainsi, il existe un effet très hautement significatif du temps seul (P=0,25.10^{-8}), mais cet effet est le même pour les 3 conditions. Nous ne pouvons donc pas dire qu'il y ait un effet du temps différent en fonction des conditions de contamination (P=0,624 pour l'interaction). Dans les branchies, nous n'avons pas pu non plus mettre en évidence un effet significatif du traitement (P=0,09) sur les concentrations en HSP60.

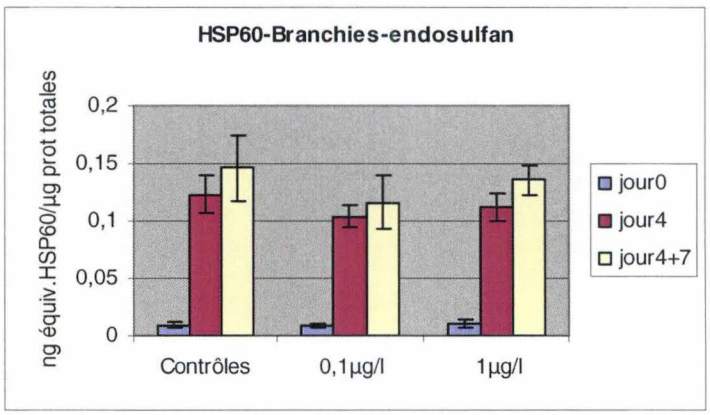


Fig 35: Concentrations en HSP60 dans les branchies de crevettes soumises à différentes concentrations d'endosulfan.

Chez les individus contaminés à la deltaméthrine, seul un effet du temps seul, significatif dans les muscles (P= 0,043) (*Figure 36*) et très hautement significatif dans les branchies (P=0,0003) (*Figure 37*), a été détecté. Une fois de plus, cet effet est le même au sein des 3 conditions (P pour l'interaction = 0,97 dans les muscles et 0,49 dans les branchies). Nous ne pouvons dès

lors pas affirmer qu'il y ait un effet du temps différent en fonction des concentrations. L'effet traitement seul n'a pas eu non plus d'influence sur les concentrations en HSP60, que ce soit dans les muscles (P=0,55) ou dans les branchies (P= 0,62).

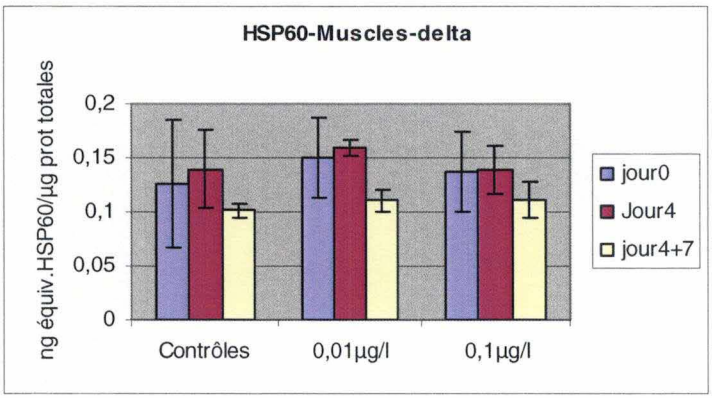


Fig 36: Concentrations en HSP60 dans les muscles de crevettes soumises à différentes concentrations de deltaméthrine.

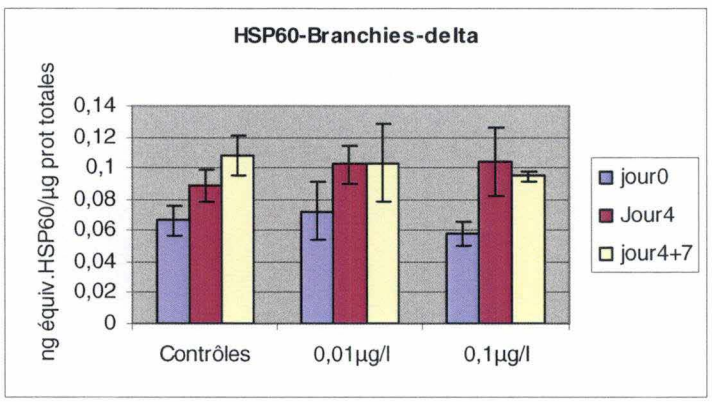


Fig 37 : Concentrations en HSP60 dans les branchies de crevettes soumises à différentes concentrations en deltaméthrine

2.3 Induction des HSP90

Pour ces HSPs, nous n'avons pas pu calculer des ng d'équivalent HSP90 par µg de protéines totales étant donné que nous n'avons pas trouvé d'HSP90 purifiées reconnues par les anticorps anti-HSP90 choisis. Nous avons dès lors travaillé en abondance relative. Après analyse des résultats avec le programme Total Lab, nous avons obtenu des valeurs exprimées en « volume ». Les valeurs exposées ici sont le produit du rapport du volume des échantillons à analyser sur le volume de l'échantillon de référence.

Dans les muscles de crevettes contaminées à l'endosulfan (0,1 et 1 µg/l), nous avons observé une augmentation de la concentration en d'HSP90 au jour 4+7 alors que le niveau est resté le

usqu'au dernier prélèvement (*Figure 38*). Dans les muscles des concentration de 0,1µg/l d'endosulfan, l'abondance relative des ± 0,14 au jour 4 à 2,52 ± 0,51 au jour 4+7, soit 2 fois plus uant aux crevettes soumises à 1 µg/l d'organochloré, l'abondance muscles est passée de 0,85 ± 0,23 au jour 4 à 3,60 ± 0,58 au jour lus importante qu'au jour 4. Nous avons en effet pu mettre en tatistiques, un effet du temps très hautement significativement oncentrations (P=0,00017 pour l'interaction). L'effet temps seul ient significatif (P= $0,1.10^{-5}$) tandis qu'aucun effet « traitement »

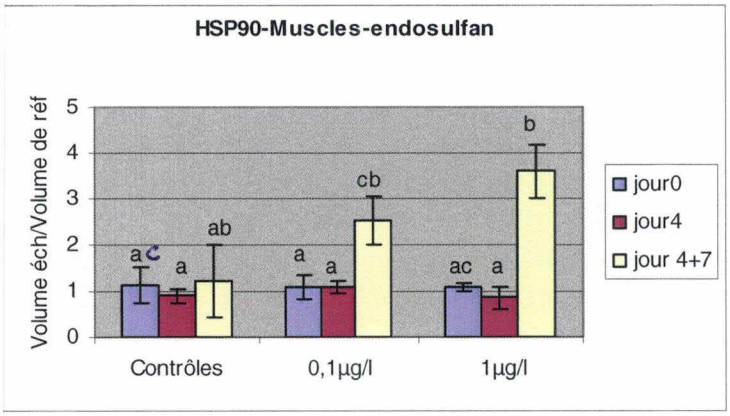


Fig 38: Abondance relative des HSP90 dans les muscles de evettes contaminées avec différentes concentrations d'endosulfan

n effet très hautement significatif du temps sur l'abondance des ce (P= $0,51.10^{-4}$) (*Figure 39*). Mais une fois encore, cet effet temps ntration à l'autre (P= 0,731 pour l'interaction) et aucun effet du tion des HSP90 n'a été enregistré (P=0,724).

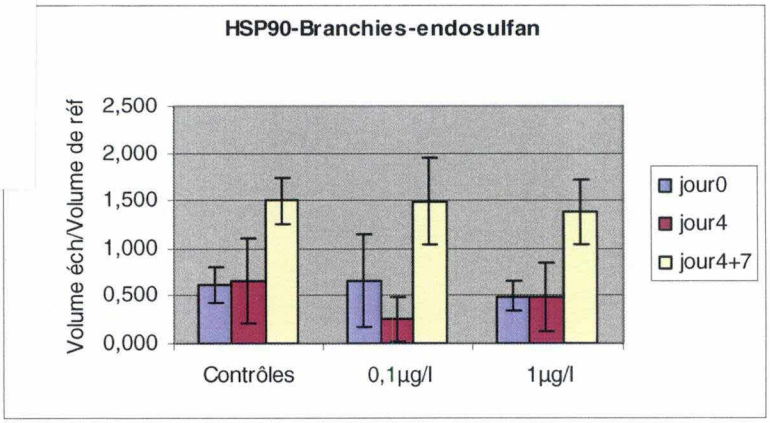


Fig 39: Abondance relative des HSP90 dans les branchies de crevettes exposées à différentes concentrations en endosulfan.

ERRATA (relatif au mémoire d'Anne-Eric Tyberghein)

Page 41 : lire « ac » plutôt que « a » au-dessus de l'histogramme correspondant à la valeur relative d'HSP90 présente dans les muscles des crevettes contrôles (jour 0) des contaminations à l'endosulfan.

Dans les muscles des individus exposés à la deltaméthrine, aucune modification de l'abondance des HSP90 n'a été observée (*Figure 40*), que ce soit en fonction du temps (*P*= 0,258), en fonction des concentrations en pyréthroïde (*P*= 0,307) ou en fonction des 2 paramètres combinés (*P*= 0,278).

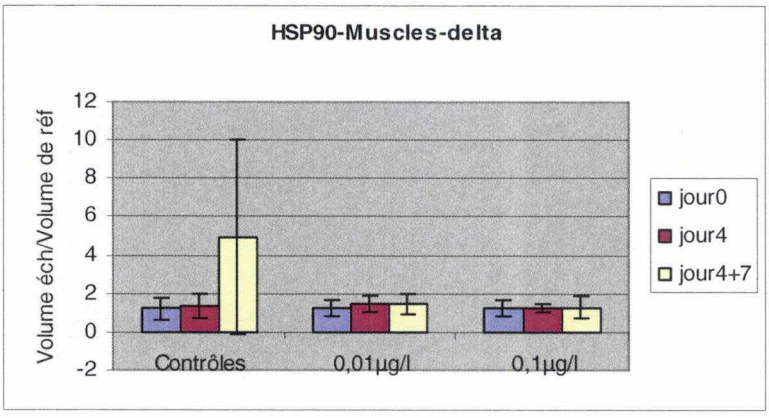


Fig 40: Abondance relative des HSP90 dans les muscles de crevettes exposées à différentes concentrations en deltaméthrine.

Dans les branchies non plus, aucune modification de la production d'HSP90 n'a pu être mise en évidence (*Figure 41*). Il n'y a eu ni d'effet du temps (*P*=0,847), ni d'effet des concentrations (*P*= 0,152) ni d'effet des 2 paramètres combinés (*P*= 0,543) sur la production des HSP90.

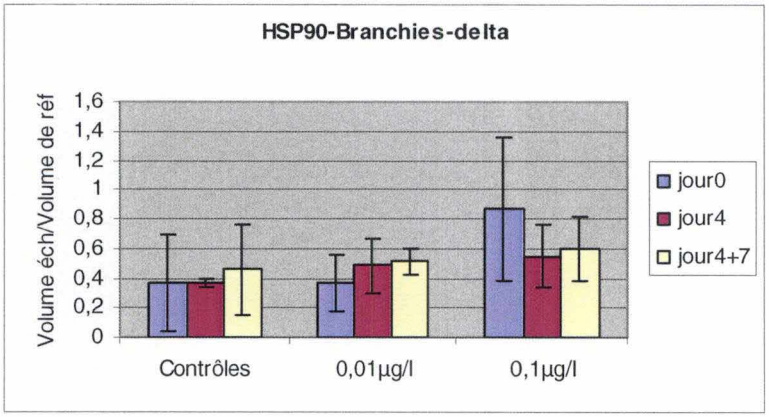


Fig 41: Abondance relative des HSP90 dans les branchies de crevettes exposées à diverses concentrations en deltaméthrine.

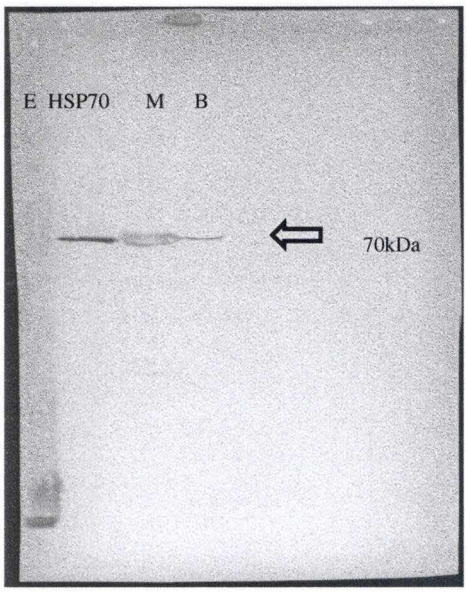


Fig 42: Western-blot nous montrant une seule bande par organe (M=muscles; B=branchies; E=étalon de poids moléculaire), correspondant aux HSP70. La HSP70 humaine purifiée (HSP70) a été utilisée comme contrôle positif.

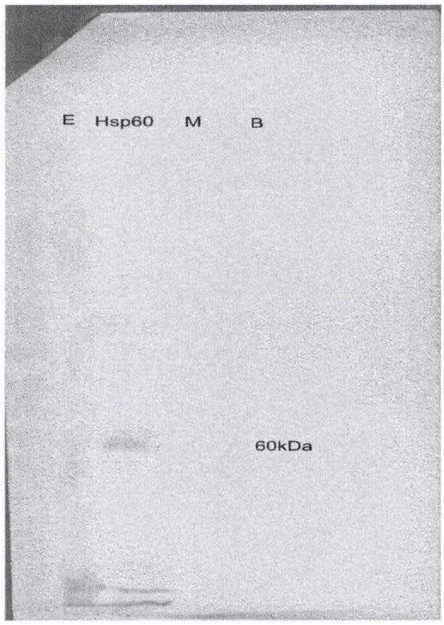


Fig 43: Western-blot nous révélant qu'une seule bande à 60kDa pour les HSP60 purifiées. Aucune bande n'a pu être observée dans les muscles (M) ou les branchies (B)

3. Western Blot

Nous avons réalisé un Western Blot afin de vérifier si les anticorps primaires « reconnaissaient » uniquement les HSPs d'intérêt et qu'aucune réaction croisée n'interférait avec nos résultats.

3.2 HSP70

Après le Western Blot et la révélation en Opti-4CN, nous avons pu observer des bandes se situant à un niveau de migration correspondant à 70kDa (*Figure 42*). Cela a pu être déterminé grâce à l'étalon de poids moléculaire (E) qui arbore diverses couleurs en fonction du poids moléculaire des molécules de référence. Que ce soit pour les HSP70 purifiées (contrôle positif), les muscles (M) ou les branchies (B), seule une bande à pu être mise en évidence. Cela nous permet dès lors d'affirmer qu'il n'y a pas de réaction croisée entre l'anticorps primaire et une quelconque protéine, autre que la HSP70.

3.3 HSP60 et HSP90

Pour les HSP60, seule une bande a pu être révélée (*Figure 43*). Cette dernière correspond aux HSP60 purifiées. Par contre, ni dans les muscles, ni dans les branchies, nous n'avons pu mettre en évidence des HSP60. Nous discuterons de ces résultats dans le chapitre suivant mais il est néanmoins important de se rappeler que la quantité d'HSP60 présente dans les muscles et dans les branchies était plus de 10 fois inférieure à la quantité d'HSP70. Pensant que le manque de résultats pouvait être dû à la sensibilité réduite de la méthode de révélation Opti-4CN, nous avons tenté une révélation en chémiluminescence avec les réactifs du kit d'*ECL advance*. Malgré une sensibilité de 40 à 200 fois supérieure à celle du kit ECL utilisé en *Slot Blot*, aucune marque n'a été enregistrée au niveau des HSP60 dans les muscles ou les branchies.
Pour les HSP90, vu le manque d'HSP90 purifiées adaptées à l'anticorps primaire utilisé, aucun contrôle positif n'a pu être réalisé. Néanmoins, une bande correspondant à des molécules d'un poids moléculaire de 90kDa a été répertoriée dans le mélange de référence (fait d'homogénats de muscles) et dans les muscles (résultat non présenté). Par contre, dans les branchies, aucune bande n'a pu être mise en évidence. Une fois encore, la concentration en HSP90 dans les homogénats de muscles utilisés était 2 fois plus importante que dans les branchies.

4. Analyses protéomiques

Afin de compléter notre étude, nous avons tenté de mettre en évidence une modification de l'expression (ou modifications post-traductionnelles) d'éventuelles isoformes d'HSP90 suite à une exposition à l'endosulfan. Pour ce faire, nous avons réalisé des gels en 2 dimensions (2-DE). Les protéines ont été séparées en fonction de leur point isoélectrique (plan horizontal) et de leur masse (plan vertical). Etant donné que le point isoélectrique des HSP90 est compris

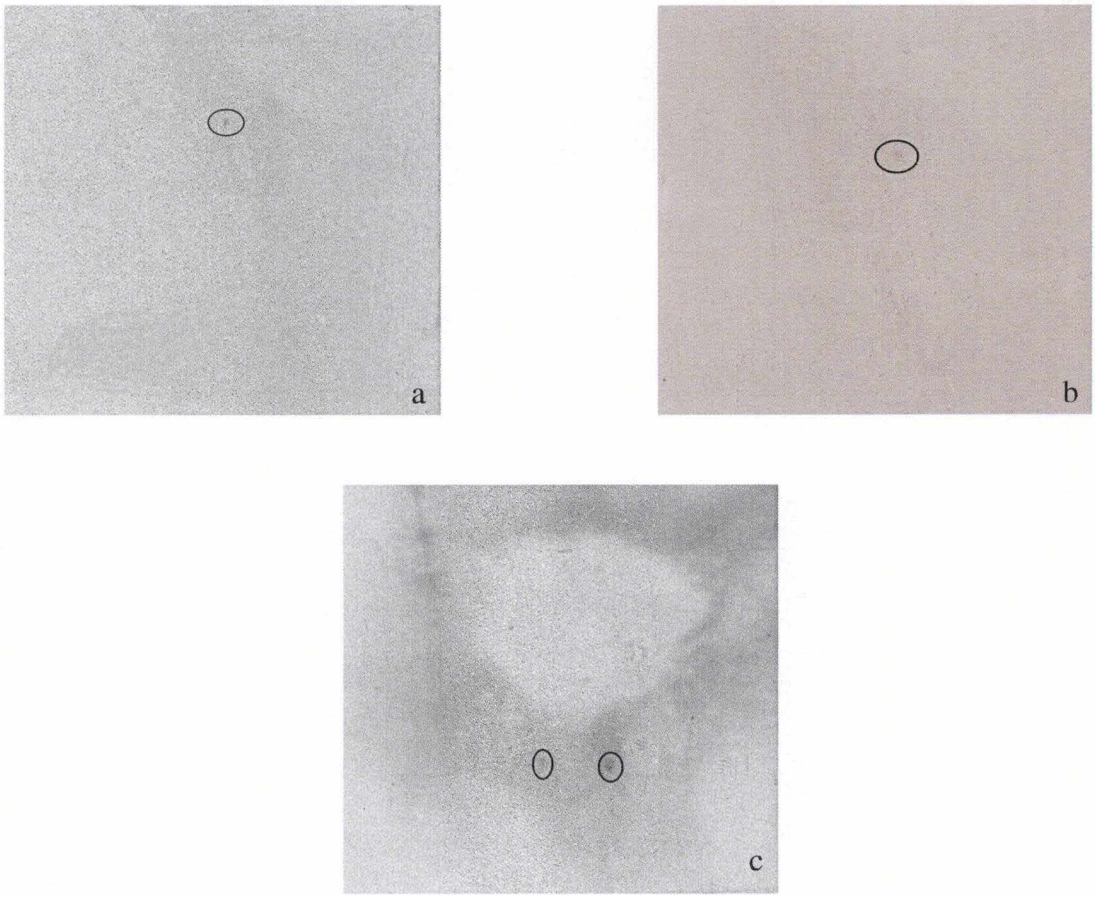


Fig 44: Triplicats de gels-2D réalisés sur des homogénats de muscles de crevettes non contaminées.

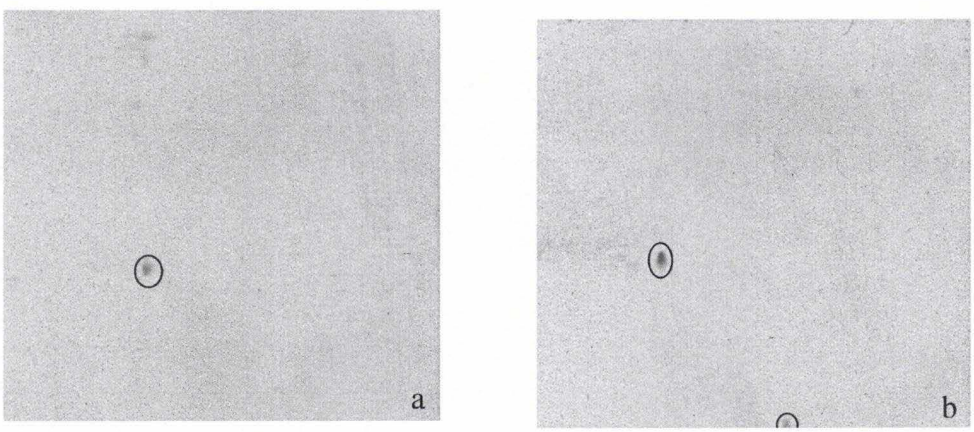


Fig 45: Duplicats de gels-2D réalisés sur des homogénats de muscles prélevés au jour 4+7 sur des crevettes contaminées avec 1µg/l d'endosulfan.

entre un pH de 4,2 et 5,3, nous étions sensés retrouver un spot leur correspondant dans la partie supérieure du quartier inférieur gauche.
Dans les muscles des crevettes non contaminées, nous avons retrouvé des spots, ne correspondant probablement pas aux HSP90. Cela signifierait qu'il y avait, malgré le fait que nous ne l'avions pas vu en Opti-4CN après le *Western*, des réactions croisées entre l'anticorps primaire et des protéines quelconques. Le même spot a été retrouvé dans 2 des triplicats (*Figures 44 a et b*). Dans le 3ème gel de la même condition (*Figure 44 c*), il était moins évident de mettre en évidence des spots étant donné le bruit de fond plus important. Néanmoins, les spots repérés ne semblent ni correspondre aux HSP90, ni aux spots trouvés dans les 2 premiers gels.
Trois gels supplémentaires ont été réalisés avec les homogénats de muscles (prélevés au jour 4+7) des crevettes contaminées avec 1µg/l d'endosulfan. Nous avons basé notre choix sur les résultats obtenus en *slot blot*. En effet, seules les HSP90 présentes dans les muscles des crevettes contaminées à l'endosulfan semblent être sensibles à ce pesticide, et ce, particulièrement avec une contamination de 1µg/l pour laquelle l'induction des HSP90 était maximale. Aucun résultat n'ayant été obtenu pour 1 des 3 gels réalisés, nous avons décidé de travailler avec les 2 gels restants. Pour chacun de ces derniers, nous avons obtenu un spot bien marqué correspondant aux HSP90 (*Figure 45 a et b*). Cela vient confirmer, comme ce fut découvert après l'analyse des échantillons au *Slot blot*, qu'il y a eu une augmentation de la quantité d'HSP90 dans les muscles sous la condition analysée. Par contre, nous ne pouvons pas affirmer la présence d'isoformes d'HSP90 dans les muscles puisque seul un spot se situe au niveau des HSP90.
Afin de resituer notre protéine d'intérêt par rapport au reste du protéome, nous avons réalisé une coloration à l'argent (*Figure 46*). Pour ce faire, nous avons utilisé un homogénat de muscle de crevettes soumises à 1µg/l d'endosulfan et tuées au jour 4+7. Cet homogénat correspondait en fait à celui qui ne nous avait donné aucun résultat parmi les triplicats de la condition contaminée.
Les résultats obtenus furent concluants, si ce n'est que nous pouvons observer pas mal de trainées qui pourraient rendre l'analyse plus ardue. Malgré cela, nous pouvons distinguer un spot à la même position que ceux observés sur les gels-2D des muscles de la condition contaminée.

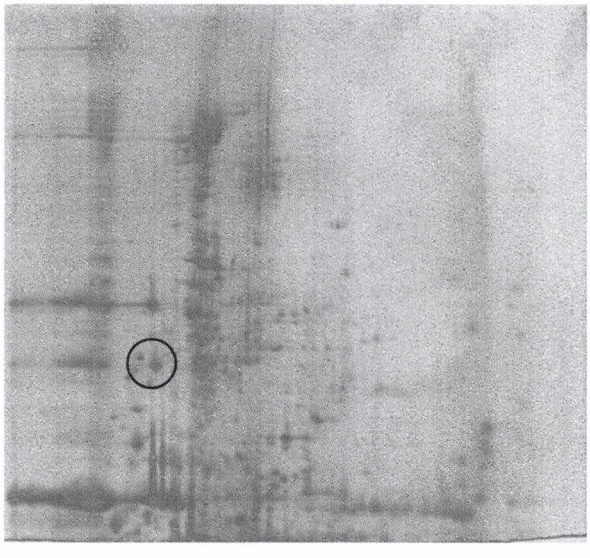


Fig 46: Gel-2D révélé à l'argent, réalisé sur des muscles de crevettes contaminées (1µg/l d'endosulfan, prélevés au jour 4+7).

IV. Discussion et perspectives

La deltaméthrine et l'endosulfan, (bien que ce dernier soit officiellement interdit au Vietnam depuis 1993), sont deux pesticides régulièrement utilisés par les fermiers afin de traiter les cultures et, entre autres, les crevetticultures. Dans les pays en voie de développement tel que le Vietnam, il est très difficile d'obtenir des informations sur les quantités exactes de pesticides utilisés vu le peu de contrôles réalisés à ce niveau par les autorités. Néanmoins, suite à la pression exercée par les pays importateurs de crevettes qui multiplient les contrôles de qualité et forcent les pays exportateurs à modifier leur pratiques culturales, et grâce au fait que certains prennent conscience de la non durabilité de l'utilisation abusive de produits chimiques dans les cultures de plus en plus intensives, petit à petit, une aquaculture plus respectueuse de l'environnement et de ce fait, plus respectueuse des animaux cultivés eux-mêmes se développe. C'est dans cette mouvance que s'inscrit ce travail, qui visait, avant tout, à mettre au point une technique relativement simple (l'ELISA), applicable au Vietnam, pour doser les protéines de stress (HSPs) dans différents organes de la crevette la plus cultivée, *P.monodon,* contaminée en laboratoire avec un organochloré, l'endosulfan et un pyréthroïde, la deltaméthrine.

1. Les contaminations

Nous avons choisi les concentrations avec lesquelles les crevettes ont été contaminées, sur base des CL_{50} concernant des espèces se rapprochant un maximum de l'espèce étudiée, trouvées dans la littérature. Lors de nos contaminations (1; 0,1 et 0,01 µg/l d'endosulfan et 0,1; 0,01 et 0,001 µg/l de deltaméthrine), ayant chacune duré 96h, nous n'avons enregistré aucune mortalité. Il est intéressant de remarquer que la toxicité de l'endosulfan varie fortement d'une espèce à l'autre étant donné que sa CL_{50} de 96h pour la crevette rose (*Penaeus duorarum*) est de 0,04 µg/l, de 3,4µg/l pour *Palaemon macrodactylus* (U.S. EPA, 1980 in Naqvi et Vaishnavi, 1993) et de 0,62µg/l pour *Palaemonetes pugio* (Wirth et *al.*, 2001). Pour la crevette rose, la CL_{50} de 96h de la deltaméthrine est de 0,35 µg/l (L'Hotellier et Vincent, 1986 in WHO, 1990). Bien que nous ne connaissions pas la CL_{50} exacte de l'endosulfan et de la deltaméthrine pour *P. monodon*, nous pouvons affirmer qu'elle est supérieure à 1µg/l pour le premier et supérieure à 0,1µg/l pour la seconde.

Comme nous l'avons déjà souligné plus tôt, il existe une réelle insuffisance des contrôles au niveau de l'utilisation des pesticides au Vietnam. Il est dès lors très difficile d'avoir une idée des concentrations en endosulfan et en deltaméthrine qui peuvent se retrouver dans l'environnement. Néanmoins, grâce à une surveillance environnementale plus poussée dans d'autres pays, nous pouvons avoir une idée du niveau de contamination en endosulfan dans différents compartiments de l'environnement naturel. En Turquie, des résidus d'endosulfan ont été détectés dans la lagune côtière de Dalyan. Lors d'une étude réalisée sur des échantillons d'eau de sol, de surface, de pluie, de neige et de sédiments provenant de 143 sites différents, les niveaux de résidus d'endosulfan détectés étaient compris entre 0,2 et 0,8 µg/l (Ün, 1999 et EPA, 2000 in Capkin et *al.*, 2006). Une autre étude, réalisée sur une rivière située au milieu de champs de coton, a enregistré des concentrations en endosulfan de 0,8µg/l allant jusqu'à

8,6µg/l après le passage d'une tempête (Muschal et Cooper, 1998 in Capkin et *al.*, 2006). En Inde, les concentrations retrouvées dans la rivière Ganga varient entre 0,083 et 66,5µg/l (Selvakumar et *al.*, 2005). Il est donc vraisemblable de retrouver dans l'environnement des concentrations telles que celles testées dans notre étude. En ce qui concerne la deltaméthrine, nous n'avons trouvé aucune étude relative à la quantité de résidus qui pourrait être retrouvée en milieu naturel. Vu le manque de données existantes à ce niveau, nous pensons qu'il serait extrêmement intéressant de doser la quantité d'endosulfan, de deltaméthrine et de résidus retrouvés dans l'eau des crevetticultures. Cela nous donnerait une meilleure idée des concentrations auxquelles les crevettes sont réellement exposées dans les élevages et dans les mangroves.

Durant les 4 jours de contamination, l'eau était changée à intervalle journalier et le pesticide était ajouté afin de maintenir la concentration nominale en pesticide la plus constante possible. Hélas, nous ne connaissons pas encore les concentrations réelles administrées étant donné que ces analyses sont prévues pour une deuxième phase du projet de collaboration scientifique entre le Vietnam et la Belgique (analyses réalisées par le Laboratoire d'Analyse des Denrées Alimentaires (Prof. Maghuin-Rogister) de l'Université de Liège). De plus, cela nous permettra d'avoir une idée de la vitesse de décomposition des 2 pesticides dans l'eau de mer. En effet, les informations trouvées dans la littérature à ce sujet varient fortement, certaines d'entre elles attribuant à la deltaméthrine une demi-vie de 1 à 2 heures (Caquet et *al.*, 1992) alors que pour d'autres, sa demi-vie est de l'ordre de 24 heures. Le dosage de résidus d'endosulfan et de deltaméthrine dans les muscles des crevettes contaminées durant 4 jours et décontaminées pendant 7 jours, est également prévu pour une deuxième phase. Cela nous permettra, en plus de connaître la contamination réelle des crevettes par les pesticides, d'avoir une idée de la cinétique de contamination et de décontamination de la crevette *P.monodon*. Cette cinétique est d'une importance irréfutable car si la concentration en pesticide reste trop élevée dans les muscles des crevettes, leur consommation risque d'être préjudiciable pour la santé humaine. En effet, il a déjà été mis en évidence que la consommation de poissons contaminés par un organochloré affecte le système immunitaire et induit de graves problèmes de santé chez les humains (Bhavan et Geraldine, 2001). De plus, leur exportation se verrait refusée vers un bon nombre de pays, ce qui induirait d'importantes pertes financières pour les fermiers. Si la quantité de résidus reste trop élevée après 7 jours de décontamination, une étude supplémentaire serait intéressante afin de déterminer le temps de décontamination nécessaire pour atteindre un taux de résidus inférieur aux concentrations admises dans les différents pays importateurs de crevettes. Etant donné que la vitesse de détoxification varie en fonction des organes, il serait également intéressant de doser les résidus de pesticides dans les branchies, l'hémolymphe et l'hépatopancréas. Grâce à cela, nous pourrions investiguer une éventuelle relation entre la vitesse de détoxification et la production d'HSP.

2. Le dosage des protéines de stress…

Toutefois, le **dosage des résidus** de pesticides dans les muscles des crevettes est une technique **difficilement réalisable en routine** dans les pays producteurs de crevettes tels que le Vietnam. De plus, même si il y avait détection d'une certaine concentration en résidus dans les muscles, nous ne serions **pas renseignés sur l'état de santé** général des animaux. C'est pourquoi nous avons étudié l'influence de la deltaméthrine et de l'endosulfan sur la production des HSP70, 60 et 90. Les protéines de stress sont des chaperonnes moléculaires. Elles se fixent sur d'autres protéines et leur permettent de garder ou de retrouver une structure tridimensionnelle

compatible avec une activité biologique correcte. A ce titre, elles sont souvent utilisées comme biomarqueur d'un stress qui provoque une dénaturation des protéines, telles que la température ou l'exposition à des polluants (Sanders, 1993; Feder et Hofmann, 1999). A notre connaissance, aucune étude n'a déjà investigué l'influence de la deltaméthrine et de l'endosulfan sur la production d'HSPs chez la crevette tigrée géante *P. monodon*. Néanmoins, des études similaires ont déjà été réalisées sur des animaux différents. Par exemple, Selvakumar et *al.* (2005) ont mis en évidence qu'il n'y avait pas induction d'HSP70 dans les muscles ou dans l'hépatopancréas, mais bien dans les branchies, de la crevette d'eau douce *Macrobrachium malcolmsonii* après son exposition à des concentrations subléthales ($1/5^{ème}$ (0,032µg/l) et $1/10^{ème}$ (0,016µg/l) de la CL_{50} de 96 heures) en endosulfan. Il a également été rapporté qu'après exposition des larves de *Chironomus tentans* (*Diptera chironomidae*) à des concentrations élevées en endosulfan telles que 5 ou 50µg/l, l'expression des gènes HSP70 était accrue (Lee et *al.*, 2006). Nous n'avons trouvé aucune étude de ce type réalisée avec de la deltaméthrine. Néanmoins, lors d'une étude réalisée sur des saumons Chinook juvéniles contaminés avec 0,1µg/l d'esfenvalerate (faisant partie des pyréthroïdes), Eder et *al.* (2004) ont observé une induction des HSP60, 70 et 90 dans les muscles alors que dans les branchies, le niveau d'HSPs est resté constant.

2.1 ...à l'aide de l'ELISA

Comme nous l'avons déjà dit précédemment, notre objectif premier était de mettre au point une technique relativement simple pour doser les HSPs dans les muscles, les branchies, l'hémolymphe et l'hépatopancréas des crevettes *P.monodon*. Nous recherchions une technique qui pouvait être réalisée au Vietnam avec le matériel disponible, qui ne coûtait pas trop cher à l'emploi et qui permettait un dosage fiable et rapide des HSPs. Nous avons dès lors opté pour la technique **ELISA** qui correspondait bien à ces critères. A notre connaissance, avant la réalisation de ce travail, seule une autre étude avait adopté l'ELISA pour doser les HSPs chez des crustacés. Cimino et *al.* (2002) ont en effet mis au point cette technique afin de doser les HSP86 (assimilées aux HSP70) dans les pléiopodes de *Cherax quadricarinatus* et de *P. monodon*. Nous nous sommes donc basés sur leur protocole afin de réaliser nos dosages. Hélas, bien qu'un essai assez concluant ait été réalisé en Belgique avant notre départ, une fois au Vietnam, aucun résultat ne put être obtenu avec le protocole décrit par Cimino et *al.* Nous avons donc entamé une longue démarche de mise au point (point 1 des résultats), durant les 3 mois et demie passés au Vietnam. Finalement, nous avons réussi à obtenir des réponses positives lors des dosages d'HSP70, 60 et 90 dans les organes, mais ces réponses n'étaient pas toujours proportionnelles à la quantité d'homogénat de tissus ajoutée dans les puits. Aucune réponse n'a pu être obtenue lors de la réalisation des droites d'étalonnages avec les HSPs purifiées. De plus, bien que reproductibles au sein de la même expérience, nos résultats manquaient de reproductibilité entre 2 expériences réalisées sur les mêmes échantillons, dans les mêmes conditions mais à des moments différents. Si nous avions disposé de plus de temps à l'université de Can Tho, nous aurions pu continuer à tester d'autres paramètres. Par exemple, nous aurions pu ajouter 1% de SDS à nos homogénats et les faire bouillir avant de les diluer et de les répartir dans les puits. Cette technique a été utilisée par Gutierrez et Guerriero (1991) afin d'obtenir une réponse proportionnelle à la quantité d'homogénats placée dans le puits. En ce qui concerne les HSPs purifiées, bien qu'elles aient été gardées dans de la carboglace, nous soupçonnons une certaine détérioration suite au transport. Enormément d'autres paramètres, liés aux conditions de travail pas toujours optimales, pourraient expliquer le manque de reproductibilité entre chaque expérience. Par exemple, nous pouvons citer: la verrerie lavée à

la main avec du savon de vaisselle puis rincée avec de l'eau distillée d'une provenance inconnue, la qualité parfois douteuse des produits utilisés (produits chinois pas toujours gardés au frais), l'utilisation de *tips* sales,... Néanmoins, il ne faut pas exclure l'existence d'autres paramètres, également présents dans des conditions de travail plus optimales telles que rencontrées dans nos laboratoires européens. Cela expliquerait peut-être le fait que la technique de l'ELISA ait rarement été utilisée pour le dosage des HSPs. N'ayant pas atteint nos objectifs premiers qui étaient de mettre au point l'ELISA durant notre séjour au Vietnam, et d'y réaliser les dosages, nous avons changé de technique de dosage une fois de retour en Belgique.

2.2 ...à l'aide du Slot Blot

La méthode **Slot Blot** a été choisie étant donné qu'elle avait déjà été utilisée auparavant pour doser des HSPs chez des crustacés, qu'elle ne nécessitait pas trop de mises au point et qu'en plus, elle nous permettait de doser un grand nombre d'échantillons par jour. Malgré tous ces avantages, nous n'avons pas appliqué cette technique au Vietnam vu la quantité de matériel (ex: matériel pour développer les membranes,...) et les infrastructures (ex: chambre noire) nécessaires à son bon fonctionnement.
Après notre retour, puisqu'il ne nous restait pas beaucoup de temps avant la clôture de ce travail, nous avons décidé de réduire le nombre de dosages. Nous avons finalement dosé les HSP70, 60 et 90 dans les homogénats de muscles et de branchies des crevettes soumises aux 2 concentrations les plus élevées de chaque pesticide et des crevettes contrôles. Dans les paragraphes suivants, nous allons discuter des résultats obtenus, famille d'HSP par famille d'HSP.

Lors de la présentation des résultats obtenus pour le dosage des **HSP70** (point 2.1), nous avions déjà attiré l'attention sur le fait que dans les muscles, la quantité d'HSP70 diminuait avec le temps, aussi bien chez les crevettes contaminées à l'endosulfan ou à la deltaméthrine que chez les crevettes contrôles, mais la diminution était inversement proportionnelle à la dose de pesticide. Tout se passe comme si les crevettes étaient stressées dès le début des expériences et qu'elles récupéraient au fur et à mesure du temps. Néanmoins, comme il a été prouvé statistiquement, il existe un effet du pesticide. En effet, la diminution est nettement moindre chez les crevettes contaminées avec 1µg/l d'endosulfan ou 0,1 µg/l de deltaméthrine que chez les crevettes contrôles. Cela ne serait pas surprenant, étant donné que la toxicité de l'endosulfan a déjà été mise en évidence dans diverses études. Bhavan et Geraldine (2001) ont déclaré que la toxicité de l'endosulfan résultait en la détérioration d'une série de polypeptides dans les tissus des crevettes d'eau douce *Macrobrachium malcolmsonii*. D'autres auteurs (Selvakumar et *al.*, 2005) ont affirmé que les pesticides interféraient avec le cœur hydrophobe des protéines, menant donc à la dénaturation de ces dernières en exposant leurs parties hydrophobes au milieu aqueux environnant. Vu le rôle de chaperonnes moléculaires que jouent les HSP70, il ne serait que peu étonnant qu'une exposition à ce pesticide induise une production accrue d'HSP70 et dès lors, une diminution moins importante de leur abondance quand les crevettes ont l'air de récupérer d'un stress précédent.
Dans les branchies, que ce soit lors des contaminations à l'endosulfan ou à la deltaméthrine, seul un effet du temps sur la production d'HSP70 a pu être mis en évidence. La concentration en HSP70 augmente tout autant dans les branchies des crevettes contrôles que dans celles des crevettes contaminées, ce qui laisse supposer une production d'HSPs par les crevettes suite à leur maintien en bassins. Lors de la contamination avec l'organochloré, l'augmentation s'est fait remarquer après 7 jours de décontamination tandis que cette augmentation était déjà bien

nette après 4 jours de contamination avec la deltaméthrine. Il est intéressant de savoir qu'Amandine Bernard, étudiante partie au Vietnam en 2005 pour étudier l'impact des antibiotiques sur le stress oxydant chez *P. monodon* dans le cadre de son mémoire, avait également observé un impact des conditions expérimentales sur le stress développé chez les crevettes (Bernard, 2005).
Lors des dosages des HSP70, nous n'avons pas distingué les HSP70 des HSC70 étant donné la reconnaissance des 2 par l'anticorps primaire. Puisque les HSC70 ne sont que très faiblement inductibles par un stress, il serait intéressant de réaliser les dosages avec un anticorps primaire qui aurait pour unique cible les HSP70. Cela nous permettrait de gagner de la sensibilité et d'observer plus nettement les variations des concentrations en HSP70.

Le niveau d'**HSP60** est d'une manière générale, nettement inférieur à celui des HSP70. Dans nos résultats, l'abondance des HSP70 oscille entre 0,5ng et 1,5ng d'équivalent HSP70 par µg de protéines totales tandis que nous avons mesuré entre 0,01ng et 0,15ng d'équivalent HSP60 par µg de protéines totales. Cela signifie que suite au stress (dont on ne connaît pas la nature), la production de ces dernières a été multipliée par 15 alors que la quantité d'HSP70 n'a que triplé. Il avait déjà été remarqué que la synthèse de chaperonines s'accroissait notablement lors d'agressions responsables d'une dénaturation des protéines (Morimoto et *al.*, 1992). Cette forte augmentation provient peut-être du fait que les HSP60 n'assurent pas leurs fonctions sous forme de monomères, mais bien sous forme d'oligomères de 14 sous-unités de 60kDa arrangées en 2 anneaux heptamériques inversés, nécessitant de ce fait une production d'HSP60 très élevée avant d'avoir une hausse au niveau du nombre d'unités fonctionnelles actives.
Dans les muscles des crevettes contaminées à l'endosulfan et à la deltaméthrine, nous avons mesuré une diminution de la quantité d'HSP60 au cours du temps, tout comme pour les HSP70. Cette diminution est remarquée également chez les crevettes contrôles. Contrairement aux HSP70, la diminution est relativement faible (de 0,12ng à 0,09ng d'équivalent HSP60 par µg de protéines totales) et reste la même pour toutes les conditions. Ces diminutions d'HSP60 ou d'HSP70 dans les muscles sont assez étonnantes. Surtout qu'un schéma totalement inverse est observé dans les branchies. Dans cet organe, la quantité d'HSP60 s'accroît avec le temps, aussi bien chez les crevettes contrôles que chez celles contaminées. Cette disparité de production d'HSP70 entre les différents organes avait déjà été remarquée par Selvakumar et Geraldine (2005) lors d'une étude réalisée sur la crevette d'eau douce *Macrobrachium malcolmsonii*. Pour ces auteurs, cette réponse spécifique à chaque tissu reflète le mode d'action de chaque pesticide ainsi que le mode d'exposition à ce dernier. Nous pouvons apparemment affirmer qu'il existe également cette disparité de production d'HSP60 entre les différents organes, ou en tout cas, entre les branchies et les muscles des crevettes *P. monodon*.
La baisse d'HSPs dans les muscles nous laisse penser que les crevettes ont été stressées avant le début des expériences et qu'elles ont récupéré au fur et à mesure des expériences ou bien que les conditions de confinement régulées diminuent la dénaturation des protéines et dès lors la production d'HSPs. D'autres paramètres, tels que l'absence de nourriture durant les expériences, sont peut-être à la base de cette diminution d'HSP dans les muscles. Il a déjà été prouvé que le manque de nutriments inhibait la production d'HSP70 chez les algues *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta). Ceci est dû au fait que la production d'HSP nécessite beaucoup d'énergie et que celle-ci devient indisponible lorsqu'il y a restriction alimentaire. Dans ce cas, les organismes tendent à ralentir leur métabolisme, dont la production de protéines. Si la production de protéines est affectée par le manque de nourriture, la production d'HSP pourrait l'être également (Lewis et *al.*, 2001). Pour une prochaine expérience, il serait intéressant de doser les différents paramètres physico-chimiques de l'eau au cours des expériences. Bien que Bierkens et *al.* aient montré que les variations de pH, de température, de nitrates et de phosphates n'induisaient qu'une augmentation passagère des HSP70 chez l'algue

Raphidocelis subcapitata nous aurions dû mesurer ces paramètres, en plus de la teneur en oxygène, afin d'avoir une idée globale des changements survenus au niveau de la qualité de l'eau. De telles analyses nous aurait probablement aidés dans l'analyse des résultats et nous aurait permis une interprétation plus correcte.

En ce qui concerne les **HSP90**, les résultats obtenus diffèrent de ce que nous avons observé avec les HSP70 et 60. Il est important de rappeler que pour les HSP90, nous n'avons pas su calculer la concentration exacte et que tous nos résultats sont exprimés sous forme de rapport par rapport à un échantillon de référence.
Dans les branchies et les muscles des crevettes exposées à la deltaméthrine, aucune modification de la production d'HSP90 n'a été observée, que ce soit chez les crevettes contrôles ou contaminées. Cela signifie peut-être que les HSP90 sont moins sensibles aux stress « parasites » qui induisaient soit une augmentation soit une diminution des HSP70 et 60 dans les mêmes conditions. Néanmoins, dans les branchies des crevettes soumises à de l'endosulfan (contaminées ou contrôles), les HSP90 augmentent au cours du temps. En effet, après 7 jours de décontamination, la quantité d'HSP90 augmente d'un facteur 3 par rapport au jour 0 et au jour 4. Peut-être cela reflète-t-il, comme nous en avons fait l'hypothèse précédemment, l'impact des conditions de maintien des crevettes sur leur état général de stress.
Dans les muscles des crevettes contaminées à l'endosulfan, nous avons observé un effet très hautement significatif de l'interaction entre le temps et les concentrations (P=0,00017) sur la production d'HSP90. Malgré le fait que l'effet des concentrations seules sur le taux d'HSP90 n'était pas significatif (P= 0,068), nous pouvons voir clairement sur le graphe (2.3 dans partie « Résultats ») qu'après les 7 jours de décontamination, la quantité d'HSP90 présente dans les muscles est directement proportionnelle à la dose de pesticide ajoutée aux bassins durant la période de contamination. Au jour 4+7, les crevettes contrôles gardent une quantité d'HSP90 équivalente à un rapport (volume de l'échantillon/volume de référence) d'environ 1, alors que les muscles des crevettes contaminées avec 0,1µg/l d'endosulfan ont 2,5 fois plus d'HSP90 et que celles contaminées avec 1µg/l en ont 3,5 fois plus. Malgré le fait que la majorité des études sur les protéines de stress affirment que l'induction des HSPs est rapide après un stress, nous en avons trouvé quelques-unes qui pourraient expliquer l'augmentation plus tardive des HSP90 mesurée lors de notre étude. Premièrement, la vitesse d'accumulation des HSPs varie d'une espèce à l'autre et il n'y a donc pas de « vitesse standard ». Par exemple, chez *Sparus aurata*, l'augmentation de la production des HSPs était évidente déjà après une heure d'exposition à un agent stressant tandis que chez la truite (*Onchorynchus mykiss*), le temps nécessaire avant d'observer une accumulation du nombre d'HSPs était nettement plus long (Cara et *al.*, 2005). Il a également été prouvé qu'après exposition à un produit chimique, l'induction des protéines de stress est généralement plus lente, mais qu'elle persiste plus longtemps que lorsque soumis à un stress thermique (Nover, 1991 in Lewis et *al.*, 1999). Une fois de plus, les valeurs des résidus accumulés dans les muscles après 4 jours de contamination et 7 jours de décontamination sont nécessaires afin de nous permettre de faire le parallèle avec les concentrations en HSPs. Nous voulons également attirer l'attention sur le fait que l'endosulfan, bien que dilué dans l'eau, induit une concentration accrue des HSPs au niveau des muscles et non au niveau des branchies. Nous aurions pu nous attendre à un résultat inverse étant donné que ces dernières sont en contact constant avec l'eau contaminée. Pour apporter une explication à cette observation, une étude sur les vitesses d'accumulation et de détoxification dans chacun des 2 organes devrait être menée. Nos résultats nous laissent penser qu'il existe une certaine disparité à ce niveau entre ces 2 organes.
Une des hypothèses pour expliquer l'augmentation de la quantité d'HSP90 dans les muscles des crevettes contaminées à l'endosulfan serait que ce dernier, lipophile de nature, diffuse facilement dans la cellule. Cela causerait l'altération des propriétés physico-chimiques du

cytoplasme, la destruction des membranes des organelles, la perturbation du fonctionnement normal des protéines cellulaires et l'inhibition d'enzymes, perturbant de ce fait différents mécanismes biochimiques et physiologiques. Cela a déjà été prouvé chez *M. malcolmsonii* (Bhavan et Geraldine, 1997) et semble applicable à la crevette tigrée géante. Suite à ce stress, la synthèse des HSP90 s'est accrue afin de modifier le métabolisme cellulaire et de le rendre plus tolérant au stress présent. En effet, ces protéines de stress retrouvées dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique régulent plus de 100 protéines kinases et facteurs de transcription actifs dans la transduction du signal cellulaire. Dans de nombreux cas, il est nécessaire que ces derniers se lient aux HSP90 afin d'assurer un mouvement rapide du signal (Pratt et *al.*, 2004). De plus, l'association des HSP90 aux microfilaments du cytosquelette (tubuline et actine) permet de préserver l'intégrité cellulaire après le stress et permet le transport intracytoplasmique, de protéines en particulier (Pratt, 1992 in David et Grongnet, 2001).
Une seconde hypothèse, mais qui n'exclut en rien la première, serait que l'endosulfan induise un stress oxydant dans les muscles de *P. monodon*. Dorval et *al.* (2003 in Dowling et *al.*, 2006) ont déjà mis en évidence un stress oxydant lors d'études in vivo et in vitro chez la truite arc-en-ciel, après exposition à de l'endosulfan. Suite au stress oxydant, la formation d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) résulte en l'introduction irréversible de groupements aldéhydes ou carbonyles sur les acides aminés constituant les protéines, provoquant l'inactivation des protéines, leur agrégation et leur dégradation (Dowling et *al.*, 2006). Une fois les protéines dégradées, la quantité d'HSPs requise s'accroît, induisant la dissociation des complexes HSP/HSF. Les HSF « libérés » vont former des trimères, qui pourront pénétrer dans le noyau, se lier au HSE et, après phosphorylation, activer la transcription de gènes HSP. Des résultats similaires ont été obtenus par Dowling et *al.* (2006) après étude de l'impact du DDE (principal métabolite du DDT) sur la carbonylation des protéines et sur la réponse au stress chez *Ruditapes decussatus*. Leurs résultats montraient une nette augmentation dans le nombre de protéines carbonylées dans les glandes digestives et le manteau, mais pas dans les branchies. Parallèlement, ils n'ont observé aucune différence au niveau des quantités d'HSP70 et 60 présentes dans les tissus des individus traités au DDE ou des individus contrôles. Par contre, bien que stable chez les contrôles et dans les glandes digestives des individus traités, la production d'HSP90 a augmenté dans le manteau après contamination. Dans les branchies, le niveau d'HSP90 n'a pas été affecté par l'exposition au DDE.

2.3 Vérification des résultats grâce au Western-blot

Tous ces résultats sont néanmoins à prendre avec **certaines précautions**. En effet, à part pour les HSP70, nous n'avons pas pu prouver qu'il n'y avait pas de réaction croisée entre les anticorps primaires anti-HSP60 et anti-HSP90 et des protéines quelconques présentes dans les homogénats. Comme nous l'avons déjà exposé dans les résultats, après le **Western-blot** et la révélation en Opti-4CN, une seule bande a été mise en évidence pour chacun des organes testés (branchies et muscles) et pour les HSP70 purifiées. Cela signifie donc qu'il n'y a pas de réaction croisée et que les résultats obtenus en Slot-Blot révèlent bien l'abondance des HSP70 uniquement et non celle d'une autre protéine. Pour les HSP90, seule une bande a pu être mise en évidence dans les muscles tandis qu'aucun résultat n'a pu être obtenu pour les branchies. En ce qui concerne les HSP60, seules les HSP60 purifiées ont donné une bande après Western-blot et révélation en Opti-4CN et aucun des 2 organes n'a présenté de résultat. Cela n'implique pas forcément qu'il existe des réactions croisées, mais cela nous oblige simplement à être prudents face aux résultats obtenus, n'ayant aucune preuve du fait que les anticorps primaires reconnaissent uniquement nos protéines d'intérêt. Face à ce manque de réponse après

révélation en Opti-4CN, nous avons pensé que la méthode de détection manquait peut-être de sensibilité. C'est pourquoi, nous avons réalisé une révélation en ECL-advance. Cette technique présente une sensibilité de 40 à 200 fois supérieure à une ECL normale. Malgré cela, nulle bande n'a pu être observée pour les HSP60 dans les muscles ou les branchies. Ces résultats nous mènent à croire que le transfert des protéines durant le Western-blot n'était pas optimal. En effet, nous avons observé de bons signaux en Slot-Blot en appliquant 2 à 3µg de protéines totales sur les membranes. En Western-blot par contre, bien que nous ayons placé entre 85 et 100µg de protéines totales dans les puits d'éléctrophorèse, aucun signal n'a été détecté sur la membrane. Lundebye et *al.* (1995) trouvaient que le problème majeur du Western-blot était l'efficacité variable du transfert des protéines du gel vers la membrane, mais depuis lors, beaucoup d'autres études ont employé cette technique pour le dosage des HSPs, sans rencontrer le moindre problème. Par exemple, Cimino et *al.* (2002) ont réussi à doser les HSP86 chez *P.monodon* en déposant dans les puits entre 8 et 12 µg d'homogénats de pléiopodes. Si nous avions disposé de plus de temps pour la réalisation de ce travail, nous aurions pu recommencer l'homogénéisation de certains échantillons dans le but d'obtenir une concentration en protéines supérieure à celle que nous avons obtenue après homogénéisation à l'ultraturax au Vietnam. Cela étant, nous aurions pu déposer plus de protéines totales dans les puits de l'électrophorèse, et donc plus d'HSPs. En effet, l'obtention de bons résultats avec les HSP70 prouve que la technique fonctionne mais que la quantité d'HSP requise dans les puits est assez élevée. Sur base des résultats obtenus en Slot-blot, nous pouvons calculer approximativement la quantité d'HSP60 déposée dans les puits par rapport à celle des HSP70. Dans les homogénats de muscles et de branchies déposés dans les puits, nous avons calculé respectivement 14 et 9,3ng d'HSP60. La quantité d'HSP70 était d'environ 100ng dans les homogénats de muscles et 40ng dans les branchies. Cela démontre clairement qu'une certaine quantité d'HSP doit être déposée dans les puits pour permettre l'obtention d'un signal après Western-blot. Nous n'avons pas pu effectuer ces calculs pour les HSP90 n'ayant que des rapports comme résultats et non des quantités exactes. Nos résultats en Slot-Blot nous indiquent tout de même que la concentration en HSP90 est environ 3 fois supérieure dans les muscles des crevettes contaminées que dans les branchies. Cela se reflète dans les résultats du Western-blot étant donné que nous avons obtenu un signal pour les muscles mais pas pour les branchies.

3. L'analyse protéomique en 2 dimensions

Afin d'aller plus loin dans la compréhension de l'induction des HSP90 par l'endosulfan, nous avons entrepris une étude originale, sans a priori, en réalisant des gels en 2 dimensions. Certaines études relatent l'existence d'isoformes de la HSP90. En contraste avec *Escherichia coli* et *Drosophila* qui ne possèdent qu'un membre de cette famille, un certain nombre de vertébrés, tels que le poisson zèbre, la carpe commune, les poulets, les souris et les humains, possèdent 2 gènes fort similaires, hsp90α et hsp90β. Ces derniers exhibent différents patterns d'expression durant le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire, et également, en réponse à un stress environnemental. HSP90β est la forme la plus constitutive et ne semble être que faiblement inductible tandis que HSP90α, également détectée en conditions normales, est fortement induite sous conditions stressantes. Chez la carpe, les 2 isoformes ont 79% de similitude au niveau des acides aminés (Hermesz et *al.*, 2001). A notre connaissance, jusqu'à ce jour, aucune autre étude ne s'est intéressée aux isoformes d'HSP90 présentes chez la crevette géante tigrée *P. monodon*. Une première approche de gels en 2 dimensions a été réalisée dans l'espoir de découvrir d'éventuelles modifications post-traductionnelles des

HSP90 telles que des phosphorylations ou dans le but de découvrir des isoformes appartenant à la famille des HSP90 dans les muscles et surtout, dans l'espoir de savoir si parmi ces isoformes, certaines enregistrent une modulation de leur expression après exposition des crevettes à 1µg/l d'endosulfan. Deux conditions ont été testées en triplicat: les muscles des crevettes prélevées avant toute contamination (jour 0 = contrôles) dans les bassins destinés à être contaminés avec 1µg/l d'endosulfan et les muscles des crevettes des 3 mêmes bassins, mais après 7 jours de décontamination (jour 4+7). Nous avons choisi de comparer ces 2 conditions vu que les résultats du Slot-blot nous ont révélé un effet de l'interaction entre le temps et la concentration sur la production d'HSP90 au jour 4+7. Pour rappel, lors de la réalisation de gels en 2 dimensions, nos protéines d'intérêt ont été séparées en première dimension, en fonction de leur point isoélectrique (P.I.) et en deuxième dimension, en fonction de leur poids moléculaire (P.M.). En ce qui concerne les gels réalisés avec les muscles contrôles, nous n'avons pas observé de spot correspondant aux HSP90. Bien que nous n'ayons pas observé de réactions croisées lors de la réalisation du Western Blot pour les HSP90, il semblerait qu'elles existent tout de même avec certaines protéines présentes dans les échantillons contrôles. Dans les muscles des crevettes contaminées, un spot correspondant aux HSP90 a pu être nettement identifié alors que les spots observés en condition non contaminée ne sont plus apparents. Cela vient donc confirmer le fait que les HSP90 sont surexprimées au jour 4+7 par rapport au jour 0, ce que nos analyses en Slot-blot avaient déjà laissé apparaître. Néanmoins, nous n'avons observé qu'un seul spot, ce qui ne prouve en rien la présence d'isoformes ou de modifications port-traductionnelles. Sur base du gel coloré à l'argent, il serait intéressant d'extraire le spot que nous croyons correspondre aux HSP90 et de l'identifier en spectrométrie de masse (S.M.) afin d'être sûr de son identité. Nous pourrions faire de même avec les spots rencontrés autour pour vérifier que nous n'avons pas affaire à des isoformes, et avec les spots trouvés en condition non contaminée afin de les identifier. De plus, il serait intéressant d'obtenir la séquence en acides aminés des protéines constituant ces derniers afin de voir s'ils contiennent effectivement la séquence reconnue par les anticorps primaires anti-HSP90.

4. Les HSPs comme biomarqueurs?

Rappelons que l'un des intérêts de cette étude était de trouver des biomarqueurs potentiels susceptibles de nous renseigner sur la présence de pesticides dans l'organisme des crevettes sans devoir mesurer la concentration en résidus dans les muscles.
Au vu de nos résultats, seul l'endosulfan à une concentration de 1µg/l aurait un effet sur la production d'HSP90 et d'HSP70 dans les muscles de *Penaeus monodon*. Par contre, dans les muscles et les branchies, les HSP70, 60 ou 90 ne semblent pas induites par la deltaméthrine, que ce soit à une concentration de 0,01µg/l ou 0,1 µg/l. Il en est de même dans les branchies des crevettes contaminées à l'endosulfan. De ce fait, nous pouvons dire que l'induction des HSP90 dans les muscles est assez spécifique au produit chimique. Il semblerait qu'il existe une certaine relation dose-effet étant donné que l'induction des HSP90 était moindre pour une concentration de 0,1µg/l d'endosulfan que pour 1µg/l.
Cependant, quelques points restent à être testés avant de pouvoir utiliser les HSP90 comme biomarqueurs d'exposition à l'endosulfan. Il faudrait étudier l'impact de la durée d'exposition au polluant sur la quantité d'HSP90 présente dans les muscles. En effet, Bhavan et Geraldine (1997), ont démontré un impact nettement plus important de l'endosulfan sur les majeurs constituants biochimiques de la crevette *M. malcolmsonii* après 21 jours d'expositions à des concentrations allant jusqu'à 0,032µg/l qu'après 8 jours d'exposition. D'après Sanders (1993),

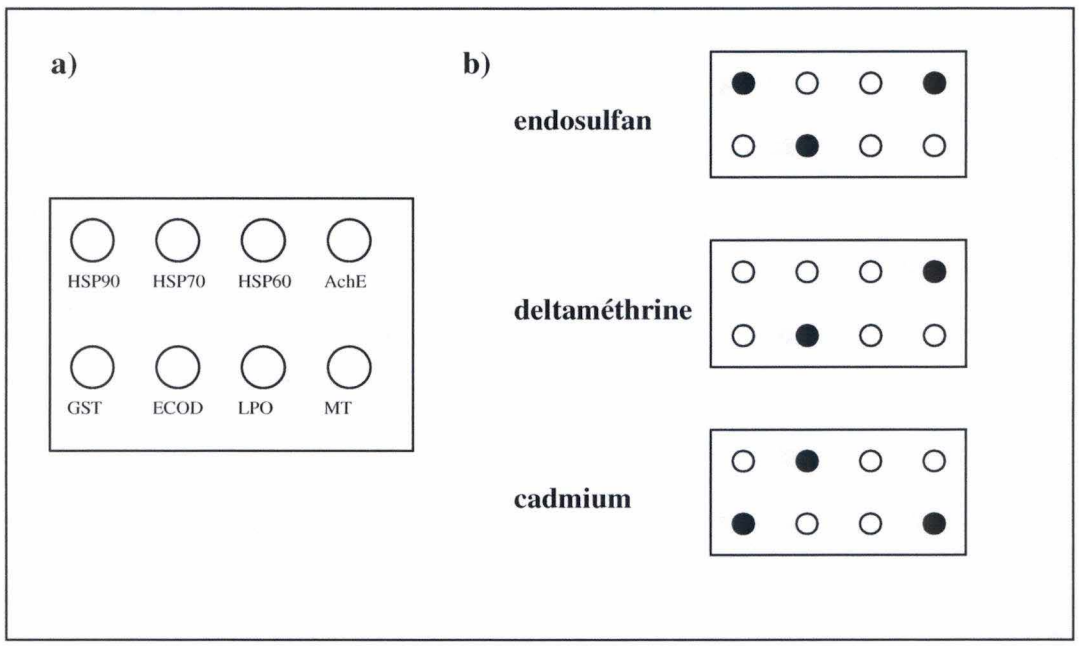


Fig 47: Représentation fictive d'un « kit » de biomarqueurs (AchE- acétylcholinestérase; GST- glutathion-S-transférase; ECOD- 7-ethoxycoumarine-O-deethylase; LPO- peroxydation lipidique; MT- metallothionéine) (a). L'analyse de ces derniers sur un échantillon donné nous permettrait d'obtenir un certain « pattern » en fonction des biomarqueurs qui réagissent (b). Ce « pattern » pourrait nous renseigner sur le xénobiotique présent dans le milieu et éviterait une analyse systématique en LC-MS. Cette dernière serait utilisée uniquement afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide du kit.

l'abondance des HSPs doit s'accroître au fur et à mesure que le temps d'exposition s'allonge. Il faudrait également connaître la relation entre l'accumulation des HSP90, l'exposition au contaminant et le stress subi par les organismes (Sanders, 1993). Pour ce faire, le dosage des résidus d'endosulfan présents dans les muscles de *P. monodon* et dans l'eau est tout à fait nécessaire. Cela nous renseignerait sur la réelle exposition des individus au pesticide. Afin de mieux comprendre le stress subi par les organismes, il aurait été intéressant, en réalisant des gels-2D, d'étudier la carbonylation des protéines présentes dans les muscles afin de voir si ces derniers étaient victimes d'un stress oxydant. D'autres études telles que le dosage du taux d'acides aminés libres, du taux d'ADN et d'ARN pourraient nous renseigner sur les effets toxiques exercés par l'endosulfan.

Il ne faut pas oublier les nombreuses considérations (discutées ci-dessous) à prendre en compte lors de l'utilisation des HSPs comme biomarqueurs (Sanders, 1993; Feder et Hofmann, 1999). Comme nous l'avons observé avec les HSP70 des muscles des crevettes contaminées à l'endosulfan, il est difficile d'attribuer un changement dans l'expression des HSPs à un stress particulier. De plus, la présence d'HSC peut masquer une induction des HSPs, ou du moins diminuer la sensibilité des analyses. Il ne faut pas oublier que le sexe, le stade de développement, le type et l'abondance de nourriture et les fluctuations naturelles de la température peuvent également influencer la production d'HSP. Et finalement, il faut être conscient que l'induction des HSPs par un certain stress peut induire une tolérance face au toxique étudié.

Malgré le fait que l'induction des HSP90 dans les muscles des crevettes contaminées à l'endosulfan semble être spécifique, il n'en reste pas moins que l'induction des HSPs constitue une réponse générale au stress et que son utilisation en tant que biomarqueur unique d'exposition à un polluant risque d'être limitée. Il serait plus prudent de l'utiliser en tant que membre d'une série de biomarqueurs indicateurs d'exposition à de l'endosulfan. Parmi les 3 HSPs étudiées, les HSP90 paraissent néanmoins être les plus appropriées pour ce rôle étant donné que les HSP60 s'avèrent, en tout cas dans notre étude, insensibles aux pesticides mais sensibles à d'autres stress et que les HSP70 semblent également trop influencées par une multitude de facteurs environnementaux.

Nous terminerons cette partie en rappelant que notre étude a été réalisée dans des conditions artificielles et que, avant de tirer toute conclusion hâtive sur la possible utilisation des HSP90 en tant que biomarqueurs d'exposition à l'endosulfan, il serait plus que nécessaire de mener le même type d'étude en milieu naturel. Il est en effet fréquemment observé que ces 2 types d'approches apportent des résultats quelque peu divergents. Dans le futur, il serait très intéressant d'un point de vue scientifique mais également environnemental et économique, d'approfondir cette étude et de mettre au point d'autres biomarqueurs qui nous indiqueraient la présence de divers xénobiotiques dans le milieu afin de pouvoir, à terme, ériger des laboratoires d'analyses rapides. Ces « kits » de biomarqueurs (*Figure 47*), permettraient d'éviter un nombre important d'analyses en LC-MS en déterminant le xénobiotique potentiellement responsable des perturbations avant d'entamer le dosage de résidus proprement dit. Ce système permettrait de détecter, d'une manière plus simple et plus économique que par l'analyse systématique de résidus, l'utilisation abusive de produits chimiques en aquaculture et cela permettrait dès lors de prendre les mesures nécessaires afin d'éviter ce genre d'abus et de mettre en place une aquaculture durable.

V. Conclusions

Ce travail nous a permis de mettre en évidence que les HSP90 sont, parmi les 3 familles d'HSP étudiées, les plus aptes à révéler l'exposition des crevettes tigrées géantes à l'endosulfan. Le fait que seules les HSP90 et 70 des muscles aient enregistré une variation de leur concentration confirme que l'effet des xénobiotiques sur la production des protéines de stress varie en fonction des tissus. Nous n'avons pas pu prouver d'impact des contaminations à la deltaméthrine sur l'abondance des HSPs. Nous pourrions en conclure que les 2 pesticides testés, un organochloré et un pyréthroïde, présentent différents mécanismes d'action protéotoxique.

La vigilance s'impose quant à l'utilisation des HSP90 en tant que biomarqueurs d'exposition à l'endosulfan, car les HSPs restent avant tout une réponse générale au stress: il se peut que les HSP90 soient induites par d'autres agents stressants présents dans l'environnement. Une étude similaire à la nôtre, mais effectuée dans de réelles crevetticultures, devrait être entreprise afin de pouvoir comparer les résultats obtenus en milieu naturel et en laboratoire et confirmer éventuellement nos résultats.

Les HSP70 et 60 semblent fortement influencées par les conditions de maintien des crevettes. Bien que n'étant pas notre objectif premier, la découverte de biomarqueurs révélant de mauvaises conditions de maintien peut être intéressante dans le domaine de l'aquaculture. En effet, lorsque gardées dans de mauvaises conditions, les crevettes risquent de subir une baisse de croissance. Cela engendrerait une diminution de rendement et donc une réduction de profit.

Dans un premier temps, nous pensons qu'il serait trop risqué d'affirmer que seules, les HSP90 des muscles de *P. monodon* pourraient servir de biomarqueurs d'exposition à l'endosulfan. Par contre, il nous semble tout à fait possible d'inclure les HSPs dans un système multiple de biomarqueurs. Celles-ci pourraient être utilisées comme outil de prédiction de mauvaises conditions de maintien des crevettes dans les cultures, permettant de ce fait la mise en œuvre de stratégies de remédiation avant que la santé des crevettes ne soit menacée (ce qui provoquerait des pertes financières importantes pour les fermiers) et que des dommages environnementaux irréversibles ne se produisent. **Nous pensons que les HSPs peuvent être utilisées dans le but d'atteindre une meilleure gestion des systèmes de production et, in fine, de mettre en place une aquaculture durable.**

VI. Bibliographie

- Aït-Aïssa, S., Porcher, J.-M., Arrigo, A.-P., Lambré, C. Activation of the hsp70 promoter by environmental inorganic and organic chemicals: relationships with cytotoxicity and lipophilicity. *Toxicology* **145**, 147-157 (2000).
- Aït-Aïssa, S. Analyse *in vitro* de la pollution par utilisation d'un modèle cellulaire contenant un gène reporteur sous le contrôle du promoteur du gène de stress *HSP70*. Thèse de Doctorat, Université de Technologie de Compiègne (2000).
- Bagchi, D., Bhattacharya, G. et Stohs, S.J. In vitro and in vivo induction of heat shock (stress) protein (Hsp) gene expression by selected pesticides. *Toxicology* **112**, 57-68 (1996).
- Bainy, ACD. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. *Aquaculture* **191**, 163-168 (2000).
- Barry, M.J. et Logan,D.C. The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. *Aquatic Toxicology* **41**, 101-124 (1998).
- Berg, H. Pesticide use in rice and rice-fish farms in the Mekong Delta, Vietnam. *Crop Protection* **20**, 897-905 (2001).
- Bernard, A. Evaluation du stress oxydant chez la crevette tigrée Penaeus monodon Fabricius (1798) suite à l'utilisation d'antibiotiques dans les élevages au Viêt Nam. Mémoire, Université de Namur (2005).
- Bhavan, P.S. et Geraldine, P. Alterations in concentrations of protein, carbohydrate, glycogène, free sugar, and lipid in the prawn Macrobrachium malcolmsonii on exposure to sublethal concentrations of endosulfan. *Pesticide biochemistry and physiology* **58**, 89-101 (1997).
- Bhavan, P.S. et Geraldine, P. Biochemical stress responses in tissues of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* on exposure to endosulfan. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **70**, 27-41 (2001).
- Bierkens, J., Maes, J., Vander Plaetse, F. Dose-dependent induction of heat shock protein 70 synthesis in *Raphidocelis subcapitata* following exposure to different classes of environmental pollutants. *Environmental Pollution* **101**, 91-97 (1998).
- Brennan, D., Preston, N., Clayton, H., T.T.Be. An evaluation of Rice-Shrimp Farming Systems in the Mekong Delta. Report prepared under the World Bank, NACA, WWF and FAO Consortium Program on Shrimp Farming and the Environment. Work in Progress for Public Discussion. Published by the Consortium. 10 Pp. (2002).
- Brkic, Z. The use of antimicrobials in shrimp hatcheries and grow-out facilities in a South East Asian country. Thèse de doctorat, Université Royale Vétérinaire et d'Agriculture de Copenhagen (2003).
- 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 the Total Environment* **247**, 295-311 (2000).

- Capkin, E., Altinok, I. et Karahan, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere* **64**, 1793-1800 (2006).
- Caquet, T., Thybaud, E., Le Bras, S., Jonot, O., and Ramade, F. Fate and biological effects of lindane and deltamethrin in freshwater mesocosms. *Aquatic Toxicology* **23**, 261-278 (1992).
- Cara, J.B., Aluru, N., Moyano, F.J., Vijayan, M.M. Food-deprivation induces HSP70 and HSP90 protein expression in larval gilthead sea bream and rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* **142 Part B**, 426-431 (2005).
- Chiang, H.L., Terlecky, S.R., Plant, C.P., Dice, J.F. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intercellular proteins. *Science* **246**, 382 (1989).
- Cimino, E.J., Owens, L., Bromage, E., Anderson, T.A. A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on level of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Partie A **132**, 591-598 (2002).
- David, J.C., Grongnet, J.F. Les protéines de stress. *INRA Productions Animales* **14**, 29-40 (2001).
- Depledge, M.H. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. Dans: M.C. Fossi et C. Leonzion (éds.), Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Pp 261-285 (1994).
- Dhainaut, A., Bonaly, J., Barque, J.-P., Minier, C., Caquet, T. Proteines de choc thermique et résistance multixénobiotique. Dans : Lagadic,L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F., éds, Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Chap4 (1997).
- Dowling, V., Hoarau, P.C., Romeo, M., O'Halloran, J., van Pelt, F., O'Brien, N., Sheehan, D. Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure : a proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquatic Toxicology* **77**, 11-18 (2006).
- Eder, K.J., Leutenegger, G.M., Wilson, B.W., Werner, I. Molecular and cellular biomarker responses to pesticide exposure in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Marine Environmental Research* **58**, 809-813 (2004).
- Ela, J.M. A Look at the Environmental Effects of Intensive Shrimp Farming in the Mekong Delta. *SIT Study Abroad*, 26p (2005).
- Eufemia, N.A. et Epel, D. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquatic Toxicology* **49**, 89-100 (2000).
- Feder, M.E., Hofmann, G.E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annual Review of Physiology* **61**, 243-282 (1999).
- Forbes, V.E., Moller, V., Depledge, M.H. Intrapopulation variability in sublethal response to heavy metal stress in sexual and asexual gastropod populations. *Functional Ecology* **9**, 477-484 (1995).
- Gaitanaris, G.A., Papavassiliou, A.G., Rubock, P., Silverstein, S.J., Gottesman, M.E. Renaturation of denatured λ repressor requires heat shock proteins. *Cell* **61**, 1013-1020 (1990).
- Garry, R.F., Ulug, E.T. et Bose, H.R. Induction of stress proteins in Sindbis virus- and vesicular stomatitis virus-infected cells. *Virology* **129**, 319-332 (1983).

- Gräslund, S., Bengtsson, B-E. Chemicals and biological products used in south-east Asian shrimps 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).
- Gutierrez, J.A. et Guerriero, V.J. Quantification of Hsp70 in tissues using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods* **143**, 81-88 (1991).
- Hartl, F.U., Hlodan, R., Langer, T. Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends in Biochemical Sciences* **19**, 20-25 (1994).
- Hermesz, E., Abraham, M. et Nemcsok, J. Identification of two *hsp90* genes in carp. *Comparative Biochemistry and Physiology* **129 Part C**, 397-407 (2001).
- Huynh Thi, T., Nguyen Thanh, P. Workpackage 1: Survey on the use of chemicals and drugs in shrimp farming and their residue concentrations in cultivated shrimps and environment (water and sediment) in Viet Nam. Rapport d'activité, contrat n°BL/12/V07 (2005).
- Kiang, J.G., Tsokos, G.C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology and Therapeutics* **80**, 183-201 (1998).
- Knapp, CW., Caquet, T., Hanson, ML., Lagadic, L., Graham, DW. Response of water column microbial communities to sudden exposure to deltamethrin in aquatic mesocosms. *FEMS Microbiology Ecology* **54**, 157-165 (2005).
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Dans : Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., Ramade, F. (éds.), Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson, Paris, pp 1-9 (1997).
- Lee, S.-M., Lee, S.-B., Park, C.-H., Choi, J. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. *Chemosphere*, article in press (2006).
- Lewin, B. Genes VIII in John Challice (éd.), Pearson Prentice Hall (2004).
- Lewis, S., Donkin, M.E., Depledge, M.H. HSP70 expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) exposed to environmental stressors. *Aquatic Toxicology* **51**, 277-291 (2001).
- Lewis, S., Handy, R.D., Cordi, B., Billinghurst, Z., Depledge, M.H. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology* **8**, 351-368 (1999).
- Liautard, J.P. La chaperone au pays des proteins. *Biofutur* **133**, 35-40 (1994).
- Lindquist, S. The heat shock response. *Annual Review of Biochemistry* **55**, 1151-1191 (1986).
- Liu, G-P., Shi, N. The inhibitory effects of deltamethrin on dopamine biosynthesis in rat PC12 cells. *Toxicology Letters* **161**, 195-199 (2006).

- Lundebye, A-K., Vedel, G.R., Krogsdam Christensen, A.M., Kristiansen, K., Hunter, D., Depledge, M.H. Improved quantification of stress proteins by western blotting. *Analytica Chimica Acta* **311**, 109-114 (1995).
- Ma, E. et Haddad, G.G. Anoxia regulates gene expression in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Brain Research*, **46**, 325-328 (1997).
- Minh Phuong, D. The impacts of pesticide use in rice production on aquaculture in the Mekong delta: a dynamic model. Faculty of economics, University of Nong Lam (2002).
- Morimoto, R.I., Sarge, K.D., Abravaya, K. Transcriptional Regulation of Heat Shock Genes, a paradigm for inducible genomic responses. *The Journal of Biological Chemistery* **31**, 21987-21990 (1992).
- Naqvi, S.M. et Vaishnavi, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comparative Biochemistry and Physiology* **105C**, 347-361 (1993).
- Olsson, B. Protein Expression in Baltic Sea Blue Mussels Exposed to Natural and Anthropogenic Stress. The use of stress inducible proteins in ecotoxicological studies. Thèse de doctorat, Université de Stockholm (2005).
- Pennington, P.L., DeLorenzo, M.E., Lawton, J.C., Strozier, E.D., Fulton, M.H., Scott, G.I. Modular estuarine mesocosm validation: ecotoxicological assessment of direct effects with the model compound endosulfan. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **298**, 369-387 (2004).
- Pham Kim, D., Dang Vu, B., Pham Hong, N., Douny, C. , Maghuin-Rogister, G. Survey on the use of drugs, chemicals and bio-products in the shrimp farming system in Quang Ninh in Vietnam. Workpackage 1, Rapport d'activités (contrat n°BL/13/V06), (2005).
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., DeFranco, D.B. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signaling protein movement. *Cellular Signalling* **16**, 857-872 (2004).
- Provenzano, A.J. Economic aspects: Fisheries and Culture, dans: Bliss, D.E., éd., The Biology of crustacean, Academic Press, inc., volume 10 (1985).
- Pyza, E., Mak, P., Kramarz, P., Laskowski, R. Heat shock proteins (HSP70) as biomarkers in ecotoxicological studies. *Ecotoxicology and environmental Safety* **38**, 244-251 (1997).
- Redshaw CJ. Ecotoxicological risk assessment of chemicals used in aquaculture: a regulatory viewpoint. *Aquaculture Research* **26**, 629-637 (1995).
- Salminen, W.F., Voellmy, R., Roberts, S.M. Induction of HSP70 in HepG2 cells in response to hepatotoxicants. *Toxicology and Applied Pharmacology* **141**, 117-123 (1996).
- Salminen, W.F., Voellmy, R., Roberts, S.M. Effect of N-acetylcysteine on heat shock protein induction by acetaminophen in mouse liver. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **286**, 519-524 (1998).
- Sanders, B.M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical Reviews in Toxicology* **23**, 49-75 (1993).
- Sanders, B.M., Pascoe, V.M., Nakagawa, P.A., Martin, L.S. Persistence of heat shock response over time in the common mussel, *Mytilus edulis*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* **1(2)**, 147 (1992).

- Santoro, M.G. Heat Shock Factors and the Control of the Stress Response. *Biochemical Pharmacology* **59**, 55-63 (2000).
- Selvakumar, S. et Geraldine, P. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: acclimation-influenced variations in the induction temperatures for HSP70. *Comparative Biochemistry and Physiology* **140 Part A**, 209-215 (2005)
- Selvakumar, S., Geraldine, P., Shanju, S., Jayakumar, T. Stressor-specific induction of heat shock protein 70 in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* (H.Milne Edwards) exposed to the pesticides endosulfan and carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **82**, 125-132 (2005).
- Shang, Y.C., Leung, P., Ling B-H. Comparative economics of shrimp farming in Asia. *Aquaculture* **164**, 183-200 (1998).
- Silvestre, F. Réponses à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin *Eriocheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse de protéome. Thèse de doctorat, Université de Namur (2005).
- Skowyra, D., Georgopoulos, C., Zylicz, W. The E. coli *dnaK* gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62**, 939 (1990).
- Smies, M., Evers, R.H.J., Reijnenburg, P.H.M., Koeman, J.H. Environmental aspects of field trials with pyrethroids to eradicate tsetse fly in Nigeria. *Ecotoxicology and environmental Safety* **4**, 114-128 (1980).
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheet, 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).
- Tissières, A., Mitchell, K., Tracy, V.M. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* **84**, 389-392 (1974).
- van de Braak, K. Haemocytic defence in black tiger shrimp (Penaeus monodon). Thèse de doctorat, université de Wageningen (2002).
- Werner, I. The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia). *Marine Environmental Research* **58**, 803-807 (2004).
- 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 Endosulfan, Geneva (1968).
- World Health Organisation Endosulfan (Environmental Health Criteria N°40), Geneva (1984).
- World Health Organisation Deltamethrin (Environmental Health Criteria N°97), Geneva (1990).
- World Health Organisation Endosulfan, Geneva (2000).
- Yu, Z., Yang, X. et Wang, K. Metal ions induced heat shock protein response by elevating superoxide anion level in HeLa cells transformed by HSE-SEAP reporter gene. *Toxicology* **223**, 1-8 (2006).