

THESIS / THÈSE

MASTER IN BIOLOGY OF ORGANISMS AND ECOLOGY

Effets de l'Aroclor 1254 sur les mécanismes antioxydants et sur les profils d'expression protéiques de larves de xénopes *Xenopus laevis*

Divoy, Céline

Award date:
2005

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**EFFETS DE L'AROCLOR 1254 SUR LES MECANISMES ANTIOXYDANTS ET SUR LES PROFILS
D'EXPRESSION PROTEIQUES DE LARVES DE XENOPES *XENOPUS LAEVIS***

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

Céline DIVOY
Août 2005

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

Effets de l'Aroclor 1254 sur les mécanismes antioxydants et sur les profils d'expression protéiques de larves de xénopes *Xenopus laevis*

DIVROY Céline

Résumé

Les effets des PCBs sur les premières étapes du développement des amphibiens restent à ce jour largement inconnus. Dans ce travail, des larves de *Xenopus laevis* (du 2^{ème} au 5^{ème} jour PF) ont été exposées à une mixture de PCBs, l'Aroclor[®] 1254. Une diminution significative ($p < 0,05$) du poids a été observée pour les larves exposées à 1 mg/l ($4,3 \pm 0,5$ mg) et à 10 mg/l ($3,8 \pm 0,1$ mg) par rapport au contrôle ($6,1 \pm 0,7$ mg). L'exposition à 1 mg/l d'Aroclor 1254 augmente de façon significative ($p < 0,05$) l'activité de la glutathion S-transérase GST (2233 ± 452 nmol CDNB/min/mg de prot) par rapport au contrôle (1357 ± 289 nmol CDNB/min/mg de prot). Par contre, aucune différence significative n'a été mise en évidence pour d'autres systèmes antioxydants : superoxyde dismutase SOD, catalase CAT, glutathion peroxydase GPx, glutathion reductase GR, taux de glutathion total GSH. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé l'analyse protéomique par *Diffential In Gel Electrophoresis* (2D-DIGE ; 12,5 % ; pH 4-7) afin de mettre en évidence, sans *a priori*, des variations d'expression de protéines dans la condition '1 mg/l' par rapport à un contrôle. Cette méthodologie nous a permis de mettre en évidence 1 spot de protéine sous-exprimé 1,31 X ($p = 0,03$) et un autre sur-exprimé 2,45 X ($p = 0,04$) après exposition aux PCBs. Ce travail nous a permis de mettre en évidence un état de stress chez des larves de *X. laevis* en contact avec des PCBs. A 1 mg/l, l'activité de la GST ainsi que l'expression de 2 protéines sont modifiées.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Août 2005

Promoteur: P.Kestemont

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

Effects of Aroclor 1254 on antioxidant systems and in protein expression profiles of developing *Xenopus laevis* tadpoles

DIVOY Céline

Abstract

The effects of PCBs on the early stages of development are largely unknown for many amphibians. In this report, developing *Xenopus laevis* tadpoles were exposed to the PCB mixture Aroclor® 1254 from 2 through 5 days postfertilization. Exposure to 1 and 10 ppm of Aroclor caused statistically significant ($p < 0,05$) reduction in body weight with values of respectively $4,3 \pm 0,5$ mg and $3,8 \pm 0,14$ mg compared to the control ($6,1 \pm 0,7$ mg). In addition, exposure to 1 ppm statistically ($p < 0,05$) increased the activity of the glutathione S-transferase (GST) with value of 2233 ± 452 nmol CDNB/min/mg de prot compared to the control (1357 ± 289 nmol CDNB/min/mg de prot). No significant differences ($p > 0,05$) were found for the other studied antioxidant systems: superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and level of glutathione (GSH). On the other hand, *Differential In Gel Electrophoresis* technique (DIGE; pH 4-7; 12,5 %) was used to show variations in protein expression profiles for the group 1 ppm compared to the control. This technique has shown 2 protein spots with modified expression. One spot was under-expressed 1,31 X ($p = 0,03$) and another was over-expressed 2,45 X ($p = 0,04$). This study has shown the induction of oxidative stress in *Xenopus laevis* tadpoles. Exposure to 1 ppm caused modifications in GST activity and in proteins expression.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Août 2005

Promoteur: P.Kestemont

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

Je tiens d'abord à remercier mon promoteur, le Professeur Patrick Kestemont de m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche. Merci pour votre suivi, votre disponibilité, votre patience, vos bons conseils, votre soutien dans les moments où j'étais découragée...

Je remercie Virginie Gillardin d'avoir été à l'écoute de mes nombreuses interrogations durant ce mémoire, pour ses conseils et sa gentillesse.

Je remercie chaleureusement Frédéric Silvestre d'avoir accepté d'être tuteur officiel de ce mémoire. Merci pour ton aide Frédéric, et pour tout ce que tu as fait pour m'aider durant ce mémoire. Merci pour ton soutien, tes encouragements (même du Vietnam), tes précieux conseils, ta disponibilité, tes nombreuses compétences scientifiques, et pour les bons moments de discussion.

Merci Marie-Claire pour ton savoir-faire, tes compétences scientifiques durant ce travail en laboratoire. Tu m'as appris beaucoup... Mais à côté de cet aspect 'boulot', je tiens également à te remercier pour ta sympathie et pour les nombreuses petites discussions.

Merci à Gérard, Martine, Robert, Emilie, Amélie.... pour leurs conseils, leur aide et pour cette bonne ambiance qui régnait au laboratoire du 2^{ème}.... Je remercie Edouard du temps qu'il m'a consacré pour la réalisation des gels en 2D-DIGE ainsi que Sylvain pour les nombreux services rendus durant ce mémoire.

Je remercie Jess, Greg, Geof ' pour leur soutien mais également pour les nombreux moments partagés en leur compagnie, durant ces quatre années d'étude ... Merci Benoît d'avoir supporter mes sautes d'humeur... Merci à Amandine, Lise-Marie, Auré, Pierre, Pez, Caro, Carole, Cécile, Laurence² pour ces deux dernières années ... Un merci particulier à Céline pour sa gentillesse, son écoute et ses multiples conseils.

Je n'oublie pas non plus de remercier mes autres condisciples de biologie Lio, M-Cé, Guil, Benja et Gégé.

Merci à toi Karine, de m'avoir continuellement soutenue et d'avoir toujours cru en moi... Merci à Céline, Ludi, Sophie... pour leur présence.

Enfin, je remercie mes parents de m'avoir permis de réaliser ces quatre années d'études et pour la confiance qu'ils m'ont toujours témoignée. Merci Cath, d'être toujours là pour moi...

Liste des abréviations

ADN = acide désoxyribonucléique
ARE = élément de réponse antioxydante
ARN = acide ribonucléique
APS = ammonium persulfate
BCS = acide bathocuproïne disulfonique
BSA = albumine de sérum bovin
CAT = catalase
CDNB = 1-chloro-2,4-dinitrobenzène
CTL = contrôle
Cy = cyanine
2D-DIGE = Two Dimension Difference In-Gel Electrophoresis
DMSO = diméthylsulfoxyde
DTNB = acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)
DTT = dithiothreitol
EDTA = acide tétraacétique éthylène diamine
GPx = glutathion peroxydase
GR = glutathion réductase
GSH = glutathion, forme réduite
GSSG = glutathion, forme oxydée
GST = glutathion S-transférase
H₂O = eau
H₂O₂ = peroxyde d'hydrogène
IEF = Isoelectric focusing
IPG = gradient de pH immobilisé
kDa = kilodalton
LOO[•] = hydroperoxyde lipidique
LOOH = hydroperoxyde lipidique
LPO = peroxydation lipidique
µg = microgramme
µl = microlitre
MALDI = Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization
MDA = malondialdéhyde
ml = millilitre
mM = millimolaire
MS = spectromètre de masse
NADH = nicotamide adénine dinucléotide
NADPH = nicotamide adénine dinucléotide phosphate
NBA = 2-nitrobenzaldéhyde
NBT = nitrobleu tétrazolium
O₂^{•-} = anion superoxyde
OH[•] = radical hydroxyle
pI = point isoléctrique
PBS = phosphate buffer saline
ROS = espèces réactives de l'oxygène
SDS = sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SSA = acide 5-sulphosalicylique

TBA = acide thiobarbiturique

TBARS = substances réactives à l'acide thiobarbiturique

TCA = acide trichloroacétique

TEMED = tétraméthylène diamine

Tris = Tris (hydroxyméthyl) aminométhane

Table des matières

I. Introduction.....	1
<u>1. Le développement des amphibiens anoures : l'exemple du xénope <i>Xenopus laevis</i></u>	<u>1</u>
1.1. L'embryogenèse	1
1.1.1. <i>La fécondation</i>	1
1.1.2. <i>La segmentation</i>	2
1.1.3. <i>La gastrulation</i>	2
1.1.4. <i>L'organogenèse : la neurulation et le stade de bourgeon caudal</i>	2
1.1.5. <i>L'éclosion</i>	2
1.1.6. <i>Le contrôle</i>	3
1.2. La métamorphose.....	3
1.2.1. <i>Le contrôle de la métamorphose</i>	3
<u>2. Les PolyChloroBiphényles</u>	<u>4</u>
2.1. Introduction	4
2.2. Les PolyChloroBiphényles	5
2.2.1. <i>Historique concernant les PCBs</i>	5
2.2.2. <i>Composition et structure</i>	5
2.2.3. <i>Propriétés physico-chimiques et utilisation</i>	6
2.2.4. <i>Transport des PCBs et bioaccumulation</i>	6
2.3. La toxicité des PCBs	7
2.3.1. <i>La distribution dans le corps</i>	7
A. <i>Voie d'entrée des PCBs</i>	7
B. <i>Le stockage</i>	7
C. <i>Excrétion</i>	7
2.3.2. <i>Modes d'action des PCBs</i>	7
A. <i>Métabolisation</i>	7
B. <i>Le récepteur Ah et le phénomène d'induction du CYP 4501A1</i>	8
C. <i>Perspectives écotoxicologiques de l'induction du CYP 450</i>	9
D. <i>L'approche d'équivalence toxique (TEQ)</i>	9
E. <i>Les catégories de PCBs</i>	10
<u>3. Notion de stress oxydant.....</u>	<u>10</u>
3.1. Formation des espèces réactives à l'oxygène.....	10
3.2. Sources des ROS et systèmes de défense	11
3.2.1. <i>Systèmes enzymatiques</i>	11
3.2.2. <i>Systèmes non enzymatiques</i>	12
3.3. Biomarqueurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques	12
3.3.1. <i>Activités antioxydantes endogènes chez les animaux aquatiques</i>	12
3.3.2. <i>Réponse des animaux aquatiques au stress oxydant dû aux contaminants de l'environnement</i>	13
3.3.3. <i>Réponse des amphibiens anoures à divers contaminants de l'environnement</i> 13	13
<u>4. Etudes concernant les effets des PCBs sur différents organismes vivants.....</u>	<u>14</u>
4.1. L'impact sur les populations	14
4.2. L'impact sur différentes espèces animales	14
4.2.1. <i>Les PCBs et le système antioxydant</i>	14

4.2.2. Les PCBs et les multiples cibles.....	15
4.2.3. Les PCBs et le système reproducteur	15
4.2.4. Les PCBs chez les rongeurs : le rat et la souris	16
4.3. Effets des PCBs sur le développement des amphibiens	16
5. L'approche protéomique.....	17
5.1. La génomique fonctionnelle.....	17
5.1.1. L'approche transcriptomique	18
5.1.2. L'approche protéomique	18
A. Les gels d'électrophorèse en 2 dimensions (2D-DIGE).....	18
B. Le 2D-DIGE	19
5.2. La protéomique en écotoxicologie	19
6. Objectifs	20
II. Matériel et méthodes	21
1. Choix du modèle d'étude	21
2. Elevage des xénopes	21
3. Traitement des œufs et conditions d'expérimentation.....	21
3.1. Traitement des œufs	22
3.2. Conditions expérimentales.....	22
3.3. Choix des stades et des concentrations en PCBs	23
4. Le dosage des biomarqueurs de stress oxydant.....	23
4.1. Préparation des échantillons.....	23
4.2. Dosage de la peroxydation des lipides (LPO).....	24
4.3. Dosage du glutathion total (GSH)	24
4.4. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)	24
4.5. Dosage de la glutathion réductase (GR).....	25
4.6. Dosage de la glutathion S-transférase (GST)	25
4.7. Dosage de la superoxyde dismutase totale (SOD).....	26
4.8. Dosage de la catalase (CAT)	26
4.9. Dosage des protéines selon la méthode de Lowry	27
5. L'analyse protéomique.....	27
5.1. Préparation des échantillons.....	27
5.2. Electrophorèse en IEF	27
5.3. Electrophorèse SDS-PAGE.....	28
5.4. Révélation.....	28
5.4.1. Coloration à l'argent	28
5.4.2. Révélation et analyse en 2D-DIGE.....	28
5.4.3. Marquage au Ruthénium	29
6. Dosage de PCBs dans les tissus de têtards <i>Xenopus laevis</i>	29
7. Traitement statistique des données	29

III. Résultats	30
<u>1. Effets d'une exposition à des PCBs sur le taux de survie et le poids des larves.....</u>	30
1.1. Rappel du protocole expérimental.....	30
1.2. Taux de survie.....	30
1.3. Poids.....	31
<u>2. Dosage des biomarqueurs de stress oxydant</u>	32
2.1 Dosage de la peroxydation lipidique (LPO).....	32
2.2. Dosage du glutathion total (GSH)	34
2.3. Dosage de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx).....	35
2.4. Dosage de l'activité de la glutathion réductase (GR).....	35
2.5. Dosage de la glutathion S-transférase (GST)	36
2.6. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase totale (SOD)	37
2.7. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)	37
<u>3. Dosage des PCBs dans les tissus de larves de xénopes.....</u>	38
<u>4. Approche protéomique en gels 2D-DIGE.....</u>	39
IV Discussion	41
<u>1. Modification des taux de survie lors d'une exposition à court terme à de l'Aroclor 1254..</u>	41
<u>2. Effets d'une exposition à court terme à de l'Aroclor 1254 sur le poids des larves</u>	43
<u>3. Effets d'une exposition à court terme à de l'Aroclor 1254 sur les systèmes antioxydants des larves.....</u>	44
3.1. Taux de peroxydation lipidique.....	44
3.2. Réponses des systèmes de défense antioxydants à une exposition à de l'Aroclor 1254.....	45
3.2.1. <i>Les niveaux de glutathion total</i>	45
3.2.2. <i>Activité de la glutathion S-transférase</i>	47
3.2.3. <i>Activités de la superoxyde dismutase totale et de la catalase</i>	48
3.2.4. <i>Activités de la glutathion peroxydase et de la glutathion réductase</i>	49
<u>4. Dosage des PCBs dans les organismes de <i>X. laevis</i> exposés à de l'Aroclor 1254</u>	50
<u>5. Modification de l'expression des protéines suite à une exposition aux PCBs</u>	50
V. Conclusions et perspectives	53
Bibliographie	55

Première partie

Introduction

Tableau I.1 : Chronologies successives du développement de trois espèces d'amphibiens (Franquinet et Foucrier, 1998)

Temps (heures)	<i>Rana pipiens</i> (18°C)		<i>Pleurodeles waltl</i> (18°C)		<i>Xenopus laevis</i> (22°C)	
	Étapes	Stades	Étapes	Stades	Étapes	Stades
0	Fécondation	1	Fécondation	0	Fécondation	0
1	Rotation de symétrisation	2			Début de 1ère division	1
1,5					2 cellules	2
2,5					8 cellules	4
3,5	2 cellules	3				
4,5	4 cellules	4			Jeune blastula	7
5,5	8 cellules	5			Mi-blastula	8
6			2 cellules	1		
6,5	16 cellules	6				
7						
7,5	32 cellules	7	4 cellules	2		
9			8 cellules	3	Jeune gastrula	10
11			16 cellules	4b		
14			Jeune blastula	5		
15					Fin de gastrulation	13
16	Mi-blastula	8				
16,5					Début de neurulation	14
18,5					Gouttière neurale	16
21	Fin de segmentation	9			Tube neural	19
22			Mi-blastula	6		
26	Jeune gastrula	10				
27			Fin de segmentation	7	Jeune bourgeon caudal	24
31	Mi-gastrula	11	Jeune gastrula	8		
38,5			Mi-gastrula	9		
42	Fin de gastrulation	12			Battements cardiaques	33
50	Plaque neurale	13			Éclosion	36
56			Fin de gastrulation	13		
62	Gouttière neurale	14				
63			Plaque neurale	14		
72	Tube neural	16				
80			Tube neural	21		
84	Jeune bourgeon caudal	17				
87			Jeune bourgeon caudal	22		
118	Battements cardiaques	19				
130			Battements cardiaques	28		
140	Éclosion	20				
264			Éclosion	34		

Introduction

Depuis plusieurs années, on constate un déclin significatif des populations d'amphibiens sur l'ensemble des continents. Ce phénomène s'accompagne par la mise en évidence de perturbations des processus de développement de ces organismes. Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer les différents phénomènes observés. En effet, à la destruction des habitats vient s'ajouter une exposition prolongée à différents xénobiotiques, comme les métaux lourds, les pesticides et autres composés organochlorés dont font partie les PolyChloroBiphényles (Carey et Bryant, 1995). Les premières étapes du développement embryonnaire sont particulièrement sensibles à une contamination par les PCBs. En effet, la présence d'une peau très perméable chez les amphibiens et le développement des œufs et larves dans l'eau facilitent le contact avec ces polluants ainsi que leur pénétration dans les organismes (Gutleb *et al.*, 1999). De plus, différents effets délétères imputables aux PCBs (oedèmes, dépigmentation de la peau, malformation des yeux et de la queue, mortalité accrue, retard ou non-aboutissement des processus de développement et de la métamorphose) ont été mis en évidence de façon expérimentale chez les amphibiens anoures et ce, pour les stades précoces du développement (Fisher *et al.*, 2003). En milieu naturel, des dysfonctionnements du comportement ont également été observés chez des grenouilles léopards *Rana pipiens* provenant de régions contaminées par des PCBs (bassin de la rivière Saint Laurent, aux USA) (Savage *et al.*, 2002).

C'est dans ce contexte général que nous allons étudier les éventuels effets d'une mixture de PCBs, l'Aroclor 1254, sur les premières étapes du développement des larves de xénopes *X. laevis*.

1) Le développement des amphibiens anoures : l'exemple du xénope *Xenopus laevis*

La description du développement précoce des amphibiens jusqu'à la métamorphose est basée sur les ouvrages de Franquinet et Foucrier, 1998 et de Shi, 1999

1.1. L'embryogenèse

Le tableau I.1. illustre la chronologie comparative de l'ontogenèse précoce chez trois espèces, depuis la fécondation jusqu'à l'éclosion.

1.1.1. La fécondation

Dans la nature, les xénopes *Xenopus laevis* s'accouplent au moment de la saison des pluies dans les étangs sud africains. En laboratoire, l'accouplement peut être obtenu toute l'année par stimulation hormonale. Le mâle, plus petit que la femelle, s'accroche à celle-ci au niveau de la ceinture pelvienne, on parle d'amplexus lombaire. Les produits génitaux sont émis simultanément. La femelle libère ses ovocytes par lots de quelques dizaines et ceux-ci sont immédiatement fécondés par le mâle. Il s'agit donc d'une fécondation externe.

1.1.2. La segmentation

L'œuf va subir une segmentation qui donne à son terme (24h Post-Fécondation PF) une blastula de 5 à 6000 cellules. Les cellules de la région polaire animale sont de petite taille (micromères) par opposition aux grandes cellules de l'hémisphère végétatif (macromères). La raison de cette dissymétrie est due à la présence de réserves nutritives (vitellus) stockées sous forme de grains (ou de plaquettes). Ces derniers, situés dans le pôle végétatif, sont de plus grande taille par rapport à ceux présents dans le pôle animal ; on parle d'œuf hétérolécithe. A ce stade, toute destruction d'un ou plusieurs blastomères n'entraîne pas de déficit organique particulier pour l'embryon car les cellules adjacentes aux blastomères supprimés compensent leur disparition. Il est également possible, à ce stade, d'établir une carte des territoires présomptifs.

1.1.3. La gastrulation

Au sortir de la période de clivage, des mouvements cellulaires de grande ampleur (épibolie et invagination) affectent l'ensemble de l'embryon. Des remaniements cellulaires en découlent et redistribuent les tissus embryonnaires. Les trois feuilletts originaux, ectoderme, mésoderme et endoderme, sont organisés de manière concentrique : l'endoderme profond, l'ectoderme superficiel et le mésoderme en position intermédiaire.

1.1.4. L'organogenèse : la neurulation et le stade de bourgeon caudal

Ce n'est qu'une fois la gastrulation achevée que se manifestent les premiers signes de l'organogenèse qui débute par la mise en place du système nerveux.

Durant la neurulation (ébauche du système nerveux), l'embryon commence à s'allonger. Vers la 15^{ème} heure PF, la plaque neurale s'installe. Ensuite, les bourrelets neuraux qui délimitent cette plaque formeront la gouttière neurale, puis le tube neural.

Les trois feuilletts germinatifs, mis en place pendant les stades initiaux de l'embryogenèse, évoluent en ébauches d'organes. C'est la période d'organogenèse qui voit le corps de l'embryon se modeler pour prendre progressivement la forme du têtard de grenouille.

Au cours des heures qui suivent, s'effectue un modelage progressif des principales structures corporelles qui se sont mises en place définitive durant la neurulation. C'est plus précisément la différenciation d'une queue à partir d'un massif mésenchymateux postérieur qui a donné le nom de bourgeon caudal au stade qui succède la neurulation.

Immédiatement avant l'éclosion (stade du bourgeon caudal précoce), le tube neural va se diviser en 3 parties de l'encéphale : le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale.

A la fin de la phase d'organogenèse, l'embryon mène une vie libre dans le milieu aquatique. Les ébauches d'organes se sont modelées pour devenir des organes fonctionnels.

1.1.5. L'éclosion

L'éclosion s'effectue au bout de 50 heures environ après la fécondation. La larve continue d'épuiser ses réserves avant que ne s'ouvre la bouche au niveau du stomodeum. La larve mènera une vie aquatique libre aidée en cela par une respiration de type branchiale et la présence d'une région caudale différenciée en nageoire.

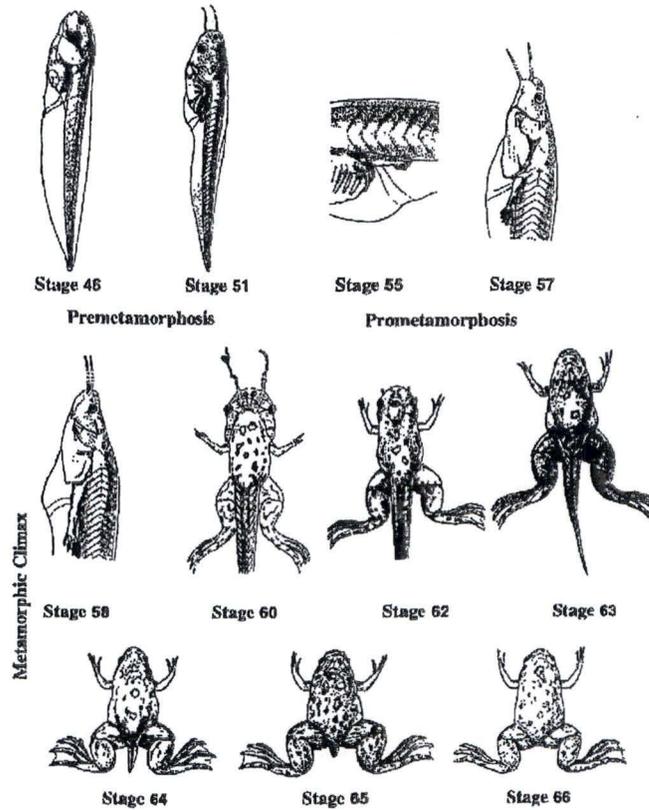


Figure I.1 : Représentation des étapes de développement des têtards de xénope *Xenopus laevis* selon Niewkoop and Faber 1956 (Shi, 1999).

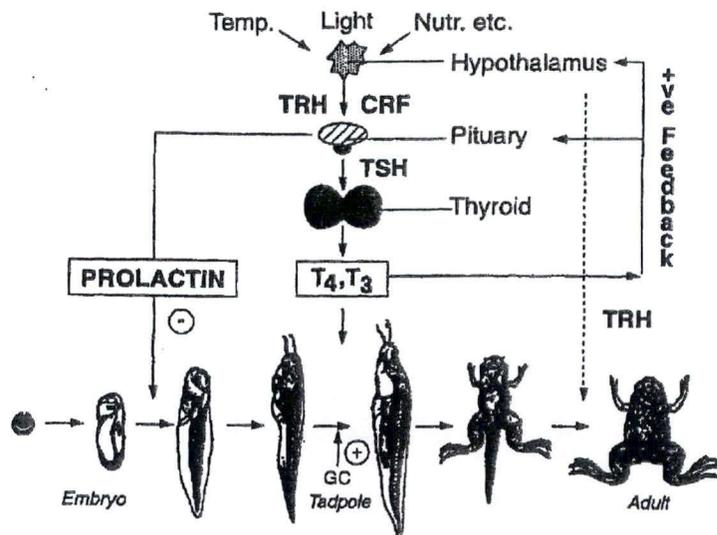


Figure I.2 : Représentation schématique de la régulation hormonale de la métamorphose des amphibiens : (+) stimulation, (-) inhibition. TH est indispensable pour initier et maintenir la métamorphose, son action est potentialisée par les glucocorticoïdes et retardée par la prolactine. Nutr. = facteurs nutritifs, TRH = thyrotropin-releasing hormone, CRF = corticotropin-releasing factor, TSH = thyroid stimulating hormone, GC = glucocorticoid hormone, T_4 = L-thyroxine, T_3 = triiodo-L-thyronine, (Tata, 1999).

1.1.6. Le contrôle du développement larvaire

L'embryogenèse se produit avant la formation d'une glande thyroïde fonctionnelle (stade 53). Les premiers stades du développement des amphibiens ne se trouvent pas sous le contrôle de l'hormone thyroïdienne. Deux agents inducteurs ont été mis en évidence. Le premier, de nature ribonucléoprotéique lié à des microsomes, induit le cerveau antérieur, les yeux et les narines et est appelé l'inducteur neuralisant. Le deuxième, de nature protéique, induit la corde, la musculature, les reins et les bourgeons des membres, et est appelé l'inducteur mésodermique.

1.2. La métamorphose

Le développement de l'œuf donne une larve fixe, puis une larve mobile : le têtard. Après un certain temps, ce dernier va subir un remaniement tissulaire appelé métamorphose : remplacement de la respiration branchiale par une respiration pulmocutanée, adaptation à la vie quadrupède, remaniement du tube digestif permettant le passage d'un régime herbivore à un régime carnivore. Cette métamorphose accompagne le passage de la vie dans l'eau à la vie hors de l'eau.

Chez les Anoures, elle est divisée en trois périodes spécifiques : la prémétamorphose, la prométamorphose et le climax (figure I.1).

1.2.1. Le contrôle hormonal de la métamorphose

La métamorphose suit un programme rigoureux mis en place par les hormones libérées dans le sang et qui font suite aux inducteurs embryonnaires.

Le développement des amphibiens est contrôlé par l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. Au sommet de cet axe, se trouve l'hypothalamus qui produit une substance stimulant l'adénohypophyse. Cette stimulation est médiée par l'amide tripeptide TRH (Thyrotropin-releasing hormone). La TRH existe chez les amphibiens, mais il semblerait que le CRF (Corticotropin-releasing hormone) stimule davantage la glande pituitaire que le TRH. Le CRF stimule la production par l'adénohypophyse de l'hormone thyrotrope appelé TSH (Thyroid-stimulating hormone ou thyrotropin) secrétée par les cellules-TSH (thyrotropes) de la 'pars distalis' (figure I.2).

Cette hormone hypophysaire stimule la glande thyroïde à produire la thyroxine (T4), précurseur de la triiodothyronine (T3). Cette dernière est obtenue par déiodation périphérique de la T4 et elle constitue l'hormone biologiquement active.

Comparé aux autres vertébrés, le développement des amphibiens anoures est peut-être celui qui dépend le plus de l'hormone thyroïdienne (TH). Le fait de bloquer la synthèse de TH endogène inhibe la métamorphose alors qu'un simple ajout de TH à des concentrations physiologiques dans l'eau de têtards en prémétamorphose induit des transformations précoces.

Au cours de la prémétamorphose (étapes 46-51), les quantités de T4 et de T3 dans le sang sont infimes. Cette synthèse minimale est assurée par l'activité autonome de la glande dans la mesure où les connexions vasculaires entre l'hypothalamus et l'hypophyse sont inexistantes et ne permettent pas de véhiculer le CRF.

En prométamorphose (étapes 54-58), les neurones hypothalamiques se développent et des axones sécrétant de la CRF se projettent sur l'éminence médiane et sur le système porte, tous

Tableau I.2: Liste nominative des Polluants Organiques Persistants (Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique, 2001)

Catégorie	Nom	Particularité
Production non-intentionnelle (sous-produit de réaction)	Dioxines Furannes Hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs) Hexachlorobenzène (HCB)	Sous-produits de combustion ou d'autres procédés industriels
	Produits chimiques industriels	Utilisés comme isolant électrique, fluide caloporteur, additif dans les peintures et plastiques
Pesticides	Hexachlorocyclohexane (HCH)	Produit intermédiaire de l'industrie chimique
	Hexachlorobenzène (HCB)	Utilisé dans la fabrication de munitions et de caoutchouc
	Hexachlorobenzène (HCB) Endrine Aldrine Dieldrine Toxaphène Mirex	Fongicide
	Chlordane Chlordécone Heptachlore DDT Lindane	Insecticide

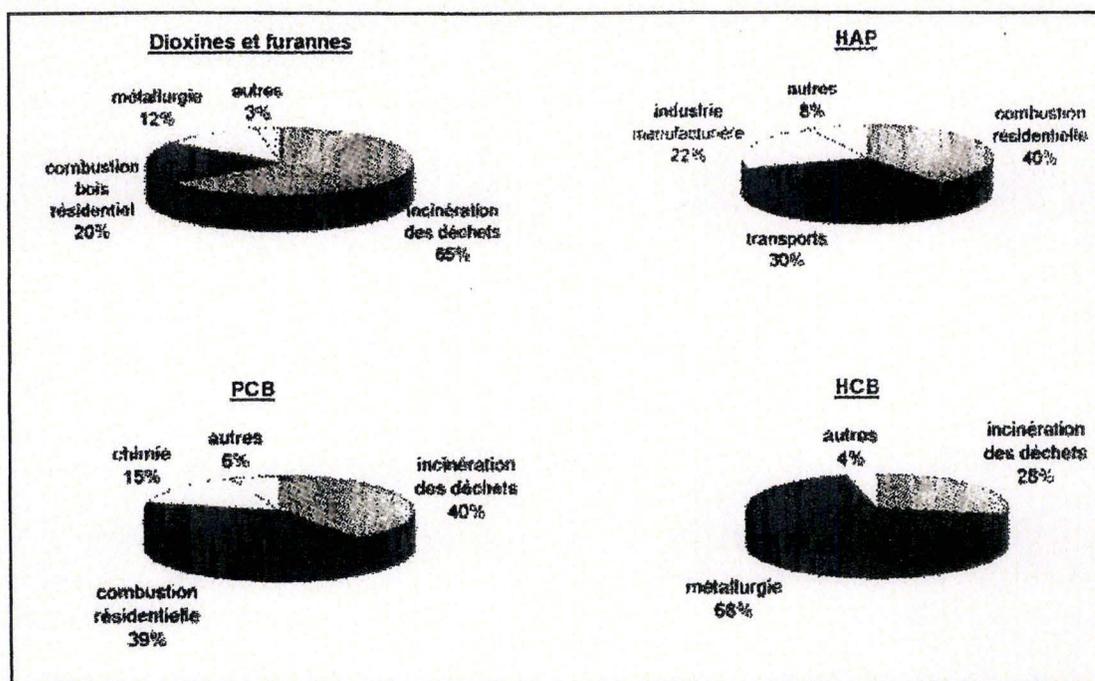


Figure I.3 : Principales sources d'émissions anthropiques concernant les POPs relevant d'émissions industrielles (Centre Interprofessionnel Technique d'Etude de la Pollution Atmosphérique, 2001)

deux bien différenciés. La quantité de T4 et de T3 augmente dans le plasma tout au long de la croissance et des changements morphologiques chez le têtard.

Finalement, lors du climax (étapes 58-66), les hormones thyroïdiennes sont à un pic de concentration maximale dans le sang ; le têtard arrête de s'alimenter et subit une métamorphose assez rapide. Quand cette dernière est terminée (étape 66), les niveaux plasmatiques de TH sont à des taux très bas.

Le développement larvaire et la métamorphose sont dépendants de divers facteurs externes, en particulier la température et la lumière qui contrôlent l'ontogenèse en modifiant l'activité de l'axe thyroïdienne. Certains composés environnementaux peuvent interférer et déréguler les taux d'hormones thyroïdiennes.

Il est connu depuis longtemps que les effets morphogénétiques de l'hormone thyroïdienne passent par un contrôle de la synthèse protéique au niveau de la transcription et de la traduction. Il existe dans le foie et probablement dans tous les tissus larvaires trois types de réponse génétique à l'hormone :

- ❖ la transcription de certains gènes est stimulée par la TH, via l'ARN polymérase 1. Ces gènes codent des protéines apparaissant *de novo* au climax (enzymes du cycle hépatique de l'urée, enzymes lysosomiales de la queue, protéines contractiles des pattes postérieures).
- ❖ la transcription d'autres gènes est au contraire inhibée. Il s'agit de gènes codant des protéines dont le taux de renouvellement diminue au cours de la métamorphose (protéines contractiles de la queue).
- ❖ certains gènes restent insensibles à l'hormone. Ils codent des protéines communes à la larve et à l'adulte

2) Les PolyChloroBiphényles

2.1. Introduction

On classe généralement les PolyChloroBiphényles PCBs dans le groupe des Polluants Organiques Persistants POPs (tableau I.2). Ces POPs induisent différents effets néfastes comme la dégradation du système immunitaire, la perturbation de la reproduction et du développement ainsi que des propriétés cancérogènes chez l'homme et la faune sauvage. D'une manière générale, les POPs proviennent de combustions incomplètes. Certains procédés industriels mettant en œuvre une étape de combustion (incinération de déchets, métallurgie, combustion,...) sont donc des émetteurs potentiels (figure I.3).

L'inventaire du Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) relate les valeurs d'émissions de POPs dans l'air en France Métropolitaine durant l'année 2004 :

- Dioxines et furannes : 191 g d'équivalent toxique TEQ par an
- Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Halogénés PAHs : 35 t
- PolyChloroBiphényles PCB : 98 kg
- Hexachlorobenzènes HCB : 1716 kg

Le **protocole d'Aarhus** a été signé en juin 1998 dans le cadre de la Convention de Genève sur la Pollution Transfrontalière Longue Distance, sous l'égide de la Commission Economique des Nations Unies pour l'Europe (CEE-NU). L'objet de ce protocole est de contrôler, de réduire ou d'éliminer les émissions de 16 des POPs dans l'environnement. Les POPs d'origine industrielle visés par ce texte sont les dioxines/furannes, les PolyChloroBiphényles (PCBs) et les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Halogénés HAPHS.

La **convention de Stockholm** a été signée en mai 2001 dans le cadre du Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE). L'objet de cette convention est de contrôler, de réduire ou d'éliminer les émissions de 12 de ces substances polluantes dans l'environnement. Les POPs d'origine industrielle visés par ce textes sont les dioxines/furannes, les PCBs et l'hexachlorobenzène (HCB).

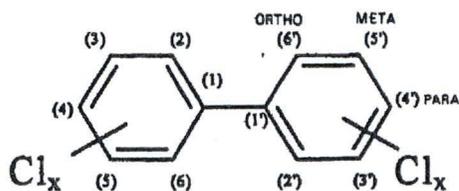


Figure I.4 : Structure chimique générale des PCBs (Thomé *et al.*, 2003)

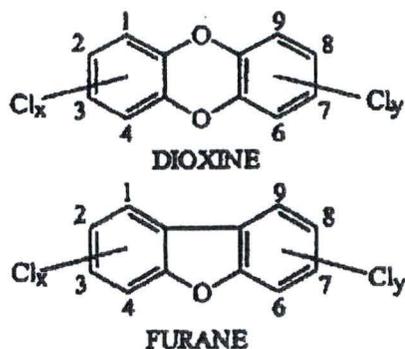


Figure I.5 : Structure chimique générale des dioxines et des furannes (Thomé *et al.*, 2003)

2.2. Les PolyChloroBiphényles (PCBs)

2.2.1. Historique concernant les PCBs

C'est à partir de 1929 que les PCBs ont commencé à se retrouver dans la production industrielle mondiale. Les PCBs ont toujours été disponibles sous forme de mixtures commerciales comportant des mélanges de composés de plusieurs congénères. Ces mélanges portent des noms différents en fonction du pays et de la firme qui les produit : Aroclor[®] (Monsanto, USA), Clophen[®] (Bayer, Allemagne), Kanechlor[®] (Kanegafuchi, Japon), Santotherm[®] (Mitsubishi, Japon), Phenoclor[®] et Pyralene[®] (Prodolec, France)¹.

Leur découverte dans l'environnement (dans les années 1960) fut le point de départ de nombreuses études concernant la dispersion des PCBs dans les divers écosystèmes ainsi que leurs effets néfastes sur les organismes vivants. Suite à ces révélations, l'utilisation des PCBs fut progressivement réglementée. L'Allemagne (1972) et le Japon (1973) suivis des Etats-Unis (1979) commencèrent à réglementer et à limiter l'usage des PCBs. Leur utilisation est uniquement autorisée dans les systèmes clos : transformateurs et condensateurs. Jusque là, approximativement un total de 23000 tonnes de PCBs avaient été utilisés dans les systèmes ouverts (peintures, matériaux plastiques). En 1985, l'Union Européenne suivit ces réglementations et toute nouvelle installation utilisant ces produits fut proscrite. Deux textes internationaux majeurs ont fait leur apparition : le protocole d'Aarhus et la convention de Stockholm (détail dans l'encadré en vis-à-vis). Suivant la directive européenne (Directive 96/59/EC), l'utilisation des PCBs devrait être interdite à partir de 2010 (voir en annexe 1: la législation communautaire en vigueur concernant les dioxines et les PCBs).

2.2.2. Composition et structure

Les PCBs sont des organochlorés classés dans la catégorie des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques Halogénés. Chaque molécule de PCB est constituée d'un noyau biphenyle sur lequel sont fixés entre un et dix atomes de chlore (figure I.4). Au total, 209 molécules de PCBs différentes et appelées congénères peuvent être dénombrées. Selon le nombre et la position des substituants chlorés, les PCBs présentent des caractéristiques physico-chimiques variables et leur action au sein de systèmes biologiques en est donc modifiée. Il existe trois types de position de substitution : ortho (2,2',6 et 6'), méta (3,3',5 et 5') et para (4 et 4'). D'une part, les congénères qui ne présentent aucune substitution en position ortho (non-ortho) et ceux qui ne possèdent qu'une seule molécule de chlore en position ortho (mono-ortho) sont susceptibles d'adopter une configuration coplanaire. D'autre part, les congénères qui possèdent deux molécules de chlore ou plus en position ortho provoquent un encombrement stérique qui empêche la coplanarité de la molécule et lui donne un aspect globulaire. En terme de toxicité, les congénères les plus dangereux semblent être ceux qui possèdent une configuration coplanaire avec des substitutions en position méta et para. Les 209 congénères sont numérotés en fonction du nombre croissant d'atomes de chlore substitués. Ces nombres sont attribués selon les règles de nomenclature IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*).

Les PCBs peuvent également être les précurseurs des dioxines et des furannes, notamment s'ils sont chauffés à 300°C en présence de métaux (catalyseurs). Les dioxines et les furannes sont des molécules constituées de deux noyaux benzéniques reliés entre eux par respectivement deux et un atome d'oxygène (figure I.5). La molécule la plus toxique est sans

¹ (http://www.chem.unep.ch/pops/POPS_Inc/proceedings/bamako/eng/FIEDLER1.html)

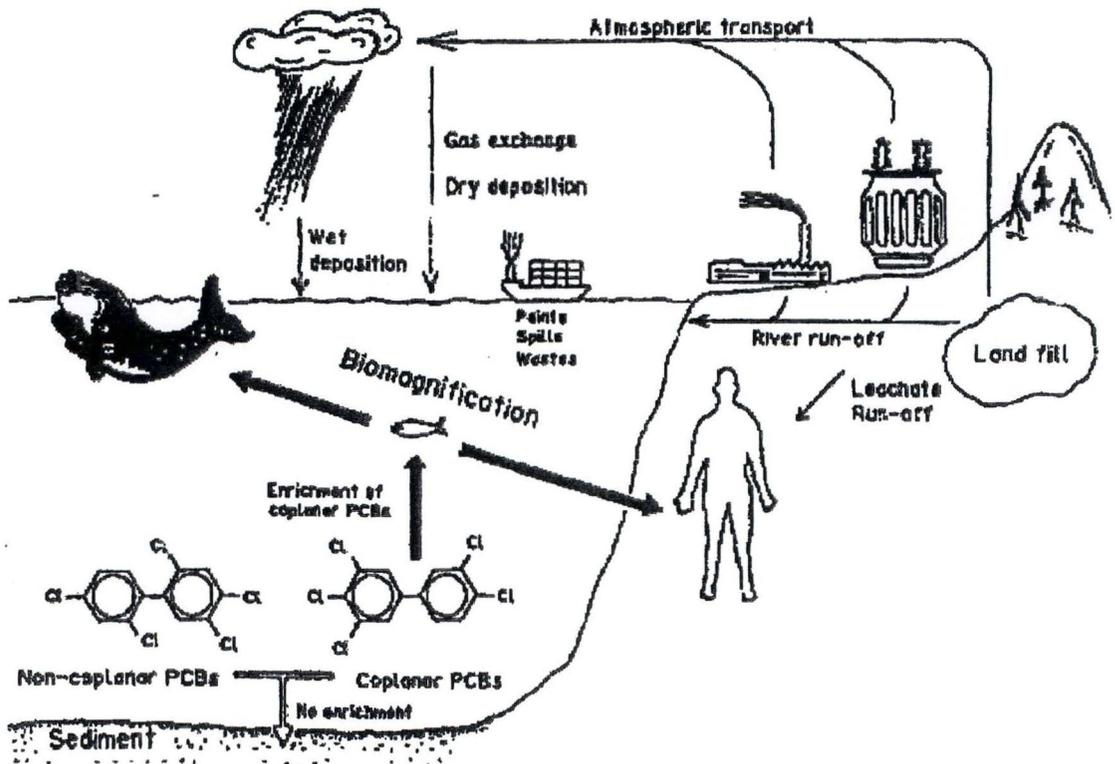


Figure I.6: Cycles des PCBs dans l'environnement (<http://w3.umh.ac.be/~ichim/docs/99-04/99-04.html>)

aucun doute la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-para-dioxine (2,3,7,8-TCDD) ou dioxine de Seveso (Van den Berg *et al.*, 1998).

2.2.3. Propriétés physico-chimiques et utilisations

Les PCBs présentent une faible hydrosolubilité, une faible pression de vapeur, une grande stabilité thermique (jusque 1300°C), une forte résistance aux agents chimiques (acides et bases), une faible conductivité électrique ainsi qu'une faible capacité à s'enflammer. Cela en fait d'excellents agents isolants.

Les caractéristiques physico-chimiques des PCBs combinées à leur faible coût en ont fait des composés largement utilisés dans l'industrie à partir des années 1920.

Ces utilisations sont diverses : fluides diélectriques dans des transformateurs et des condensateurs, agents de transfert, diluants organiques, additifs dans les peintures, les plastiques et les teintures, agents dépoussiérants, étendeurs de pesticides, résines synthétiques,... (Safe, 1994).

Les PCBs sont très résistants à la biodégradation et à la métabolisation. Le caractère hautement lipophile des PCBs explique leur comportement dans le milieu naturel car ils s'accumulent dans la fraction lipidique des organismes vivants et se concentrent le long des chaînes alimentaires à des concentrations supérieures à celles retrouvées dans l'environnement. L'élimination des PCBs par un organisme vivant est très lente. Notons que des variations importantes existent entre les différents congénères, les PCBs les plus chlorés étant les plus lentement éliminés.

2.2.4. Transport des PCBs et bioaccumulation

La contamination des PCBs dans l'environnement provient exclusivement des activités humaines. Une fois relargués dans l'environnement, les PCBs sont transportés dans l'écosystème global du fait de leur stabilité. Ce transport peut prendre différentes voies : l'air, l'eau, les poissons et les oiseaux sont les transporteurs les plus fréquents (figure I.6).

Dans l'eau, les PCBs se retrouvent surtout au niveau des sédiments. Cela est dû à leurs propriétés physicochimiques qui leur confèrent une grande adsorption sur les matières particulaires. Les PCBs peuvent être remis en suspension dans la colonne d'eau à partir des sédiments lors de désorption lente surtout quand les concentrations en PCBs sont élevées ou lors d'activités hydrographiques (inondations ou draguage). Dans l'atmosphère, les PCBs circulent grâce à des transports aériens et des échanges peuvent se faire avec le milieu aquatique².

Dans la colonne d'eau, les PCBs ont tendance à être absorbés dans les lipides des petits organismes tels que le plancton, ce qui leur permet d'entrer au niveau trophique le plus bas. A mesure que l'on monte dans les maillons de la chaîne trophique, les contaminants tels que les PCBs cheminent également le long de cette chaîne. Cette augmentation incessante de concentrations de contaminants dans les tissus animaux d'un niveau trophique à l'autre s'appelle « bioamplification ». Par exemple, les oiseaux piscivores tels que le Goéland argenté *Larus argentatus*, la Sterne caspienne *Sterna caspia* ou encore le Grand cormoran *Phalacrocorax carbo* sont des prédateurs qui se situent au sommet des Grands Lacs ; ils consomment presque exclusivement du poisson et d'autres éléments de la chaîne alimentaire

² (<http://w3.umh.ac.be/~ichim/docs/99-04/99-04.html>)

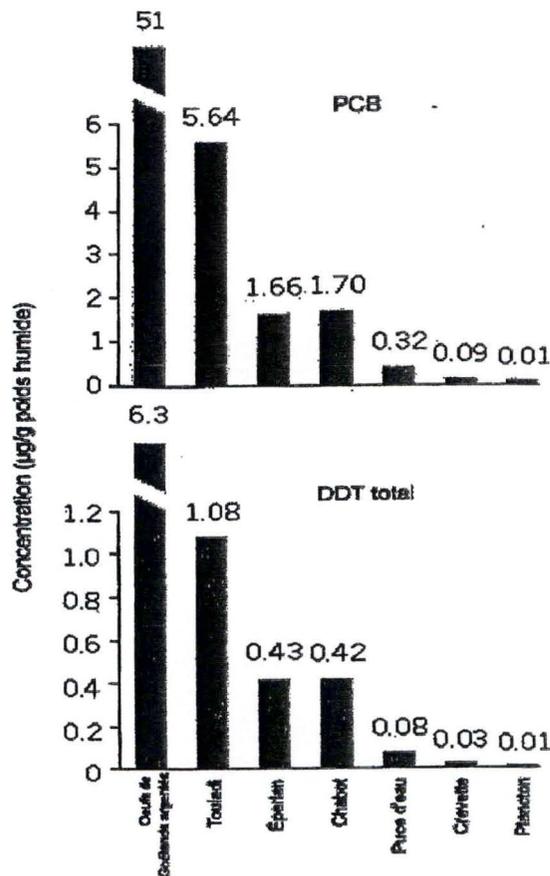


Figure I.7 : Concentrations en PCBs et DDTs ($\mu\text{g/g}$ poids humide) dans les différents maillons de la chaîne trophique des Grands Lacs (<http://www.on.ec.gc.ca/>).

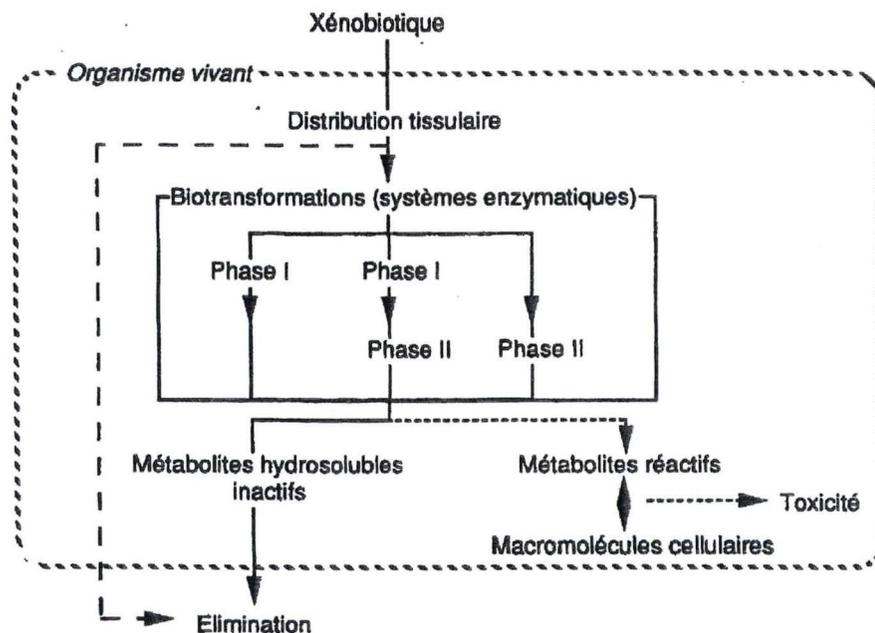


Figure I.8: Schéma général du devenir d'un xénobiotique dans l'organisme (Lagadic *et al.*, 1997).

des Grands Lacs³. Ces espèces accumulent également les plus fortes concentrations de produits chimiques toxiques tels que les PCBs et le DDE (figure I.7).

2.3. La toxicité des PCBs

2.3.1. La distribution dans le corps

A. Voie d'entrée des PCBs

Chez les mammifères marins et les animaux terrestres, le tractus gastro-intestinal est la voie majeure d'entrée des xénobiotiques, tandis que chez les poissons et les invertébrés aquatiques, c'est à travers les branchies et la peau perméable que les polluants organiques pénètrent dans le corps. Les molécules liposolubles telles que les PCBs sont principalement transportées à travers l'épithélium intestinal via une diffusion passive pour ensuite gagner le flux sanguin (Walker *et al.*, 1992).

B. Le stockage

Les principaux transporteurs de PCBs dans le plasma sont les lipoprotéines et l'albumine. De part leur caractère lipophile, les PCBs, et surtout les congénères hautement chlorés, ont tendance à s'accumuler dans les tissus riches en lipides. On les retrouve en grandes quantités dans les tissus adipeux, le foie, la peau et le lait (Debier *et al.*, 2004). Les muscles, qui occupent une grande proportion du corps, constituent également une réserve de PCBs. Un transfert maternel des PCBs aux œufs peut se produire chez les amphibiens (Kadokami *et al.*, 2004).

C. Excrétion

L'urine et la bile constituent les principales voies d'excrétion de xénobiotiques. En général, il semble que les polluants hautement lipophiles (PCBs) soient faiblement excrétés et peuvent rester dans le corps des animaux de nombreuses années (Safe, 1994). Pour les congénères hautement chlorés, la route principale d'excrétion est la bile. En ce qui concerne les congénères faiblement chlorés, ils sont surtout éliminés via l'urine, après avoir subi au préalable une métabolisation en des molécules plus polaires.

Certains composés peuvent également être passivement éliminés, non métabolisés, en association avec le passage d'autres substances du corps. Cette élimination passive se fait par les œufs et le lait qui sont sécrétés en grande quantité et sont riches en lipides .

2.3.2. Modes d'action des PCBs

A. Métabolisation

Après leur pénétration dans les organismes, les polluants organiques, dont les PCBs, subissent le plus souvent des transformations métaboliques encore appelées biotransformations. Elles sont catalysées par différents systèmes enzymatiques capables de prendre en charge des substrats de nature variée (figure I.8). Ces biotransformations peuvent modifier considérablement la réactivité biologique des composés métabolisés. Toutes ces enzymes augmentent l'hydrosolubilité des molécules qu'ils prennent en charge afin d'en faciliter

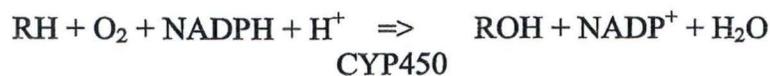
³ (<http://www.on.ec.gc.ca/>)

l'élimination de l'organisme. L'organe le plus impliqué dans la métabolisation des xénobiotiques est le foie. Le métabolisme des xénobiotiques se déroule en deux phases desquelles résultera la formation d'une molécule plus polaire. Ces réactions sont catalysées par des enzymes microsomaux que l'on retrouve dans le reticulum endoplasmique lisse (Lagadic *et al.*, 1997).

• Réactions de phase I

Les molécules aromatiques telles que les PCBs subiront principalement des hydroxylations. La majorité des réactions de phase I sont catalysées par un système enzymatique, le système cytochrome P450 mono-oxygénase, aussi appelé M.F.O. 'mixed function oxidase'.

Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines ayant un maximum d'absorption lumineuse à 450 nm. Elles sont responsables du métabolisme oxydatif d'une grande variété de composés incluant aussi bien les xénobiotiques que des composés endogènes (stéroïdes, vitamines,...). Le cytochrome P450 est un des éléments d'un complexe multienzymatique de transfert d'électrons situé dans le reticulum endoplasmique lisse. Les électrons du NADPH sont transférés via une flavoprotéine, la NADPH-cytochrome P450-réductase (RED), au cytochrome P450. Ce dernier insère, à partir de la molécule d'oxygène, un atome d'oxygène dans le substrat et réduit le second atome d'oxygène pour former de l'eau selon la réaction suivante :



Cette réaction se produit selon un cycle catalytique décomposable en plusieurs étapes (figure I.9).

Les différentes formes de cytochrome P450 constituent une « superfamille » d'enzymes. Les différentes formes se différencient les unes des autres au niveau de leur partie protéique. Les cytochromes P450 impliqués dans le métabolisme de composés endogènes (comme les hormones stéroïdes) ont la plupart du temps une spécificité importante vis-à-vis de leur substrat. Ceci est moins vrai pour les cytochromes P450 responsables du métabolisme des xénobiotiques. Néanmoins chacun des cytochromes P450 reste orienté préférentiellement vers un type de substrat, comme par exemple des molécules polycycliques planes pour le cytochrome P450 1A1 (Lagadic *et al.*, 1997).

• Réactions de phase II

Ces réactions transforment les métabolites de phase I en des molécules plus hydrophiles qui subissent l'excrétion. Les principales réactions de phase II sont des conjugaisons. Elles impliquent l'addition de groupes polaires endogènes aux molécules qui proviennent de la phase I. Les enzymes de la phase II incluent la glutathion S-transférase (GST), la sulfotransférase, l'époxide hydroxylase et la UDP glucuronoyl transférase.

B. Le récepteur Ah et le phénomène d'induction du cytochrome P4501A1

L'induction d'un cytochrome P450 par un micropolluant a pour résultat d'augmenter la présence de celui-ci dans l'organisme contaminé. Dans le cas du CYP4501A1, cette augmentation résulte de l'activation de la transcription du gène en un ARNm dont la traduction aboutit à la protéine qui, une fois associée au groupement hémique, pourra catalyser de façon accrue le métabolisme des substrats correspondants.

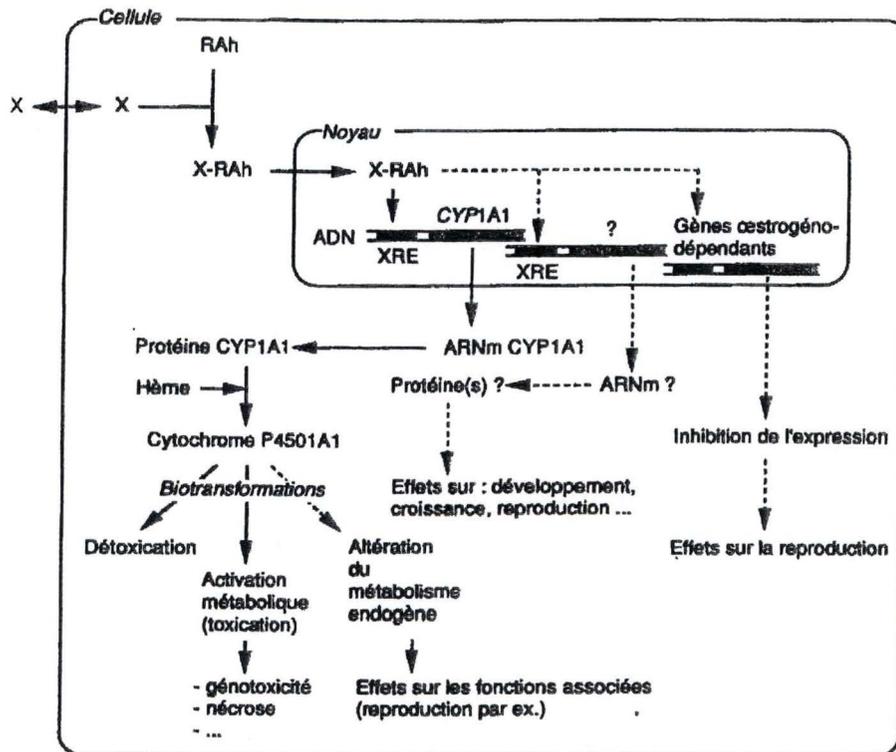


Figure I.11 : Perspectives écotoxicologiques de l'induction du cytochrome P450 1A1 par les xénobiotiques (X). (Stegeman et Hahn, 1994 dans Lagadic *et al.*, 1997)

L'induction de la sous famille 1A1 survient suite à la fixation de l'inducteur à un récepteur cytosolique, le récepteur Ah (Aryl hydrocarbon) (figure I.10). Suite à cette interaction, un processus de transformation, incluant la dissociation d'une protéine de stress (HSP90), est initié. Un hétérodimère actif au niveau de la transcription est formé par association du complexe xénobiotique-récepteur avec une protéine, l'ARNT (Ah Récepteur Nuclear Translocator). Le complexe est ensuite transporté dans le noyau cellulaire où il interagit avec une séquence spécifique de l'ADN : le XRE (Xenobiotic Response Element). Cette séquence est située à proximité de la région promotrice du gène codant pour le CYP450 1A1. La transcription de ce gène est initiée et se traduit par une augmentation de l'activité catalytique du CYP450 1A1 (van der Oost *et al.*, 2003).

L'expression du CYP450 1A1 est induite de manière importante suite à l'exposition à la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin (2,3,7,8 TCDD), aux polychlorobiphényles coplanaires, et aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, un ensemble de composés considérés comme à haut risque écotoxicologique (Lagadic *et al.*, 1997).

Roy *et al.* (2002) ont montré qu'une contamination expérimentale aux PCBs et au benzo(a)pyrène provoquait une augmentation significative de l'expression du cytochrome P4501A1 chez des larves de *Microgradus tomcod* par rapport aux organismes contrôlés. Ces mêmes auteurs ont également montré que des juvéniles de *Microgradus tomcod* âgés de cinq à huit mois et provenant de l'Hudson River exhibaient des niveaux élevés d'expression du CYP 1A1 hépatique par rapport à des sites de référence non contaminés. Cela correspond à la descente des juvéniles dans la partie benthique et le début d'un nourrissage par ingestion de proies benthiques contaminées par des polluants organochlorés.

C. Perspectives écotoxicologiques de l'induction du CYP450

L'induction du cytochrome P450 pourrait être le reflet d'une capacité d'adaptation à court terme des organismes aux fluctuations de la qualité chimique du milieu (métabolisation facilitant l'élimination des polluants). Mais cette induction peut aussi être mise en relation avec des processus toxicologiques. Un nombre important de données suggère l'existence de relations entre l'induction du cytochrome P4501A1 et l'altération du métabolisme de molécules endogènes essentielles comme les stéroïdes et la perturbation de différentes fonctions (figure I.11). En effet, l'induction du CYP450 peut être responsable de l'activation métabolique (bioactivation du composé) de certains composés (Lagadic *et al.*, 1997).

Il est fort probable que certaines des réponses toxiques des mixtures de PCBs soient médiées par les métabolites hydroxylés. Ces derniers pourraient se lier de façon compétitive avec les récepteurs à oestrogènes. L'interaction d'un polluant avec le récepteur Ah induirait, en plus de l'expression du gène CYP4501A1, l'activation de gènes pléiotropes encore inconnus codant pour la synthèse de protéines responsables d'effets touchant le système immunitaire, la croissance, le développement,....

D. L'approche d'équivalence toxique (TEQ)

Le concept de facteur d'équivalence de toxicité ou *toxic equivalent factor* (TEF) est appliqué aux effets toxicologiques pouvant être reliés à une affinité pour le récepteur Ah. Dans le cadre de cette démarche, la 2,3,7,8-TCDD sert de référence (TEF=1), et un facteur d'équivalence est calculé pour chaque autre composé sur la base de l'intensité des effets Ah-dépendants qu'il produit, comparés à ceux de la 2,3,7,8-TCDD (Safe, 1994 ; Van den Berg *et al.*, 1998).

Tableau I.3 : Facteur d'équivalence de toxicité (TEF) des dioxines et des furannes chez les poissons, oiseaux et mammifères (valeurs proposées par l'OMS en 1997)

Congénère	TEF		
	Mammifères	Poissons	Oiseaux
Famille des PCDD			
2,3,7,8- TetraCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	1	0.5	1
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0.1	0.5	0.05
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	0.1	0.01	0.01
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	0.1	0.01	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.01	0.001	<0.001
OctaCDD	0.0001	<0.0001	0.0001
Famille des PCDF			
2,3,7,8-TetraCDF	0.1	0.05	1
1,2,3,7,8-PentaCDF	0.05	0.05	0.1
2,3,4,7,8-PentaCDF	0.5	0.5	1
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	0.1	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	0.1	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	0.1	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	0.1	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0.01	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDD	0.01	0.01	0.01
OctaCDF	0.0001	<0.0001	0.0001

Tableau I.4: Facteur d'équivalence de toxicité (TEF) des PCBs non- et mono-ortho chez les poissons, oiseaux et mammifères (valeurs proposées par l'OMS en 1997)

Congénères PCBs	N° IUPAC	Poissons	Oiseaux	Mammifères
<i>PCBs non ortho</i>				
3,3',4,4'-	77	0,0001	0,05	0,0001
3,4,4',5'-	81	0,0005	0,1	0,0001
3,3',4,4',5'-	126	0,005	0,1	0,1
3,3',4,4',5,5'-	169	0,00005	0,001	0,01
<i>PCBs mono-ortho</i>				
2,3,3',4,4'-	105	<0,000005	0,0001	0,0001
2,3,4,4',5'-	114	<0,000005	0,0001	0,0005
2,3',4,4',5'-	118	<0,000005	0,00001	0,0001
2',3,4,4',5'-	123	<0,000005	0,00001	0,0001
2,3,3',4,4',5'-	156	<0,000005	0,0001	0,0005
2,3,3',4,4',5'-	157	<0,000005	0,0001	0,0005
2,3',4,4',5,5'-	167	<0,000005	0,00001	0,00001
2,3,3',4,4',5,5'-	189	<0,000005	0,00001	0,0001

Pour chaque congénère, la valeur attribuée au TEF dépend de la classe phylogénétique de l'organisme considéré (tableau I.3).

La contribution de chaque composé à la toxicité totale de la mixture (TEQ du composé) est déterminée en multipliant la concentration du composé par son TEF. Les TEQs pour les composés individuels peuvent être additionnés pour donner Σ TEQ, l'équivalence toxique pour la mixture totale (Lagadic *et al.*, 1997).

Les PCBs mono-ortho et non-ortho, de part leur configuration coplanaire, présentent une structure et des propriétés proches de celles de la 2,3,7,8-TCDD et sont par conséquent appelés PCBs « *dioxin-like* ». Les TEF obtenus pour ces congénères permettent de calculer le TEQ global pour l'activité des composés « *dioxin-like* » (tableau I.4).

E. Les catégories de PCBs

Selon le type de P450 qu'ils induisent, les PCBs peuvent être divisés en trois catégories principales : MC-type, PB-type et '*mixed-types*' (Safe 1994). Les activités enzymatiques spécifiques au P450 sont, parmi d'autres, l'EROD ou l' 'Aryl Hydrocarbon Hydroxylase' (AHH). Les molécules de type MC induisent le P450 1A1 et 1A2 et sont considérées comme étant les congénères les plus toxiques. Les molécules de type PB induisent P-450 2B1, 2B2 et 3A et sont considérées comme moins toxiques. Les congénères qui présentent à la fois le type MC- et PB- sont appelées des inducteurs '*mixed-type*'. Les mixtures commerciales PCB comme l'Aroclor 1254 et 1260 sont classifiées comme des inducteurs '*mixed-type*' (Safe 1994).

3) Notion de stress oxydant

Le stress oxydant a été défini par Sies (1991) comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et source d'effets toxiques potentiels. Pour Halliwell (1987), le stress oxydant implique la production d'espèces réactives de l'oxygène et est synonyme de dommages (Sies, 1991 et Halliwell, 1987 dans Lagadic *et al.*, 1997).

La formation d'espèces réactives est consécutive à la métabolisation de substances exogènes. Par un mécanisme de déshalogénéation réductrice catalysée par le cytochrome P4501A1, les dérivés halogénés, dont font partie les PCBs, peuvent générer des métabolites radicalaires qui sont à l'origine de la peroxydation lipidique.

3.1. Formation des espèces réactives à l'oxygène

Le terme d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) inclut les différentes formes actives de l'oxygène et les hydroperoxydes, ainsi que les espèces radicalaires qui peuvent en être les initiateurs (Lagadic *et al.*, 1997). Les espèces radicalaires sont des molécules qui présentent un ou plusieurs électrons célibataires. Ces électrons sont des facteurs d'instabilité et de réactivité. Leur réactivité peut être à l'origine d'effets biologiques néfastes (inflammation, cancérogenèse et vieillissement cellulaire).

Dans les milieux biologiques, les molécules réactives peuvent attaquer les constituants cellulaires (protéines, lipides, polysaccharides, acides nucléiques et hydrates de carbone) et entraîner une déstructuration et un dysfonctionnement des systèmes au niveau desquels ils interviennent.

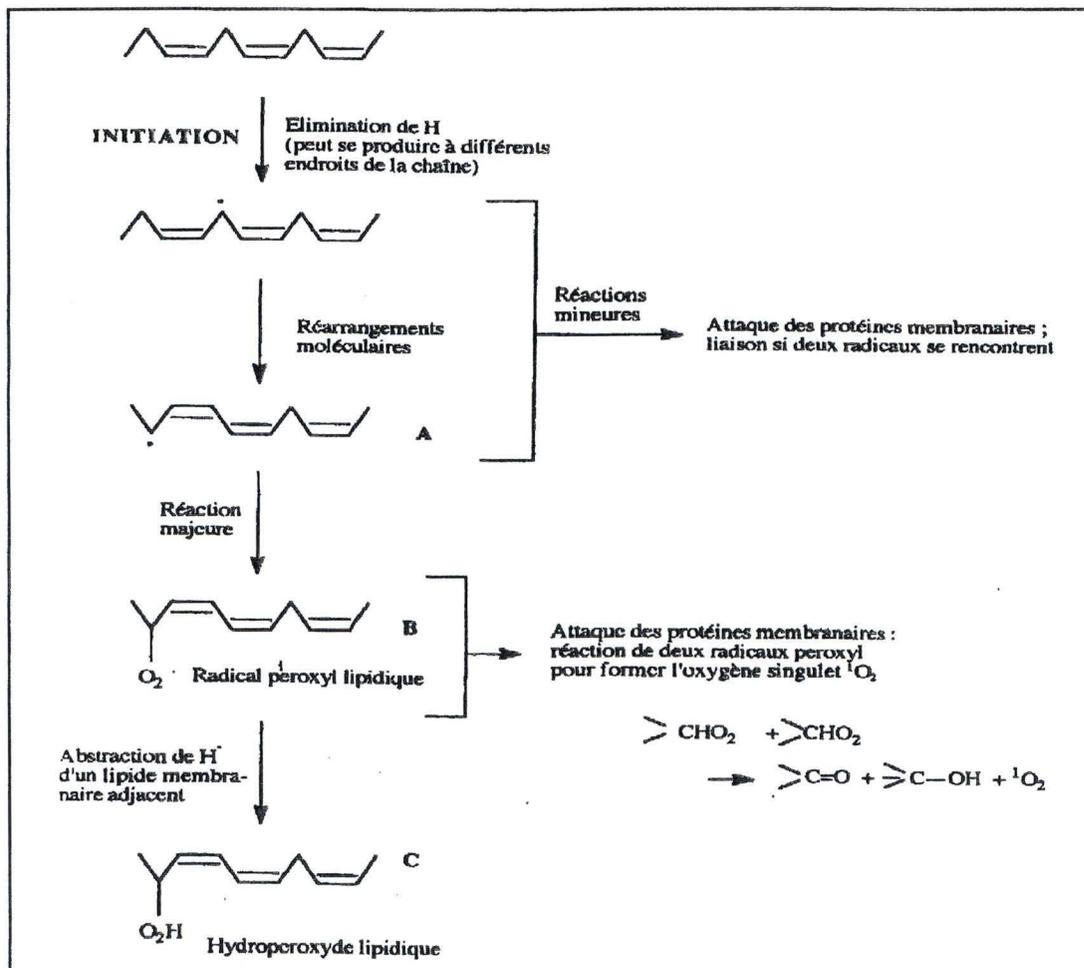


Figure I.12 : Mécanisme de la lipoperoxydation (d'après Gutteridge et Halliwell, 1990 dans Lagadic et *al.*, 1997). La peroxydation des lipides membranaires peut être initiée par l'attaque des acides gras insaturés des phospholipides par toute molécule suffisamment réactive pour leur arracher un atome d'hydrogène. Le départ de l'hydrogène laisse un carbone avec un électron impair. Ce radical carboné des acides gras polyinsaturés tend à se stabiliser par réarrangement interne en donnant un diène conjugué qui réagira avec O_2 pour donner un radical hydroperoxy.

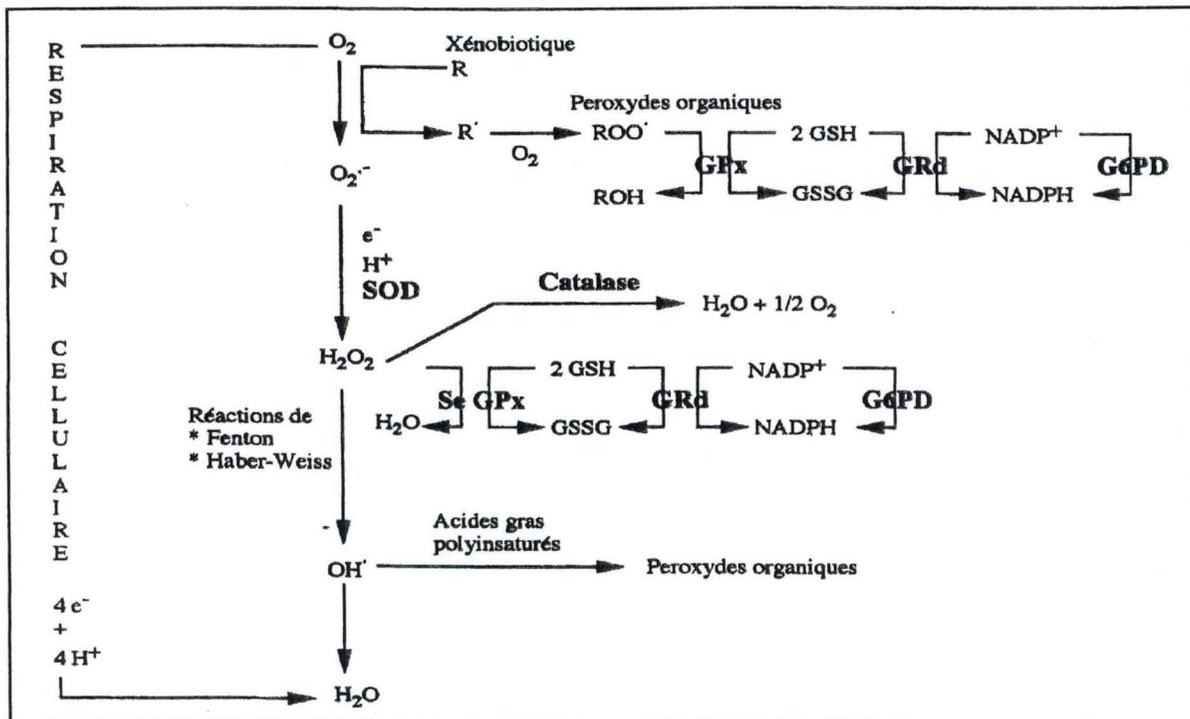


Figure I.13 : Intervention des systèmes antioxydants dans la neutralisation des espèces réactives d'origine exogène et endogène dans les cellules animales (Lagadic *et al.*, 1997)

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

- **l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$** : par sa durée de vie relativement longue et son caractère diffusible, cet oxygène singulet peut être responsable de graves dommages cellulaires et en particulier à l'ADN.
- **l'anion superoxyde O_2^-** : très stable en milieu hydrophobe, il contribue à la destruction des phospholipides membranaires par attaque nucléophile des liaisons esters entre les acides gras et le cholestérol. Il se dismute en donnant du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ; cette réaction de dismutation est fortement accélérée en présence des superoxydes dismutases.
- **le peroxyde d'hydrogène H_2O_2** : est formé par dismutation de l'anion superoxyde et par addition d'un second électron sur l'anion superoxyde en donnant l'ion peroxyde O_2^{2-} . Cet ion est protoné immédiatement en H_2O_2 dans les conditions de pH physiologique. Le peroxyde d'hydrogène est modérément réactif, mais il est très diffusible et franchit les barrières membranaires.
- **le radical hydroxyle OH^\bullet** : le radical hydroxyle est extrêmement réactif. Il peut attaquer tous les types de constituants cellulaires.
- **les hydroperoxy radicaux** : sont produits lors de la peroxydation lipidique (figure I.12). Les radicaux hydroperoxyl formés pourront eux-mêmes arracher l'hydrogène d'autres molécules lipidiques, qui radicalisées à leur tour, réagiront de proche en proche et propageront le processus de la peroxydation lipidique.

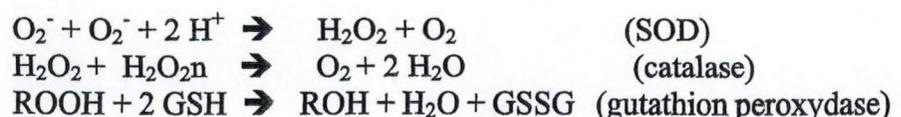
3.2. Sources des ROS et systèmes de défense

Les réactions radicalaires jouent un rôle important dans les systèmes biologiques car elles interviennent dans les réactions métaboliques normales et dans la production d'énergie. La production d'oxyradicaux peut être augmentée par l'induction des CYP450.

Qu'ils soient physiologiquement utiles ou fortuits, ces processus doivent être étroitement contrôlés en fonction des besoins, et canalisés pour éviter tout dommage cellulaire.

3.2.1. Systèmes enzymatiques

Trois types d'enzymes antioxydantes majeures sont mis en œuvre pour la destruction des ROS : les superoxydes dismutases (SOD), les peroxydases et les catalases (figure I.13). Ces enzymes agissent de manière coordonnée selon les réactions suivantes :



- les **superoxydes dismutases (SOD)** regroupent les métalloenzymes qui sont capables de dismuter l'anion superoxyde. Ces enzymes sont présentes dans le compartiment cytosolique et ont été détectées dans les peroxysomes, les lysosomes et le noyau des cellules eucaryotes.
- les **glutathions peroxydases** catalysent la réduction glutathion-dépendante de nombreux peroxydes, allant du peroxyde d'hydrogène aux peroxydes organiques.
- le maintien d'une activité glutathion peroxydase implique le recyclage NADPH-dépendant du glutathion réduit (GSH) par une **glutathion réductase**, le NADPH étant produit par la voie des pentoses phosphates.

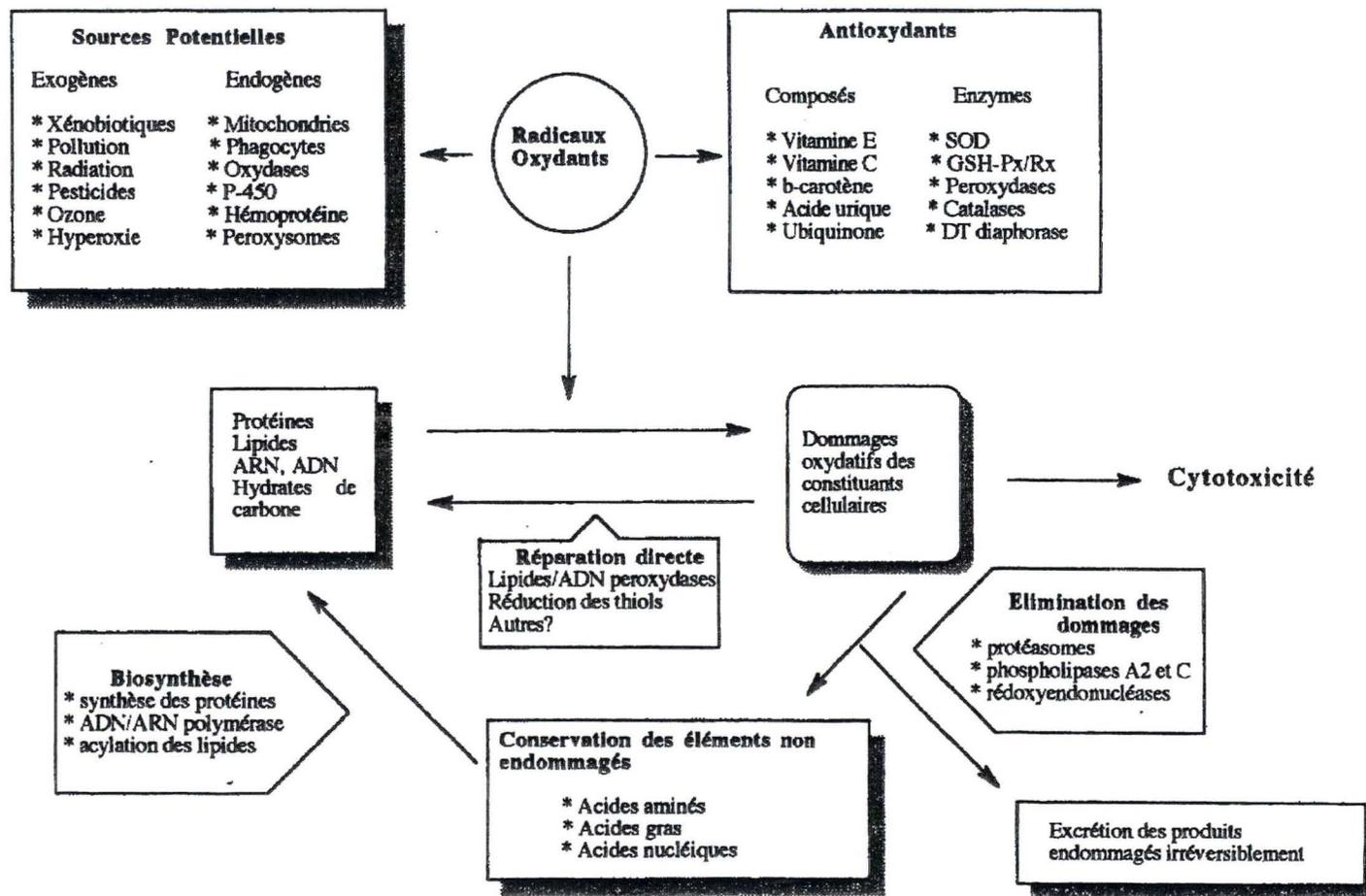


Figure I.14 : Principaux effets biologiques des espèces réactives de l'oxygène et systèmes de défense antioxydants (Lagadic *et al.*, 1997)

- la **catalase** est une hémoprotéine tétramérique (240000 daltons) avec un atome de fer par sous-unité. Cette enzyme catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

3.2.2. Systèmes non enzymatiques

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

- le **glutathion** est le thiol le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules ; une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un stress oxydant. Il agit comme donneur d'électrons permettant de désactiver les espèces réactives mais surtout comme substrat des glutathions peroxydases pour la réduction des peroxydes. Hilscherova *et al.*, (2003) ont démontré qu'in ovo, une exposition au TCDD chez des poulets *Gallus domesticus*, pouvait induire une augmentation dans le rapport glutathione oxydée sur glutathione réduit.
- l'**acide lipoïque** est capable de réduire le glutathion et les radicaux peroxydes, et de désactiver l'oxygène singulet
- divers capteurs d'oxyradicaux -**vitamines E, A**- existent au sein des membranes biologiques pour piéger les espèces radicalaires dès leur formation, interrompre les réactions en chaîne et empêcher la lipoperoxydation.

Un **stress oxydant** sera induit lors de la surproduction d'espèces réactives et/ou par suite de l'inhibition des systèmes antioxydants qui peuvent être inactivés, soit directement, soit par défaut de synthèse. Par exemple, des composés comme le diéthylmaléate (DEM) ou le diamide, inhibent le glutathion en bloquant la fonction thiol libre de la molécule. Ils sont à l'origine d'un stress oxydant par déficit en glutathion.

Les ROS, lorsqu'elles sont générées en des quantités qui excèdent les capacités des systèmes de protection et de réparation, peuvent exercer leurs effets négatifs sur l'ensemble des constituants cellulaires (figure I.14).

La lipoperoxydation est mise en évidence par la mesure de la concentration en malondialdéhyde (MDA), produit terminal de la dégradation des lipides par spectrophotométrie du complexe coloré formé avec l'acide thiobarbiturique. Les systèmes antioxydants étudiés sont principalement l'activité des systèmes enzymatiques (superoxydes dismutases, peroxydases, glutathion réductase et catalase) et les teneurs en glutathion réduit et oxydé (Lagadic *et al.*, 1997).

3.3. Biomarqueurs de stress oxydant chez les animaux aquatiques

3.3.1. Activités antioxydantes endogènes chez les animaux aquatiques

Qualitativement, les organismes aquatiques apparaissent dotés des mêmes systèmes antioxydants que les mammifères. Les activités enzymatiques (SOD, catalase, glutathion peroxydases) et les teneurs en antioxydants (glutathion réduit et oxydé, acide ascorbique,...) chez le xénope *Xenopus laevis*, la grenouille commune *Rana temporaria* et la truite *Trutta trutta* sont 5 à 10 fois plus faibles que chez les mammifères selon les paramètres considérés et selon les tissus étudiés (foie, poumon, branchies et cerveau) (Perez-Campo *et al.*, 1993).

Tableau I.5 : Modifications d'activité ou de concentration de paramètres antioxydants et du malondialdéhyde de poissons ou de bivalves exposés à des composés organiques lors d'expérimentations en laboratoire (tableau adapté de Lagadic *et al.*, 1997).

Espèce étudiée	Substance étudiée	Conc. (mg/l)	Durée d'exposition	SOD	GPx	CAT	MDA	GSH+GSSG
Poisson marin <i>Micropogonias undulatus</i>	Aroclor 1254	0,5 mg/g nourriture	17 jours		+ (f,o)		= (f) ++ (o)	= (b)
Bivalve marin <i>Mytilus Edulis</i>	BaP	0,05	6 jours	=	=	=	=	
Bivalve marin <i>Mytilus edulis</i>	CCl4	1	6 jours				++	=
Poisson eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	DEF n-butylmercaptan(nBM)	DEF: 1 à 40% de la CL50 NBM : 7 à 45% de la CL50	21 jours	=	=	=	=	=
Bivalve marin <i>Mytilus edulis</i>	Ménadione	1	6 jours	=	=	=	=	=
Bivalve marin <i>Geukensia demissa</i>	Paraquat	?	6 à 36 heures	+++		+++	+++	> contrôle
Poisson eau douce <i>Cyprinus carpio</i> <i>Carassius tinca tinca</i>	Paraquat	10	96 heures	-t = -t	++ ++ =	= ++ =	+++ +t =	
Poisson eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	t-butyl hydroperoxyde	125 injection i.p.	8 heures					+++
Poisson eau douce <i>Ictalurus punctatus</i>	Effluents d'usine à papier	10-20-40 %		=	=	+	=	=

SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; CAT : catalase ; MDA : malondialdéhyde ; GSH+GSSG : glutathion total
 Augmentation d'activité (+), diminution (-), absence d'effet (=), (b) :branchie, (f) :foie, (o) :ovaire, (i.p.) : intrapéritonéale
 t : indique que la variation est transitoire
 DEF : S,S,S-tri-n-butyl phosphotrithioate (herbicide organophosphoré): CL50 entre 5,6 et 18,8 mg/l
 n-butylmercaptan: métabolite du DEF: CL50 entre 1100 et 3600 mg/l

Tableau I.6: Modification d'activité ou de concentration des paramètres antioxydants et du malondialdéhyde de poissons ou de bivalves exposés à des métaux lors d'expérimentation en laboratoire (tableau adapté de Lagadic *et al.*, 1997)

Espèce étudiée	Substance étudiée	Conc. (mg/l)	Durée d'exposition	SOD	GPx	GRd	CAT	MDA	GSH+GSSG
Poisson marin <i>Scorpaena guttata</i>	Cadmium	10 et 20	4 semaines	---(i)					
Poisson marin <i>Micropogonias undulatus</i>	Cadmium	5 puis 1	6 jours 33 jours		-(f,o)			=(f,o)	=(f,o)
Bivalve marin <i>Mytilus edulis</i>	Cuivre Zinc Cadmium	Cu : 0,04 Zn : 0,08 Cd : 40	6 jours					- + -	- = =
Poisson eau douce <i>Heterpneustes fossilis</i>	Mercure	0,2 (HgCl ₂)	30 jours					+++ (c) +t (o) --t (r) ++++t (m)	
Bivalve marin <i>Anadara granosa</i>	Mercure Selenium	Hg : 0,1 Se : 1	4 jours			- + -			+ = +
Poisson eau douce <i>Cyprinus carpio</i>	Plomb Zinc	Zn15 + Pb 5 Zn20 + Pb 8 Zn1,5 + Pb 0,5 Zn3 + Pb 1 Zn5 + Pb 1,5	24 heures 5 jours		++ = -- = -		++ ++ - = --		

Augmentation d'activité (+), diminution (-), absence d'effets (=)

SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; GRd : glutathion reductase ; CAT : catalase ; MDA : malondialdéhyde ; GSH + GSSG : glutathion total

(c) : cerveau, (f) : foie, (i) : intestins, (m) : muscle, (o) : ovaires, (r) : reins

t : indique que la variation est transitoire

Tableau I.7: Modifications d'activité ou de concentration des paramètres antioxydants et du malondialdéhyde de poissons ou de bivalves prélevés in situ ou exposés en laboratoire à des sédiments provenant de sites contaminés ou non (tableau adapté de Lagadic *et al.*, 1997).

Espèce étudiée	Type d'étude	Polluants/sédiments en µg/g de poids sec	SOD	GPx	GRd	GST	CAT	GSH+GSSG	MDA
Durée d'exposition									
Poisson/estuaire Mugil sp.	In situ	HAP=44 PCB=2,3 DTTs=7,1	+	++	+	++	+	+(GSSG)	--
Bivalve marin Mytilus galloprovincialis	In situ	HAP=0,1 à 0,4 PCB= 0,004 à 0,007	+j +m -ju	=j +m			-j ++m =ju		
Poisson eau douce Ictalurus punctatus	En laboratoire	HAP=90 PCB=7 2-7-14-28 jours d'exposition	+			+	+	+	++
Poisson marin Limanda limanda	En laboratoire	HAP=300 PCB=0,015 20-80-144 jours d'exposition	=J20 ++J80 =J144				=J20 +J80 =J144		-J20 ++J80 ++J144

Augmentation d'activité (+), diminution (-), absence d'effet (=)

SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase ; GRd : glutathion reductase ; GST : glutathion transferase ; CAT : catalase ;

GSH+GSSG : glutathion total ; GSSH : glutathion oxydé, MDA : malondialdéhyde

j :janvier ; m :mars ; ju :juin ; J :jours

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

La réponse des systèmes antioxydants des organismes aquatiques aux polluants a été étudiée expérimentalement et *in situ*. Les principales études publiées dans la littérature sont regroupées dans les tableaux I.5, I.6 et I.7 extraits de Lagadic *et al.*, (1997), avec un rappel des conditions d'exposition, des paramètres contrôlés et des réponses qualitatives obtenues. Les tableaux 1 et 2 correspondent aux essais réalisés respectivement avec des substances organiques et minérales, et le tableau 3 regroupe les études menées *in situ* ou effectuées avec des sédiments provenant de sites naturels contaminés. De l'ensemble de ces travaux, il ressort que les activités antioxydantes sont en général augmentées en présence de polluants, les modifications d'activité pouvant être transitoires, accompagnées ou non d'effets de lipoperoxydation et qu'elles sont variables selon les espèces.

Les réponses des activités enzymatiques, SOD et catalase, présentent souvent des profils parallèles. Elles ont été observées en présence de sédiments contaminés par des PAHs et des PCBs.

L'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes en réponse à l'exposition aux contaminants de l'environnement n'est pas un phénomène constant. En effet, l'inhibition des SOD et catalases a été enregistrée chez des limandes prélevées en Mer du Nord au niveau des sites pollués du Dogger Bank (Livingstone *et al.*, 1992), et chez des carpes exposées en laboratoire à des concentrations élevées en cuivre (25 mg/l) et en zinc (10mg/l) (Radi et Matkovic, 1998). Dans les deux cas, l'activité de la glutathion peroxydase était au contraire augmentée, la peroxydation lipidique étant également élevée dans le cas des contaminations par le cuivre. Ces résultats indiquent, d'une part, que la réponse des activités de la glutathion peroxydase ne va pas toujours dans le même sens que celles des deux enzymes précédentes et, d'autre part, que l'activation de la glutathion peroxydase ne suffit pas à empêcher la peroxydation lipidique.

Dans certains cas, une augmentation parallèle des activités de la glutathion peroxydase, catalase et SOD peut être observée, comme cela a été noté chez des mullets *Mugil sp* ; d'un estuaire du sud de l'Espagne contaminé par des PAHs, des PCBs et des pesticides (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1993).

La peroxydation lipidique traduit l'inefficacité des systèmes antioxydants à enrayer une agression toxique (Lagadic *et al.*, 1997). Elle peut avoir lieu même en présence d'activités antioxydantes augmentées, l'induction pouvant être insuffisante pour faire face au stress.

3.3.3. Réponse des amphibiens anoures à divers contaminants de l'environnement

L'induction du cytochrome P450 est faible chez les amphibiens par rapport à ce que l'on retrouve chez les mammifères (Venturino *et al.*, 2003). Une grande variation dans l'activité des systèmes MFO existe chez des adultes de *Rana temporaria*. Cela résulte probablement en des changements hormonaux lors de ponte. Cependant, l'induction des systèmes MFO a bien été démontrée pour des larves de *Bufo arenarum* exposées à du malathion. Les activités des enzymes glucose-6-phosphate, GSH et GSH+GSSG sont en général diminuées ou inhibées chez les embryons et les larves exposés à divers composés environnementaux comme le zinc, le cadmium, le lindane, les pentachlorobiphényles. (Venturino *et al.*, 2003).

Tableau I.8. Effets des PCBs sur les enzymes antioxydantes chez différentes espèces animales

Espèce étudiée	Traitement	Effets observés	Références
Rats mâles <i>Sprague-Dawley</i>	Expérimentation : rats traités avec une simple dose de PCB-77 ou PCB-153 dissous dans des grains de maïs à des doses de 30, 150 ou 300µmol/kg ou à la fois avec les deux PCBs à des doses de 30 ou 150µmol/kg.	Induction maximale du CYP-450 après 24h et augmentation de la peroxydation lipidique à partir du deuxième jour dans les tissus hépatiques et les fractions subcellulaires pour les deux types de PCBs.	Fadhel <i>et al.</i> , 2002
Rats	Expérimentation : administration d'une mixture de tétrachloro-biphényles à une concentration de 0,02% pendant dix jours.	Augmentation des concentrations en TBARS dans les fractions hépatiques microsomales et mitochondriales. L'administration de vitamines E ou de probucol dans le régime empêchait et/ou réduisait cette augmentation.	Yamamoto <i>et al.</i> , 1994
Rats albinos	Expérimentation : groupe de 20 rats traités avec de l'Aroclor 1254 (2mg/kg poids/jour) pendant 30 jours ; après le traitement 10 d'entre-eux étaient traités comme le contrôle PCB et les 10 autres restant ont reçu du ZnSO ₄ (200mg/kg poids/jour) pendant 10 jours.	Enzymes antioxydantes comme SOD, CAT, GPx, GST, ACP (acide phosphatase) ont diminué alors qu'une augmentation de H ₂ O ₂ et de la LPO était observée. Diminution de la cc en T ₃ , T ₄ , testostérone, oestradiol. Augmentation de la TSH. L'administration de Zn restore tous les niveaux des paramètres exceptés l'ACP de la prostate ventrale. Ccl : les PCBs induisent un stress oxydant chez ces rats par la diminution des niveaux d'enzymes antioxydantes, cet effet pouvant être renversé par l'administration de zinc.	Venkataraman <i>et al.</i> , 2004
Rats mâles et femelles <i>Sprague-Dawley</i>	Expérimentation : groupe de rats mâles et femelles ont reçu deux injections intra-péritonéale par semaine de PCB 3, PCB 28, PCB 38, PCB 77, PCB 153 ou à la fois PCBs 77 et 153 (100 µmol/kg/injection) et sont tués à la fin de la semaine 1, 2 ou 3.	Augmentation significative de l'activité de la GR et de la GST chez les mâles et femelles qui ont reçu le PCB 77 (un agoniste du Récepteur Ah), et à la fois les PCBs 77 et 153. Aucune tendance significative n'était observée dans les niveaux de glutathion hépatique total. Le traitement au PCB 77 diminue l'activité de la SeGPx de manière significative à la fois chez le mâle et la femelle. Cette diminution était accompagnée d'une diminution de la transcription du gène GSPx1 (<i>cytosolic selenium-dependent glutathione peroxidase gene</i>)	Twaroski <i>et al.</i> , 2001
Oeufs de poulet <i>Gallus domesticus</i>	Expérimentation : TCDD injecté à l'intérieur d'œufs de poulet avant leur incubation pour étudier les mécanismes possibles de toxicité et de tératogénèse (les indicateurs de stress oxydant étudiés se situent au niveau du cerveau et du foie)	Au niveau du foie : TCDD cause une diminution des contenus et des activités de GPx et une augmentation dans le rapport GSSG/GSH. TCDD augmente la probabilité d'une peroxydation lipidique et des dommages oxydatifs d'ADN dans le foie.	Hilscherova <i>et al.</i> , 2003

4) Etudes concernant les effets des PCBs sur différents organismes vivants

4.1. L'impact sur les populations humaines

Nous savons que les composés organochlorés sont hautement lipophiles et se retrouvent principalement dans les tissus adipeux, le foie, la fraction lipidique du sérum et dans le lait chez l'homme. Ces composés peuvent être détectés dans les échantillons biologiques de populations humaines un peu partout dans le monde. Cependant les grandes concentrations se retrouvent surtout dans les endroits où les composés sont toujours utilisés et chez les humains qui consomment de grandes quantités de produits de la mer contaminés. Les concentrations en PCBs et DDTs dans le sérum et le lait ont diminué dans les régions où ces composés sont interdits. Cependant, les concentrations de PCBs ne diminuent pas dans les populations continuellement exposées aux produits de mer contaminés, comme c'est encore le cas pour les populations du Michigan (Toft *et al.*, 2004).

Ces auteurs font référence à une série d'études épidémiologiques mettant en évidence les nombreuses anomalies au niveau du système reproducteur chez des populations exposées à des doses élevées de PCBs et de DDTs. Ces derniers sont appelés 'perturbateurs endocriniens' c'est-à-dire qu'ils sont capables de moduler ou de disrupter l'homéostasie du système hormonal via différentes voies. Bien que ces perturbateurs aient des effets sur de nombreux systèmes dépendant des hormones, les principales études se concentrent sur le développement et la reproduction. Parmi les anomalies au niveau reproduction, nous retrouvons une réduction de la qualité du sperme et une augmentation du cancer des testicules chez les hommes, des anomalies du cycle menstruel et des avortements spontanés chez les femmes, une augmentation du temps jusqu'à la première grossesse, une réduction du poids des nouveau-nés à la naissance et des altérations au niveau de l'âge dans le développement sexuel.

4.2. L'impact sur différentes espèces animales

4.2.1. Les PCBs et le système antioxydant

De nombreuses études ont mis en évidence l'induction d'un stress oxydatif chez différentes espèces suite à une contamination par des PCBs. Nous avons regroupé quelques-uns de ces travaux dans le tableau I.8.

En général, il ressort que les PCBs sont responsables d'une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation des concentrations en TBARS) et de l'altération de la fluidité de certaines membranes (nucléaires, hépatiques). Les lipides membranaires jouent un rôle critique dans le maintien de la structure et de la fonction des membranes et de façon ultime, dans la survie des cellules. La présence d'acides gras polyinsaturés et l'augmentation de la solubilité de l'oxygène dans les lipides font des membranes des cibles particulièrement sensibles à toute attaque oxydative par quelque composé polluant que ce soit, et en particulier, par les PCBs (Katynski *et al.*, 2004). Shara *et al.* (1990) ont observé une augmentation de 400 à 500 % de la peroxydation lipidique des membranes hépatiques mitochondriales et microsomiales, et des membranes nucléaires, trois à cinq jours après l'injection de 100 µg de TCDD/kg dans les femelles de rats. Yamoto *et al.* (1994) ont également mis cela en évidence et l'administration de vitamine E dans le régime contaminant réduisait l'augmentation de lipoperoxydation. Ce qui confirme le rôle antioxydant de cette vitamine.

Certains traitements aux PCBs augmentent l'activité de la GR mais, dans la plupart des cas, ces composés induisent un stress oxydant chez les diverses espèces par une diminution ou une inhibition de l'activité de la majorité des enzymes antioxydantes et par l'augmentation du rapport glutathion oxydé sur glutathion réduite.

4.2.2. Les PCBs et les multiples cibles

Les effets toxiques observés suite à une contamination aux PCBs sont de différents types. Des expériences ont été réalisées sur des animaux de laboratoire (Safe, 1994). Elles ont révélé des effets tels que : neurotoxicité, carcinogénicité, perte de poids, mortalité aiguë, dérégulation endocrinienne, atrophie du thymus, toxicité hépatique, effets sur la reproduction et sur le développement,... Les réponses toxiques engendrées dépendent de nombreux facteurs tels que l'espèce considérée, l'âge et le sexe de l'organisme contaminé, la durée d'exposition, le degré de chloration des congénères de PCBs ainsi que la position des atomes de chlore, etc (Safe, 1994).

4.2.3. Les PCBs et le système reproducteur

Le système reproducteur semble le système le plus touché par les polluants organiques. En effet, il apparaît que les PCBs ont des effets principalement au niveau reproducteur avec de multiples cibles. Par exemple, des désordres au niveau reproducteur ont été observés chez des primates non humains : altération du cycle menstruel, augmentation des avortements et résorption des embryons étaient observés chez des singes exposés à de l'Aroclor 1248.

De nombreuses études existent sur les effets des xénobiotiques (dont font partie les PCBs) au niveau des premières phases des cycles de reproduction des organismes aquatiques dans tous les composants de l'écosystème marin (Reijnders et Brasseur, 1997). En voici quelques exemples :

- Gamétogenèse :

- Chez l'étoile de mer *Asteria rubens*, le cadmium et les PCBs affectent l'oogenèse au début de la vitellogenèse. La production des oocytes diminue chez les femelles exposées aux PCBs, ce qui cause une réduction du poids des ovaires. Des réductions significatives sont également observées dans le caecum pylorique des femelles et mâles exposés au cadmium et aux PCBs.
- Les polychètes *Nereis nereis* ne forment pas de gamètes en présence de grandes concentrations de composés aromatiques hydrocarbonés. Cela est associé avec une augmentation de l'activité du cytochrome P450.

- Développement gonadique et embryogénique

- Des aberrations dans le développement précoce des embryons de l'étoile de mer *Asteria rubens* ont été observées en présence à la fois de cadmium et de PCBs.
- Ces mêmes aberrations se retrouvaient dans l'étoile de mer *Patiria miniata* dans laquelle des fractions de pétrole et des PCBs étaient présents.

- Production d'œufs chez le zooplancton

- Les effets de trois xénobiotiques sur les communautés de zooplancton ont été étudiés : le tetrapropylène-benzenesulphonate et deux mixtures de PCBs, l'Aroclor 1221 et 1254. Dans les trois cas, la production d'œufs de copépodes était plus basse que dans les contrôles. Les mécanismes sous-jacents restent inconnus.

- Désordres pathologiques :

- La pollution organochlorée, en particulier avec les PCBs et DTTs, interfère avec le système endocrinien des femelles de phoques à rayures, *Phoca hispida*, et de phoques gris *Halichoerus grypus* de la Baltique. Les symptômes observés sont des sténoses et

Tableau I.9 : Principaux effets des PCBs sur le comportement du rat et de la souris : synthèse (Ulbrich et Stahlmann ; 2004)

Behavioral effects overview		Rat							Mouse						
		LM	MA	GD	SX	NT	T4	EP	LM	MA	GD	SX	NT	T4	EP
2,2',5-trichlorobiphenyl	PCB 18														
2,4,4'-trichlorobiphenyl	PCB 28	Red						Yellow		Red	Red				
2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl	PCB 47				Red	Blue			Red						
3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl	PCB 77	Green		Red	Red	Blue		Red	Red	Red		Blue			
2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl	PCB 95	Green	Red			Blue		Red							
2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl	PCB 101					Blue		Red							
2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl	PCB 118	Red						Red		Yellow	Yellow				
3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl	PCB 126	Green	Green	Red	Red			Red		Red		Blue			
2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	PCB 153	Red	Green					Red							
3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl	PCB 169					Blue		Red							
Aroclor 1254	Composition	Red	Red	Green		Blue		Red	Red						
PCB reconstituted mixture	Composition			Green		Blue		Red							
Clophen A30	Composition	Red	Green												

LM Learning/Memory
 MA Motoractivity
 GD Gender dimorphic
 SX Sexual behavior
 NT Neurotransmitters/Receptors
 T4 Thyroxine plasma level
 EP Long-term potentiation

Red lower than normal
 Green higher than normal
 Yellow unaffected
 Blue affected

Tableau I.10: Impacts des PCBs sur le développement embryonnaire et larvaire du xénope *Xenopus laevis*

Espèce étudiée	Traitement	Effets observés	Référence
Têtards de xénope <i>Xenopus laevis</i>	<p>1) 10 jours d'exposition: des têtards de xénope au stade 49 (stade avant le pic d'hormone thyroïdienne) sont répartis en un groupe 1 (contrôle 0), un groupe 2 (contrôle positif), et trois groupes PCBs. Ce dernier groupe est nourri pendant dix jours avec un régime contenant 2 (groupe 3) ou 200 (groupe 4) mg/kg de Clophen A50 (mixture de PCBs) ou avec 0,2 mg/kg (groupe 5) de PCB 126. Les PCBs sont dissous dans de l'acétone, et la solution est ajoutée à la poudre. Après dix jours de contaminations, les animaux sont nourris avec de la poudre non contaminée pour une période de 46 jours lorsque 75 % des têtards du groupe contrôle aient terminé la métamorphose (stade 65/66).</p> <p>2) exposition jusqu'à la fin de la métamorphose: têtards de xénope au stade 50 étaient exposés à des aliments contaminés (voir ci-dessus) jusqu'à ce que 75 % des animaux contrôles aient terminé la métamorphose.</p>	<p>1): la mortalité est faible (2-3%) dans tous les groupes et aucune malformation n'est observée. Dans le groupe 2 et 3, les animaux entraient en métamorphose plus tard que le groupe 1.</p> <p>2) : la mortalité dans le groupe 4 est de 42,5 % comparé au groupe contrôle 1 (20,8 %). Le pourcentage des malformations est élevée dans le groupe 5 (67,3 %) par rapport au groupe 1 (18,2 %). La queue et les yeux sont les malformations dominantes dans les groupes exposés aux PCBs.</p> <p>Le temps pour achever la métamorphose est significativement augmenté dans les groupes 3 et 5 comparés aux autres groupes</p>	Gutleb <i>et al.</i> , 2000
Têtards de xénope <i>Xenopus laevis</i>	<p>1) : des têtards au 5^{ème} jour PF sont exposés à 0,05 ; 0,5 ; 10 ou 50 ppm d'Aroclor 1254 pendant deux jours.</p> <p>2): des têtards au 11^{ème} jour PF sont exposés à 1 ; 10 ; 25 ou 50 ppm pendant deux jours.</p> <p>L'Aroclor 1254 est dissous dans du DMSO (concentration finale = 0,25 %). Un contrôle eau et un contrôle DMSO (0,25%) étaient inclus pour chaque expérience. Chaque expérience était répétée quatre fois avec des têtards de différentes pontes.</p> <p>Quatre expériences supplémentaires avec des têtards au 11^{ème} jour PF sont ajoutées pour observer les effets à long terme à de faibles doses (1 et 10 ppm) d'Aroclor 1254.</p> <p>PS : L'Aroclor 1254 ajouté à l'eau du milieu avec 0,25 % de DMSO car la quantité reçue à travers les branchies est plus importante qu'à travers l'ingestion par un repas (Jelaso <i>et al.</i>, 2002)</p>	<p>Les jeunes têtards (5 jours PF) sont résistants à l'Aroclor 1254 et montrent peu de changements aux niveaux morphologique, comportement de nage, survie ou au niveau de l'expression génique. Les têtards plus âgés (11 jours PF) sont plus sensibles à l'Aroclor 1254. L'exposition à 25 et 50 ppm d'Aroclor 1254 cause des altérations au niveau de la morphologie, dans le comportement de nage et diminue de façon significative le nombre de survivants. Ces têtards montrent des diminutions significatives dans l'expression de 9 gènes sur 11 gènes mesurés. Les têtards exposés à 10 ppm ne montrent pas d'effets mais ils ont les mêmes profils d'expression génique que les têtards traités avec de grandes doses. Les têtards exposés à 1 ppm ne présentent aucun effets néfastes mais ils présentent une diminution significative de l'expression de 4 gènes sur 11.</p>	Jelaso <i>et al.</i> , 2002

Tableau I.10 : Impacts des PCBs sur le développement embryonnaire et larvaire du xénope *Xenopus laevis* : suite

Têtards de xénope <i>Xenopus laevis</i>	1): exposition de têtards au 18 ^{ème} jour PF à différentes doses d'Aroclor 1254 : 5,50,250 et 500 ppb. 2): exposition de têtards au 18 ^{ème} jour PF à différentes doses d'Aroclor 1254 : 300, 400, 500 et 700 ppb.	L'exposition à de faibles doses (5-50 ppb) augmente significativement l'expression de 6 gènes sur 10 sans aucun effet néfaste apparent. L'exposition à des doses moyennes (300-400 ppb) diminue significativement l'expression de deux gènes avant le début d'effets néfastes. L'exposition à de fortes doses (500-700 ppb) diminue significativement l'expression de deux gènes et cela est corrélé avec l'apparition d'anomalies morphologiques, de déficits de croissance et d'une diminution des survivants.	Jelaso <i>et al.</i> , 2003
Têtards de xénope <i>Xenopus laevis</i>	Les têtards sont exposés du 5 ^{ème} (stade 42/43) au 9 ^{ème} jour PF (stade 46) à de l'Aroclor 1254. Les aquariums d'expérimentation contenaient 1, 10, 50, ou 100 ppm d'Aroclor 1254. Un contrôle eau et un contrôle DMSO (0,25 %) sont inclus pour chaque expérimentation.	Diminution du nombre de survivants (exposition à 10, 50, et 100 ppm), diminution l'aire de la tête (à partir de 1 ppm et plus) et l'aire de la queue (à partir de 10 ppm et plus). Altération de la morphologie de la queue (10 ppm et plus) et désorganisation de la structure des cellules musculaires de la queue (10 ppm et plus). Réduction dans la pigmentation des mélanocytes de la peau au niveau de la surface recouvrant le cerveau.	Fisher <i>et al.</i> , 2003
Embryons et larves de xénope <i>Xenopus laevis</i>	25 embryons clivés (stade 8-11) sont placés dans différents milieux contenant 10 ml de FETAX medium. Deux mixtures commerciales de PCBs, l'Aroclor 1221 et 1254 sont ajoutés aux différents milieux en utilisant un solvant DMSO. Les concentration en Aroclor étaient de 10 ng/l, 100 ng/l, 1 µg/l, 10 µg/l, 100 µg/l, 1 mg/l, 10 mg/l. Des têtards au 5 ^{ème} jour PF sont exposés, pendant 96 h, à différentes concentrations des deux types de mixtures pour un test de toxicité aigue des larves.	Aucune différence significative en ce qui concerne le succès d'éclosion, la mortalité, les malformations et le poids des larves pour le premier test dans les différents verres de montre, excepté la survie des têtards était de 4,7 % pour l'exposition à 10 mg/l d'Aroclor 1221. Les têtards exposés à 10 mg/l d'Aroclor 1254 présentaient de la dépigmentation. Diminution dose dépendant du nombre de survivants pour la contamination des têtards au 5 ^{ème} jour PF. Avec le temps d'exposition et la concentration, la mortalité augmentait également. Les têtards exposés à l'Aroclor 1254 développent une dépigmentation dose dépendant au delà de 1 mg/l.	Zhou <i>et al.</i> , 2004

occlusions utérines, des hyperplasies adrénocorticales bilatérales et des ostéoporoses d'origine hormonale.

- Des désordres reproducteurs dans les bélugas *Delphinapterus leucas* du Saint Laurent ont été observés en même temps que la présence de PCBs et de DDTs.

4.2.4. Les PCBs chez les rongeurs : le rat et la souris

Ulbrich et Stahlmann (2004) ont réalisé un article synthèse dans lequel ils exposent les effets des PCBs sur les espèces animales les plus étudiées dans la littérature : le rat et la souris. Le tableau I.9 résume les principaux effets des PCBs au niveau comportemental chez le rat et la souris. Des changements dans les paramètres comportementaux, biochimiques et électrophysiologiques au niveau du cerveau ont été observés pour la plupart des congénères et des mixtures de PCBs. Cependant, tous les effets ne sont pas préjudiciables. La mémorisation est améliorée pour des rats exposés aux congénères coplanaires 77 et 126 durant le développement. L'affaiblissement de l'apprentissage observé avec d'autres PCBs n'apparaît pas être corrélé avec la diminution d'hormone thyroïdienne dans la circulation.

4.3. Effets des PCBs sur le développement des amphibiens

Peu d'études existent sur les effets des PCBs au niveau des premiers stades de développement du xénope *Xenopus laevis*. Le tableau I.10 les synthétise.

Des travaux de Gutleb *et al.* (2000), il ressort que les PCBs sont responsables d'altérations au niveau du développement normal des amphibiens d'une manière temps et dose-dépendant. En effet, une contamination aux PCBs résulte en un retard dans l'aboutissement de la métamorphose, une augmentation de la mortalité et des taux de malformations (au niveau de la queue et des yeux), un ralentissement de la croissance et du développement des têtards après 51 à 76 jours d'exposition orale. Les niveaux de T4 étaient également plus bas que dans les groupes contrôles. Les têtards exposés à des stades qui ne sont pas encore sous dépendance hormonale thyroïdienne seraient moins susceptibles aux contaminations par les PCBs (Gutleb *et al.*, 2000)

Jelaso *et al.* (2002) se sont intéressés à la définition de *patterns* d'expression de gènes en tant que bioindicateurs d'effets sur la santé induits par une exposition à court terme aux PCBs (deux jours). Ils ont opté pour des gènes biomarqueurs potentiels ayant des rôles bien définis dans les processus de régulation physiologique chez les amphibiens et pouvant être influencés par une contamination aux PCBs. Etant donné qu'il est connu que les PCBs affectent le développement neuronal et endocrinien, un nombre de gènes contrôlant les fonctions neuro-endocriniennes chez les amphibiens ont été sélectionnés (tableau I.11).

Les têtards exposés du 5^{ème} au 7^{ème} jour PF présentent peu d'effet néfaste et peu de changement dans l'expression des 11 gènes sélectionnés. Les têtards exposés du 11^{ème} au 13^{ème} jour PF aux doses élevées d'Aroclor 1254 (25 ou 50 ppm) présentent une augmentation dans la mortalité, dans les altérations morphologiques et comportementales ainsi que dans la durée de la métamorphose. Cela est corrélé à la diminution de l'expression de 9 gènes sur 11. Cette diminution est également obtenue lors d'exposition aux faibles doses (10 ppm), tandis qu'à 1 ppm, l'expression de 4 gènes sur 11 était diminuée (cela indépendamment de tout effet néfaste immédiat et visible). Jelaso *et al.* (2002) ont montré que les PCBs induisent une variation d'expression de différents gènes d'intérêt dont celui codant pour le récepteur de l'hormone thyroïdienne TH.

Tableau I.11 : Les 11 gènes analysés (Jelaso *et al.*, 2002)

Function	Gene	Primer	Sequence (5'-3')	Probe (5'-3')
Neurological	D2 Rt	f (300)	AGATGTTAAGCTATGTGCTGTATTTGTTAA	TCCAATGGGAGCTCCCGAGCAGAG
		r (300)	TTGCCAGCTTCCACTTTCTTTT	
	NGF	f (300)	CCAGCAAGGTCTTCAGCAAAA	CCGGCATTCTCATCACACACATCG
		r (300)	CGTGGGAATGGTGAAGAGACTTAG	
Apoptosis/ cytokine activation	CPP32β	f (300)	GGCATTGAAACAGACAGTTGCA	CGCTGGATCTCTTCCCGTGGTTCA
		r (300)	AGTCGGCCTCCACTGGAAT	
	ICE	f (300)	CGGGAGGAGCATGCAGATT	ACAGCACCTTCATAGTTTTGATGTCTCATGGAG
		r (300)	CCCACAGACTCCCGGCTTA	
Endocrine control	Thy Rt	f (300)	GGGTACATCCCAGCCATC	GCACACCACCGCATGGCTCATCTTT
		r (300)	TGGTACCCCGTGGCCTTAT	
	POMC	f (300)	ATGACCCATTTTCGGTGAA	TGCCTGTGCTGTTTCTTCTGCCAAATTT
		r (300)	CACGTTTGTAGCCTGTGTTGCT	
	RAR-α	f (300)	TCACAGAGACAAGAATTGCATCATAA	AGTCACGGCGAACCGGTGCC
		r (300)	CATTTCTGCAAGCGGCAATAC	
Cell cycle regulation	p53	f (300)	CGATCAGCAGAAAGTGACCATTA	CATCCGGGCACTTGGGGCA
Cell structure	β-actin	r (50)	TTCTTTCCTTTCTTGGGTTTGATT	
		f (50)	GAGCCGCATAGAAAGGAGACA	TCTGTGTGCGTCCAACCCCTCAGATCA
Metabolic control	GAPDH	r (50)	GCGGCAATATCGTCTTCCAT	
		f (50)	GAAAAATAACCGGAATGGCTTTC	TCCCCACCCCAATGTGTCCGT
Xenobiotic response	p4501A1	r (50)	CAGGGGGCAGGTCCAGATC	
		f (300)	GCATGACTTTCAGCAGTGATTCTG	CCTGCGTCCGAGCTCTCCACACCTCT
	yeast actin	r (50)	TAGCAAAGGTTTTGAGGGCATT	
		f (50)	TGGATTCCGGTGATGGTGTT	CTCACGTGGTTCCAATTTACGCTGGTT
		r (300)	TCAAATGGCGTGAGGTAGAGA	

Abbréviations : D2 Rt : D2 dopamine receptor, NGF : nerve growth factor, ICE : interleukin converting enzyme, Thy Rt : thyroid hormone receptor, POMC: pro-opiomelanocortin, RAR-α: retinoic acid receptor alpha, GAPDH: glyceraldehydes-3 phosphate dehydrogenase

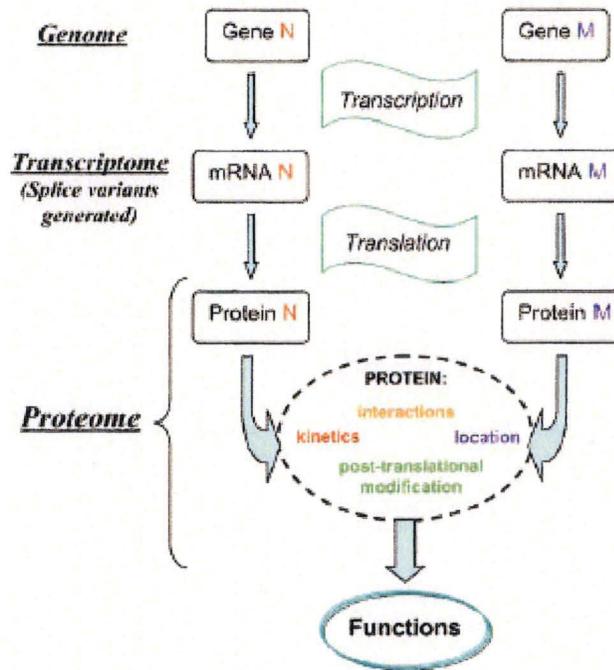


Figure I.15 : Progression du génome au protéome. Quand un gène est exprimé, l'ADN codant est transcrit en ARNm, qui subit l'excision des introns et l'ajout d'exons. Au niveau transcriptomique, l'étude de l'expression des ARNm par un génome à tout moment est réalisée par l'analyse de microarrays. Les protéines sont synthétisées et peuvent subir des modifications co-traductionnelles et post-traductionnelles qui sont souvent impliquées dans la formation de la structure fonctionnellement active de la protéine. C'est principalement au niveau protéomique que les gènes exercent leurs 'fonctions'. Parce que l'analyse du protéome fournit une vue d'ensemble des processus biologiques au niveau de leurs occurrences, la protéomique offre une meilleure compréhension du cycle cellulaire, de la mort cellulaire, des étapes de développement, de la fonction des cellules et des réponses des cellules aux stimuli externes et aux maladies que l'approche génomique (d'après Cristea *et al.*, 2004).

Les concentrations sélectionnées dans l'étude de Jelaso *et al.*, (2002) sont le reflet des concentrations environnementales retrouvées dans les sédiments et dans les tissus animaux de la rivière Hudson et de la rivière Kalamazoo (USA) toutes deux contaminées par des PCBs. En effet, des concentrations en PCBs allant jusqu'à 160 ppm étaient trouvées dans les sédiments alors que des valeurs de 50 à 250 ppm se retrouvaient dans les tissus des poissons.

Un an plus tard, Jelaso *et al.* (2003) démontrent que 1) la sensibilité à l'Aroclor 1254 augmente avec le stade de développement des têtards (les larves au 18^{ème} jour PF présentent des anomalies et des changements dans l'expression des gènes à des doses plus faibles que les têtards au 11^{ème} jour PF (Jelaso *et al.*, 2002)), 2) les augmentations dans l'expression de gènes peuvent servir comme biomarqueurs d'exposition et 3) les diminutions dans l'expression génique servent de biomarqueurs d'effets néfastes.

Au cours de la même année, Fisher *et al.* (2003) viennent conforter les idées existantes sur les effets néfastes des PCBs au niveau des premières étapes du développement. Ils ont montré que les PCBs étaient responsables d'une diminution du nombre de survivants pour des têtards exposés du 5^{ème} au 9^{ème} jour PF à de l'Aroclor 1254 (à partir de 10 ppm et plus). Cette même exposition altère la morphologie et l'organisation des cellules musculaires au niveau de la queue. La contamination aux PCBs provoque également une dépigmentation de la peau dans la région couvrant le cerveau. Le nombre et l'arborisation des mélanocytes étaient fortement affectés à partir d'une concentration de 10 ppm.

Zhou *et al.* (2004) ont montré que les PCBs ne perturbent pas de façon significative le succès d'éclosion, la mortalité, les malformations pour des embryons exposés à des stades très jeunes (stade 8-11) à de l'Aroclor pendant 96h. Par contre, une contamination chez des têtards au 5^{ème} jour PF pendant 96h altère la survie de ces jeunes larves: il y a une diminution du nombre de survivants plus le temps s'écoule et plus la dose augmente. Cela rejoint les conclusions de Jelaso *et al.*, 2002-2003.

Les quelques résultats nous indiquent que les réponses des xénopes vis-à-vis des PCBs augmentent durant l'ontogenèse larvaire (les têtards au 18^{ème} jour PF sont plus sensibles que les têtards au 11^{ème} jour PF (Jelaso *et al.*, 2003)). De plus, même en l'absence d'effets apparents (comportement, morphologie,...) les PCBs altèrent les niveaux d'expression de certains gènes indispensables au développement d'un individu sain (Jelaso *et al.*, 2002).

5) L'approche protéomique

5.1. La génomique fonctionnelle

L'étude de l'expression des différents gènes formant un génome, dans un tissu donné, à un moment donné, et sous une condition donnée, s'appelle la génomique fonctionnelle. L'étude de cette dernière fait appel à deux grandes approches : l'approche transcriptomique et l'approche protéomique (figure I.15).

5.1.1. L'approche transcriptomique

Cette première étude concerne l'analyse du transcriptome qui est constitué par l'ensemble des ARN messagers formés à la suite de la transcription des gènes et présents dans les cellules. Depuis quelques années, plusieurs techniques concernant l'analyse de l'expression des ARNm se sont développées. Ces méthodes incluent notamment le *Differential Display RT-PCR* et la

technologie des puces à ADN ou « *microarrays* ». Cependant, l'analyse de l'ARNm n'est pas le reflet direct du contenu protéique des cellules. En effet, la formation de l'ARNm est le premier pas d'un long cheminement résultant en la synthèse d'une protéine fonctionnelle (Graves et Haystead, 2002). De plus, la transcriptomique ne donne aucune information concernant les modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations.

5.1.2. L'approche protéomique

Les gènes codent au final pour des protéines. Le rôle fondamental des protéines au sein d'un organisme vivant apparaît dès les premiers stades de vie (Cristea *et al.*, 2004). Le nom « protéine » dérivant du grec, « *proteios* » et signifiant « premier rang », a été employé pour la première fois par Berzelius en 1838 pour illustrer l'importance de ces molécules.

Le terme « protéome » a été utilisé pour la première fois en 1995 afin de décrire le complément d'un génome au niveau des protéines (Graves et Haystead, 2002). Un an plus tard, Wilkins *et al.*, 1996 ont défini la protéomique comme étant « l'analyse dans son entièreté, du complément exprimé par un génome au niveau des protéines » c'est-à-dire au niveau final et fonctionnel du produit de l'expression des gènes.

L'approche protéomique permet d'obtenir une vision ponctuelle et « sans a priori » de l'expression des protéines dans un tissu donné, à un moment donné, sous une condition donnée (Wilkins *et al.*, 1996).

Une grande partie du développement de la protéomique est due aux nombreuses avancées technologiques faites, ces dernières années, en matière d'analyse protéomique. Il y a une vingtaine d'années, lorsque les gels d'électrophorèse en 2 dimensions (2-DE) ont été introduits, très peu d'outils existaient dans le domaine de la protéomique (Graves et Haystead, 2002). Actuellement, de nouvelles technologies ont émergé au niveau de la séparation des protéines et de leur identification par spectrométrie de masse.

L'analyse protéomique peut être menée étape par étape : (1) solubilisation d'un maximum de protéines, (2) séparation des protéines sur des gels d'électrophorèse en 2 dimensions, (3) analyse informatique du niveau d'expression des spots de protéines et comparaison entre gels, (4) analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF, MS/MS,...), (5) identification des protéines à l'aide de bases de données informatiques

A. Les gels d'électrophorèse en 2 dimensions (2-DE)

Les gels polyacrylamides d'électrophorèse en 2 dimensions (2-DE) ont été initialement décrits par O'Farrell en 1975 et ont évolué sur le marché comme une des techniques la plus employée pour l'analyse de protéines extraites d'échantillons biologiques.

Le but de cette méthode est d'obtenir des protéines séparées les unes des autres. Cela permettra l'analyse des gels de deux conditions différentes (contrôle/traité) et la mise en évidence d'une modification éventuelle de l'expression de protéines dans la condition traitée par rapport à la condition contrôle. La séparation des protéines se fait selon deux caractéristiques : le pI (IEF : IsoElectric Focusing) et le poids moléculaire (MW) des protéines. Les spots obtenus sur le gel sont classiquement visualisés à l'aide de différents colorants (bleu de Coomassie, nitrate d'argent,...). Les spots d'intérêt sont ensuite découpés des gels et digérés par une enzyme. Ils pourront alors être identifiés par la spectrométrie de masse (MALDI-TOF, ESI Q-TOF, MS/MS) ou par comparaison des cartes peptidiques massiques. (Graves et Haystead, 2002).

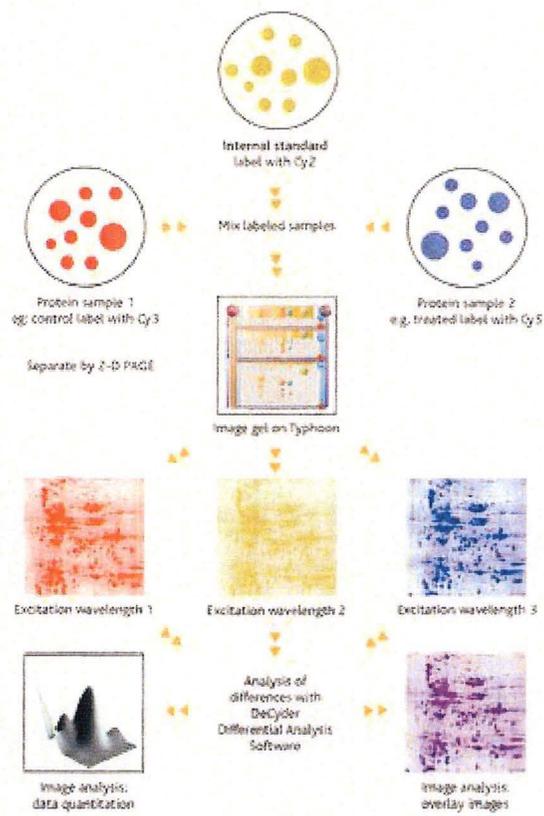


Figure I.16 : Schéma représentant les différentes étapes de la technique du 2D-DIGE (schéma provenant de <http://www.amershambiosciences.com>)

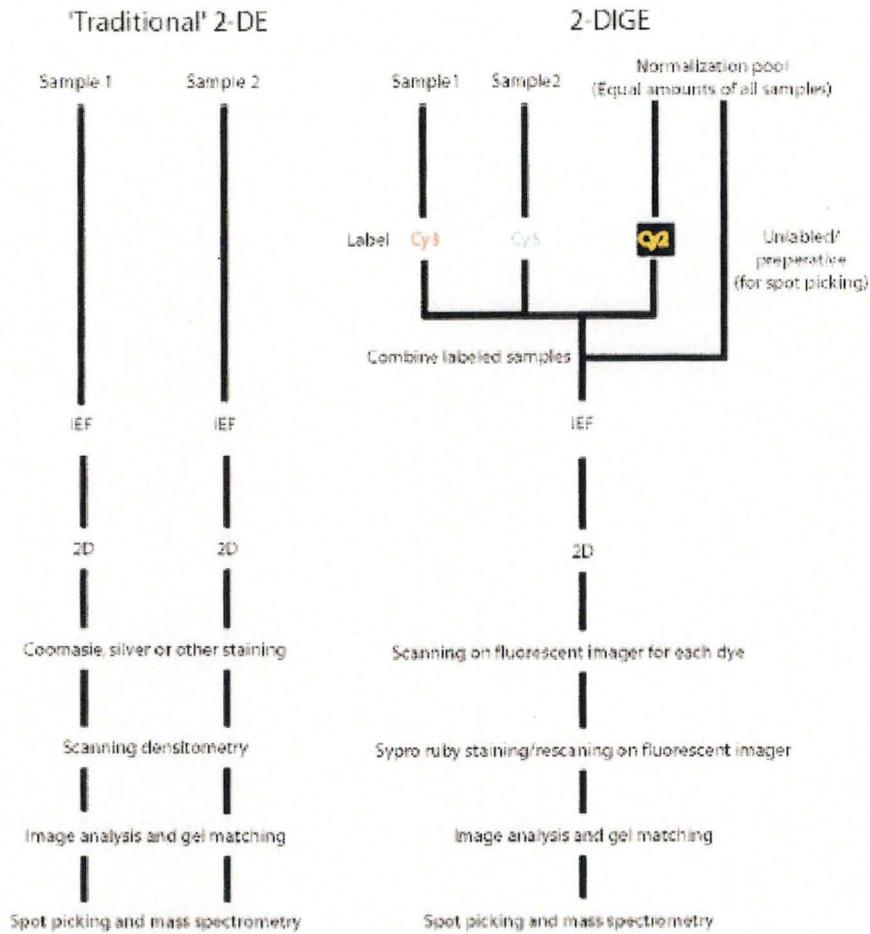


Figure I.17: Comparaison entre l'électrophorèse bidimensionnelle et la technique du 2D-DIGE (d'après Freeman et Hemby, 2004)

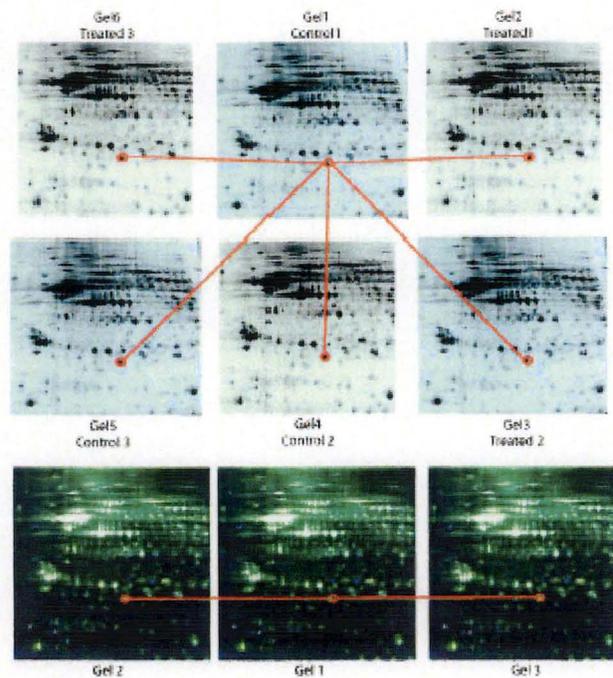


Figure I.18 : Le spot '*matching*' est le processus par lequel on détermine quel spot est le même à travers différents gels. Le 2D-DIGE facilite le '*matching*' car il intègre un standard interne sur chaque gel et il réduit le nombre de gels au total (d'après Freeman et Hemby, 2004).

L'utilisation de cette technique connaît cependant de nombreuses limites. En effet, elle nécessite une importante somme de travail et de budget dans la réalisation et la comparaison des gels. Les protéines les moins solubles (protéines membranaires, hydrophobes) ne sont pas facilement extraites de l'échantillon. De plus, il peut y avoir une superposition des spots et une résolution moyenne en 1^{ère} dimension. Avec cette technique, la variabilité interindividuelle et la variabilité de l'expérimentation sont importantes, ce qui diminue la facilité de comparaison des gels. Enfin, les protéines de faible abondance sont peu visibles sur le gel.

B. Le 2D-DIGE

L'introduction d'une technique fluorescente *Differential In-Gel Electrophoresis* (DIGE) par Unlu *et al.*, 1997 a permis de diminuer une partie des problèmes liés aux gels en 2 dimensions. La technique 2D-DIGE utilise des sondes fluorescentes différentes de type CyDyes (Cyanine 2, Cyanine 3, Cyanine 5) pour marquer les protéines extraites d'échantillons biologiques avant de réaliser les gels. En utilisant des sondes différentes, il devient possible de séparer sur un même gel des protéines issues de deux conditions expérimentales différentes (contrôle/traité) et de les révéler en scannant le gel à des longueurs d'onde différentes. Un standard interne est ajouté et migre sur le même gel. Ce standard interne est constitué d'un mélange de protéines provenant des deux conditions différentes (contrôle/traité) et est marqué avec une troisième cyanine (figure I.16).

Cette technique comprend de nombreux avantages : diminution du problème de la variation entre les gels grâce au standard interne présent dans tous les gels ; détection de modifications très faibles de l'expression des protéines ; simplification dans la comparaison des *patterns* d'expression des protéines ; sensibilité accrue (5X plus sensible que l'argent) ; gain de temps pour la détection des spots ; réduction du nombre de gels à réaliser (3 gels suffisent pour avoir des résultats significatifs). Le plus grand inconvénient de cette technique réside dans le coût, principalement au niveau des sondes fluorescentes.

La figure I.17 et la figure I.18 illustrent les différences existant entre la 2-DE classique et la 2D-DIGE.

5.2. La protéomique en écotoxicologie

Les principales études au niveau protéomique concernent le domaine biomédical. Zhou *et al.*, 2002 ont utilisé la 2D-DIGE en combinaison avec la spectrométrie de masse afin d'identifier des protéines qui sont des marqueurs du cancer spécifique des cellules de l'œsophage. Un an plus tard, Knowles *et al.* (2003) ont mis en évidence des différences dans l'expression des protéines entre deux protéomes distincts au sein de la souris.

En ce qui concerne le domaine écotoxicologique, peu d'études existent concernant l'approche protéomique. Nous retiendrons l'étude de Shepard *et al.*, 2000 qui a permis la mise en évidence des « Signatures d'Expression Protéique » (SEP) sur des moules *Mytilus edulis* exposées pendant 7 jours à du Cu, des PCBs, ou encore à une faible salinité. Ils montrèrent l'existence de profils d'expression protéique différents suivant les conditions expérimentales. Cela peut être le reflet de stress spécifiques engendrés par de tels polluants (Shepard *et al.*, 2000).

6) Objectifs

Nos connaissances des effets des PCBs sur les premiers stades de développement larvaire des amphibiens sont peu étendues. Dans ce travail, nous allons étudier les effets d'une mixture de PCBs, l'Aroclor 1254, sur le développement larvaire du *X. laevis* entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour PF.

Tout d'abord, nous étudierons les effets des PCBs sur le taux de survie et sur le poids des larves de xénopes exposées à diverses concentrations d'Aroclor 1254.

Ensuite, nous savons que les PCBs sont responsables de la formation de métabolites radicalaires à l'origine d'un stress oxydant. Leur métabolisation par le cytochrome P4501A engendre également la formation de ROS responsables à leur tour d'un stress oxydant. Ce dernier a été mis en évidence chez diverses espèces (tableau 11 de la partie 2.3.5.2, point 1). Nous rappelons qu'un stress oxydant a été défini comme un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveur des premiers, et source d'effets toxiques potentiels (peroxydation des lipides membranaires, la dégradation de l'ADN et la modification de la régulation de l'expression génique) (Lagadic *et al.*, 1997).

Nous savons également qu'il existe des systèmes de défense enzymatique et non enzymatique pour contrecarrer les effets néfastes des substances polluantes au sein d'un organisme (Lagadic *et al.*, 1997). Dès lors, nous étudierons les effets des PCBs sur ces certains des systèmes de défense. Nous commencerons par caractériser l'état de stress oxydant des têtards par la réalisation de tests TBARS (*thio-barbituric acid reactive substance*). Nous doserons ensuite l'activité de différents systèmes antioxydants.

Enfin, nous avons vu que des perturbations de l'expression d'un ou plusieurs gènes ont été mises en évidence lors de contamination par les PCBs au niveau des premiers stades de vie du xénope. (Jelaso *et al.*, 2002-2003). Ces perturbations peuvent être accompagnées ou non d'altérations du comportement, de malformations et de mortalité. Si ce type d'étude nous permet de mieux comprendre le mode d'action des polluants sur l'expression génique, très peu d'entre elles sinon aucune ne s'attarde sur les effets engendrés au niveau des protéines. Or, cette approche est complémentaire car en plus de variations en ARNm dans les tissus, on assiste à une évolution de l'expression des protéines tout au long de la vie de l'organisme. En effet, une protéine est l'effecteur final résultant de la transcription d'un gène, et peut traduire un large éventail de modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. Dès lors, nous nous focaliserons sur une approche protéomique. Nous tenterons de mettre en évidence, par la technique du 2D-DIGE, une éventuelle modification d'expression des protéines entre un contrôle et une dose sélectionnée suite aux résultats obtenus par l'approche biochimique.

Insistons sur le fait qu'à notre connaissance, aucune analyse protéomique n'a jamais été réalisée en écotoxicologie aquatique par la technique du 2D-DIGE. Cette originalité dans notre travail permettra d'évaluer l'intérêt d'une telle approche pour les problématiques d'écotoxicologie.

Deuxième partie
Matériel et méthodes



Figure II.1: Photo de deux femelles *Xenopus laevis* dans les bacs d'élevage au sein de l'URBO aux Facultés Notre-Dame de la Paix de Namur

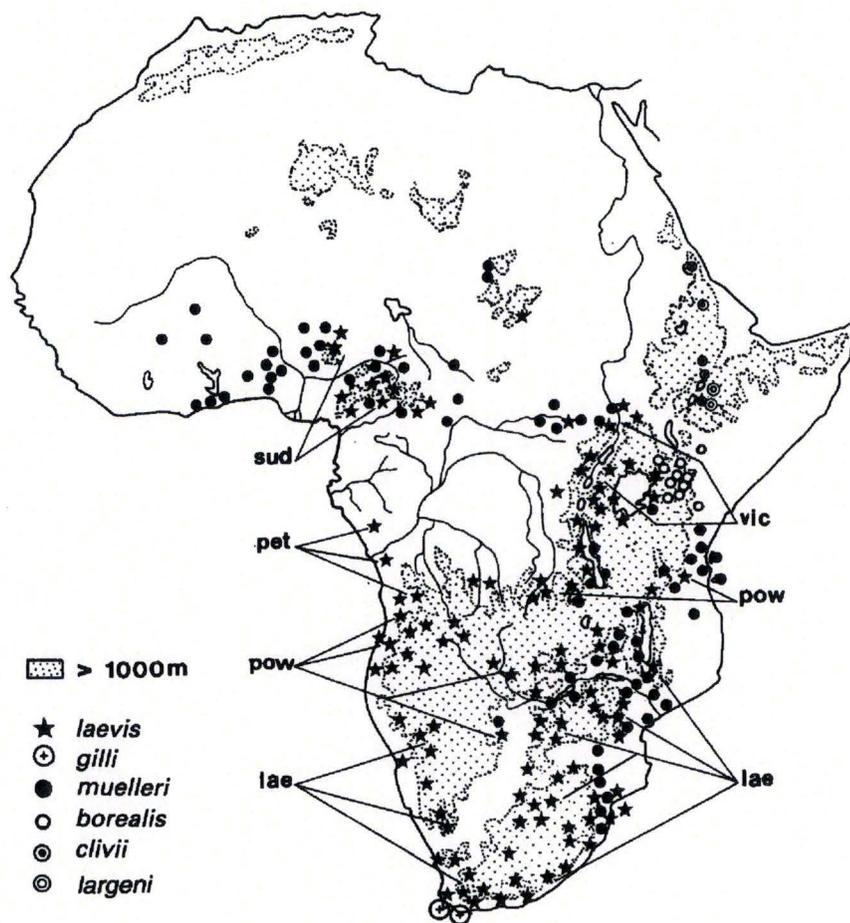


Figure II.2. Distribution géographique des espèces *Xenopus* dans les savanes. Les sous-espèces de *Xenopus laevis* : lae=*laevis* ; pet=*petersi* ; pow=*poweri* ; sud=*sudanensis* ; vic=*victoranius* (dans Tinsley et Kobel, 1996)



Figure II.3. Bacs d'élevages des adultes de xénope *Xenopus laevis* dans les chambres climatisées au sein de l'URBO.

Tableau II.1 : Composition du FETAX-medium réalisé au sein de l'URBO

Composants	Quantités pour un volume de 5 l d'eau distillée
NaCl	3,125 g
NaHCO ₃	480 mg
KCl	150 mg
CaSO ₄ .2H ₂ O	300 mg
MgSO ₄	375 mg
CaCl ₂	75 mg

Matériel et méthodes

1) Choix du modèle d'étude

Notre modèle d'étude est le crapaud d'Afrique du sud : le xénope *Xenopus laevis*. (figure II.1.). Il existe différentes sous-espèces parmi les *Xenopus laevis*. La figure II.2. représente la distribution géographique de celles-ci ainsi que des sous-espèces. *Xenopus laevis* est devenu, avec la souris et le poulet, l'espèce vertébrée la plus couramment utilisée pour la recherche dans le domaine du développement.

Il y a 4 raisons principales qui font que le xénope soit devenu populaire en tant qu'animal de laboratoire. La première est son mode de vie aquatique permanent, ce qui permet de le maintenir dans des bassins d'eau qui sont plus faciles à entretenir que les terrariums nécessaires pour la plupart des autres amphibiens. La deuxième raison est sa remarquable et robuste constitution : il est extraordinairement résistant aux maladies et aux infections. Troisièmement, la possibilité d'obtenir des œufs fertiles à tout moment de l'année par injection de l'hormone chorionique gonadotrope hCG dans les sacs lymphatiques dorsaux. Et pour terminer, une particularité, non pas sans la moindre importance, est son cycle de vie relativement court tel qu'un œuf fertilisé peut croître et devenir un adulte sexuellement reproductible en un an ou moins pour un mâle (Tinsley et Kobel, 1996).

2) Elevage des xénopes

L'élevage est réalisé au sein de l'Unité de Recherche en Biologie des Organismes des FUNDP. Les adultes mâles et femelles de *Xenopus laevis*, provenant du Centre d'élevage des Xénopes l'Université de Rennes, sont maintenus séparément dans des bassins contenant de l'eau déchlorée à 23°C avec une photopériode de 12h de lumière et 12h d'obscurité. Les bassins se trouvent dans des chambres thermostatées (figure II.3.) dont la température est réglée à 25°C. Les adultes sont nourris à raison de deux fois par semaine avec des granulés pour truite et une fois par semaine avec des vers de vase décongelés. L'eau est vidée aux 2/3 tous les deux jours et remplacée par de l'eau déchlorée.

Les œufs fertilisés sont obtenus en injectant le dimanche soir (19h) 800µl d'hormone gonadotrope chorionique humaine (hCG) (Sigma) en sous-cutané au niveau des sacs lymphatiques dorsaux du mâle et de la femelle. Le couple est ensuite placé dans un bac contenant de la solution FETAX-medium (tableau II.1).

3) Traitement des œufs et conditions d'expérimentation

Le but de cette expérience est d'investiguer la toxicité d'une mixture commerciale de PCBs, l'Aroclor 1254, sur le développement embryonnaire et larvaire du xénope *Xenopus laevis* en utilisant un milieu FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus).

3.1. Traitement des œufs

Le matin suivant l'injection d'hCG, les œufs sont présents en grappe dans le bac de ponte. Les œufs (stade 2 à stade 8) sont d'abord dégagés pendant 2 minutes dans une solution de L-cystéine (2 g de cystéines/100 ml de FETAX, pH 8,0). Ensuite, ils sont rincés dans du



Figure II.4. Larves de *Xenopus laevis* au 2^{ème} jour PF

Tableau II.2 : Répartition en triplicat des larves au 2^{ème} jour PF

	1 ^{er} couple : T1	2 ^{ème} couple : T2	3 ^{ème} couple : T3	4 ^{ème} couple : T4
CTL 0	20 X 3	20 X 3	40 X 3	40 X 3
DMSO	20 X 3	20 X 3	40 X 3	40 X 3
100 µg/l	20 X 3	20 X 3	40 X 3	40 X 3
1 mg/l	20 X 3	20 X 3	40 X 3	40 X 3
10 mg/l	20 X 3	20 X 3	40 X 3	40 X 3
total	300 larves	300 larves	600 larves	600 larves

Remarque : CTL 0 = contrôle 0 ; DMSO = contrôle diméthylsulfoxyde ; 100 µg/l, 1 mg/l et 10 mg/l sont les 3 doses d'exposition ; X 3 car c'est en triplicat.

FETAX-medium et triés au binoculaire à l'aide de la table de Nieuwkoop et Faber. Un maximum d'œufs présentant des divisions cellulaires est prélevé et placé dans un grand bac contenant 10 litres de FETAX-medium. Ce dernier est ensuite placé dans une chambre thermostatisée à 25°C.

3.2. Conditions expérimentales

Etant donné qu'il s'agissait d'une toute première tentative de contamination des œufs avec des PCBs, nous avons eu quelques difficultés. C'est sur base de ces échecs ainsi que sur la littérature existante (Jelaso *et al.*, 2002, 2003 ; Zhou *et al.*, 2004) que nous sommes parvenus à mettre au point notre protocole définitif d'expérimentation.

Lors du premier essai, 30 œufs (stade 13) sont placés dans chaque récipient contenant 200 ml de FETAX-medium. Les œufs sont traités avec une mixture de PCBs Aroclor 1254 à deux concentrations : 700 µg/l et 10 mg/l. L'Aroclor 1254 est dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour une concentration finale de 0,25% et ajouté au FETAX-medium dans les récipients. Une condition contrôle (FETAX-medium) et une condition DMSO (le solvant) sont également incluses. Chaque condition est présente en triplicat. Durant l'essai FETAX, la température est maintenue à 23°C, les solutions changées toutes les 24h, les morts enlevés et comptés simultanément, et d'éventuelles malformations sont recherchées. Au bout de 96h, les survivants sont prélevés, fixés dans l'azote liquide et stockés à -80°C. Durant l'expérimentation, les larves ne sont pas nourries. Ce premier essai s'est avéré un échec, car les larves ne se sont pas développées normalement et nous n'avons obtenu qu'entre 9 et 25 larves par condition, y compris chez les témoins, excepté à la dose de 10mg/l, où aucune larve n'a éclos. Or un minimum de 40 larves est requis pour pouvoir réaliser le dosage des biomarqueurs et l'analyse protéomique.

Le problème venant sans doute de la manipulation des œufs lors du triage et du tri en lui-même, nous avons décidé de réduire les étapes en ne dégangeant plus les œufs et en attendant l'éclosion des larves avant de les contaminer. Ce fut également un échec, à savoir une mortalité totale des œufs avant éclosion.

Le protocole définitif est défini comme suit (tableau II.2.): les œufs sont traités comme au point 3.1. et laissés dans un grand bac contenant 10 litres de FETAX jusqu'à éclosion des larves (au bout de 50h). Les larves (2^{ème} jour Post Fécondation PF ; figure II.4) sont placées dans des berlines contenant 200 ml de FETAX-medium. Les œufs sont traités avec une mixture de PCBs Aroclor 1254 à trois concentrations : 100 µg/l, 1 mg/l et 10 mg/l. L'Aroclor 1254 est dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour une concentration finale de 0,25% et ajouté au FETAX-medium dans les récipients. Une condition contrôle (FETAX-medium) et une condition DMSO (solvant) sont également incluses. Chaque condition est présente en triplicat. Durant les contaminations, la température est maintenue à $23,5 \pm 1,1^\circ\text{C}$, les solutions changées toutes les 24h (renouvellement de 80% du milieu afin de compenser la perte de PCB par volatilisation), les morts enlevés et comptés simultanément, et d'éventuelles malformations sont recherchées. A partir du 4^{ème} jour PF, les larves commencent à se nourrir et reçoivent de l'aliment en poudre pour poisson à base de spiruline (Sera micron, 30 ml) durant une période de 24h. Au bout de 72h d'exposition (5^{ème} jour PF), les survivants sont prélevés, fixés dans l'azote liquide et congelés à -80°C. Les expériences sont effectuées 4 fois à l'aide de larves provenant de 4 couples différents.

3.3. Choix des stades et des concentrations en PCBs

Les travaux de Fisher *et al.* (2003) sur le *X. laevis* nous ont appris que les PCBs étaient responsables d'une augmentation accrue de la mortalité pour des têtards exposés du 5^{ème} au 9^{ème} jour PF (exposition à court terme) à de l'Aroclor 1254 (à partir d'une dose de 10 mg/l et plus). Cela était accompagné de diverses malformations. Les travaux de Jelaso *et al.* (2002-2003) ont, quant à eux, mis en évidence des modifications dans l'expression des gènes ainsi que des anomalies comportementales pour des têtards exposés du 11^{ème} au 13^{ème} jour PF (exposition à court terme) à de l'Aroclor 1254 (à partir de 1 mg/l au niveau des gènes et de 10 mg/l pour des effets visibles). Cependant, une même exposition, mais pour des têtards du 5^{ème} au 7^{ème} jour PF ne provoquait que peu d'effets nuisibles.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé de nous intéresser aux toutes premières étapes du développement. Comme l'exposition précoce des œufs (stade 13) fut un échec (point 3.2), nous avons opté pour des larves au 2^{ème} jour PF (éclosion). La durée de contamination (72 h) ainsi que les doses ont également été choisies en fonction de la littérature : peu d'effets sont présents lors d'une contamination de 2 jours alors qu'une contamination de 4 jours provoque des effets néfastes accrus et ce pour une même dose (à partir de 10 mg/l). Le choix de cette durée d'exposition a également été influencée par le temps dont nous disposons pour réaliser nos expériences (1 mois).

4) Le dosage des biomarqueurs de stress oxydant

Nous allons caractériser l'état de stress oxydant de l'organisme par la mesure des taux de TBARS ainsi que par les niveaux d'activité des systèmes antioxydants tels que la catalase (CAT), la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion total (GSH), la glutathion peroxydase (GPx), la glutathion réductase (GR) et la glutathion S-transférase (GST) sur les larves prélevées le 5^{ème} jour PF, issues des différentes conditions et des différents couples.

4.1. Préparation des échantillons

Afin de réaliser les différents dosages, nous devons procéder à l'homogénéisation des échantillons.

A la fin de l'expérimentation, les larves (5^{ème} jour PF) sont épongées sur du papier buvard et pesées à l'aide d'une balance de précision. Elles sont regroupées, par berlin, pour obtenir un poids minimum de 0,18 g afin de disposer de matériel en suffisance pour le dosage des biomarqueurs.

Nous préparons du tampon d'homogénéisation (KH_2PO_4 ; 50 mM ; pH 7,5). Ce tampon est ajouté aux larves à raison de 1 g de tissu dans 5 ml de tampon phosphate afin d'obtenir une dilution 1 : 5 (poids : volume). Auparavant, nous avons ajouté des inhibiteurs de protéase (sigma) au tampon d'homogénéisation (50 μl d'inhibiteur/g tissu à savoir 50 μl dans 5 ml de tampon). Le mélange larves-tampon est homogénéisé à l'aide du potter électrique durant 2 x 25 sec avec un intervalle de 10 sec au cours duquel le tube est refroidi au contact de la glace. Ensuite, nous pesons l'homogénat et nous 'rinçons' avec le tampon d'homogénéisation pour obtenir la dilution désirée.

Nous prélevons 100 μl d'homogénat pour la LPO et 100 μl d'homogénat pour la GSH. Aux 100 μl d'homogénat destiné au dosage de la GSH, nous ajoutons 100 μl de SSA 5% (acide 5-sulphosalicylic 5 %).

Ensuite, les homogénats (excepté celui destiné au dosage de la LPO) sont centrifugés à 1000Xg durant 10 minutes, à température ambiante et les surnageants sont récoltés. Ces

derniers sont aliquotés par 100µl et stockés à -80°C; ils serviront aux dosages des biomarqueurs.

4.2. Dosage de la peroxydation des lipides (LPO)

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

Principe : Une des techniques les plus couramment employées consiste en l'ajout de *Thiobarbituric Acid Reactive Substance* (TBARS) à l'échantillon. Le TBARS réagit avec le MDA et le produit de cette réaction est lu à 535 nm à l'aide d'un spectrophotomètre DU 640 BECKMAN (Fatima *et al.*, 2000). Une courbe de calibration avec des valeurs croissantes en MDA permet de calculer la peroxydation des lipides qui est exprimée en nmol de MDA /g de tissu.

Le protocole détaillé est décrit en annexe 2.

4.3. Dosage du glutathion total (GSH)

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

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

Le protocole détaillé est décrit en annexe 3.

4.4. Dosage de la glutathion peroxydase (GPx)

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



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

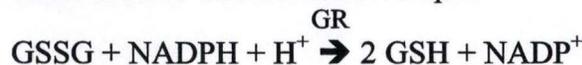
Principe : Le GSSG formé durant la réaction catalysée par la GPx est instantanément et continuellement réduit par un excès d'activité de la glutathion réductase qui fournit ainsi un

niveau constant en GSH. L'oxydation concomitante de NADPH est mesurée photométriquement à 340 nm. L'activité spécifique est exprimée en nmol de NADPH oxydée par minute et par mg de protéine.

Le protocole détaillé est décrit en annexe 4.

4.5. Dosage de la glutathion réductase (GR)

La GR catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Il est essentiel pour le cycle rédox du glutathion de maintenir des taux adéquats en GSH. Le GSH sert d'antioxydant, réagit avec les radicaux libres et les peroxydes organiques, et comme substrat pour la GPx et la GST, respectivement dans la détoxification des peroxydes organiques et dans la métabolisation de certains xénobiotiques.



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

Principe : L'essai est basé sur l'oxydation du NADPH en NADP⁺ catalysée par une concentration limitante en GR. La lecture se fait à 340 nm pendant 5 minutes. L'activité spécifique est exprimée en nmol de NADPH oxydé par minute et par mg de protéine.

Le protocole détaillé est décrit en annexe 5.

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

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



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

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

Le protocole détaillé est décrit en annexe 6.

4.7. Dosage de la superoxyde dismutase totale (SOD)

Les enzymes SOD sont une famille de métalloprotéines. Ces enzymes catalysent la décomposition des radicaux superoxydes en peroxyde d'hydrogène et en oxygène.



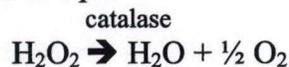
La SOD constitue une défense primaire contre les effets toxiques des superoxydes dans les organismes aérobiques. Différentes isoformes existent. La plupart d'entre elles ont du Cu et Zn dans leur centre catalytique tandis que d'autres formes ont du Mn.

Principe : Nous testons les techniques afin de déterminer l'activité de la SOD totale dans les tissus de larves de xénope. La technique a été adaptée de Mockett *et al.*, (2002). Elle utilise la réaction xanthine-xanthine oxydase pour générer $O_2^{\cdot -}$ et la réduction du nitrobleu tetrazolium (NBT) en formazan bleu comme indicateur de la réaction (lu à 560 nm). La SOD transforme l' $O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 et en conséquence de cela, le NBT réagit avec les ions superoxydes pour former une couleur bleue. L'unité d'activité SOD est définie comme la quantité d'enzyme qui inhibe la réduction du NBT de moitié.

Le protocole détaillé est décrit en annexe 7.

4.8. Dosage de la catalase (CAT)

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



Principe: la méthode commune pour déterminer l'activité de la catalase implique la mesure du changement dans l'absorbance à 420 nm. Les critiques concernant cette méthode incluent l'interférence des UV non spécifiques qui absorbent les matériaux et qui exigent des cuvettes en quartz. Pour cette raison, nous avons testé une méthode colorimétrique. L'oxysulfate de titane ($TiOSO_4$) réagit avec l' H_2O_2 qui n'a pas été réduit par la catalase après 6 min (Baudhuin *et al.*, 1964).

Le protocole détaillé est décrit en annexe 8.

4.9. Dosage des protéines selon la méthode Lowry

Prendre 20 μ l de chaque échantillon et ajouter 480 μ l d'eau distillée dans un tube à essai.

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

Ajouter 5 ml par tube d'une solution comprenant du Na_2CO_3 2 %, du $CuSO_4$ et du Tartrate en proportion 100 ml, 1 ml et 1 ml respectivement et attendre 10 à 15 min

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

Lire l'absorbance à 660 nm.

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

5) L'analyse protéomique

L'objectif de cette étude est de mettre en évidence des variations du protéome, c'est-à-dire du niveau d'expression de l'« ensemble » des protéines d'un organisme suite, à un stress environnemental correspondant ici à une exposition aux PCBs.

Les gels d'électrophorèse 2D constituent des outils classiquement utilisés pour l'analyse protéomique car ils permettent de séparer les protéines provenant d'un organisme, organe, tissu, cellule ou organite cellulaire selon leur point isoélectrique (1^{ère} dimension) et selon leur poids moléculaire (2^{ème} dimension) (Graves et Haystead, 2002). La réalisation des gels 2D se déroule en plusieurs étapes :

Tableau II.3 : Composition du tampon de lyse DLA

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

Tableau II.4 : Préparation des échantillons pour le 2D-DIGE

Gel	Cyanine 2	Cyanine 3	Cyanine 5
Gel 1	25 µg (4,2 µg de chaque échantillon: DMSO T1 ; 1000 T1 ; DSMO T2 ; 1000 T2 ; DMSO T3 ; 1000 T3)	25 µg DMSO T1	25 µg 1000 T1
Gel 2	25 µg (4,2 µg de chaque échantillon: DMSO T1 ; 1000 T1 ; DSMO T2 ; 1000 T2 ; DMSO T3 ; 1000 T3)	25 µg DMSO T2	25 µg 1000 T2
Gel 3	25 µg (4,2 µg de chaque échantillon: DMSO T1 ; 1000 T1 ; DSMO T2 ; 1000 T2 ; DMSO T3 ; 1000 T3)	25 µg 1000 T3	25 µg DMSO T3

Tableau II.5 : Composition du tampon de réhydratation des gels 1D

Concentration finale	
Urée	7 M
Thiourée	2 M
CHAPS	2 %
IPG 4-7	0,5 %
DTT	2,8 %

Tableau II.6 : Composition du tampon de réduction

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

5.1. Préparation des échantillons

Nous choisissons de travailler avec 2 conditions : la condition contrôle DMSO et la condition test correspondant à 1mg/l et cela en triplicat (correspondant aux 3 premières semaines de contamination).

Les échantillons (4 larves de xénope regroupées pour chaque condition) sont placés dans du tampon de lyse DLA (tableau II.3) afin d'obtenir une dilution 1:3 (poids : volume) et homogénéisés (2 X 15 sec sur la glace) à l'aide d'un soniqueur électrique. Les échantillons sont ensuite centrifugés 15 min à 13300 RPM à t° ambiante. La centrifugation enlève les parasites tels que les acides nucléiques. Le surnageant est récupéré et les protéines sont dosées par la méthode Bradford (voir point 5.5.).

Pour réaliser le marquage des protéines aux fluorochromes, les échantillons doivent être marqués par des cyanines avant les électrophorèses. Trois conditions (contrôle, traité et standard interne) sont marquées différemment et migrent sur un même et seul gel.

Pour ce marquage particulier, il est important de vérifier le pH des échantillons sur un papier indicateur et de l'ajuster à 8.5 avec du NaOH 50 mM. Les mélanges des différentes conditions pour la réalisation des 3 gels sont préparés comme expliqué dans le (tableau II.4). 3µl de Cy2 sont ajoutés au standard interne, 1 µl de Cy3 à deux conditions 'contrôle' et à une condition 'traînée', enfin 1 µl de Cy5 est ajouté à la dernière condition 'contrôle' et aux deux autres conditions 'traînée'. Les tubes sont ensuite mélangés et laissés sur glace 30 minutes à l'abri de la lumière. 1 µl de lysine est ajouté par condition et 3 µl pour le standard interne. Les tubes sont à nouveau mélangés et mis sur glace pendant 10 minutes, toujours à l'abri de la lumière. Les solutions sont mélangées dans 3 tubes (un tube par gel), vortexées et stockées à -80°C jusqu'à la réduction.

5.2. Electrophorèse en IEF

Du tampon de réhydratation (tableau II.5) est placé dans les différentes rangées d'un 'Reswelling Tray' (Amersham Biosciences): 450 µl de tampon pour un gel de 24 cm. Le gel 1D est alors placé sur le tampon de réhydratation. Le gel est ensuite recouvert de 'cover fluid' et est laissé à réhydrater pendant 10 à 20 h. Avant de lancer l'électrophorèse, les échantillons vont subir une réduction dans un tampon contenant du DTT. Exactement le même volume de tampon de réduction (tableau II.6) est ajouté au volume d'échantillon et laissé 20 min à t° ambiante. Ensuite, le mélange est centrifugé 10 min à 13000 RPM et le surnageant est prélevé.

Pour le 2D-DIGE, le même volume de tampon de réduction est ajouté dans les microtubes contenant déjà les échantillons marqués avec les cyanines.

Le gel réhydraté est placé dans un 'manifold' (Amersham Biosciences) lui-même placé sur l' 'IPGphor' (Amersham Biosciences). Pour une coloration à l'argent, un volume de 75 µg de protéines est déposé dans la cupule de chargement. Pour le 2D-DIGE, les mélanges contenant les protéines marquées aux cyanines sont chargés entièrement dans la cupule. Pour le gel au Ruthénium, nous chargeons le gel avec 260 µg de protéines au total (en deux fois). Le programme suivi par l'IPGphor est repris dans le tableau II.7.

Tableau II.7 : Programme suivi par l'IPGphor

Pour des gels de 24 cm	
Etape 1 – Step and hold	300 V – 3 h
Etape 2 – Gradient	1000 V – 6 ou 8 h
Etape 3 – Gradient	8000 V – 3 h
Etape 4 – Step and hold	8000 V – 50 000 Vh

Tableau II.8 : Composition du gel en 2^{ème} dimension

	Concentration finale
Acrylamide 30/0,8 %	12,5 %
Tris HCl 1,5 M pH 8,8	0,375 M
SDS 10 %	0,1 %
APS 10 %	0,1 %
TEMED 10 %	0,0139 %

Tableau II.9 : Composition du tampon d'équilibration

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

Tableau II.10 : Composition du tampon d'électrophorèse

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

Tableau II.11 : Composition de la solution de fixation

	Concentration finale
Ethanol	40 %
Acide Acétique	10 %

Tableau II.12 : Composition de la solution d'incubation

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

Tableau II.13 : Composition de la solution de coloration à l'argent

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

Tableau II.14 : Composition de la solution 'Developing'

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

Tableau II.15 : Composition de la solution Stop

	Concentration finale
EDTA	14,6 g/l

5.3. Electrophorèse SDS-PAGE

La solution acrylamide (tableau II.8) est préparée au moins 1 h à l'avance. L'APS et le TEMED sont préparés juste avant l'utilisation. Nous préparons une gel 12,5 %. La solution acrylamide est coulée dans le 'catser' jusqu'à 0,5 cm du bord des plaques. Environ 1 ml de butanol saturé d'eau est versé sur le dessus de chaque gel afin d'empêcher tout contact avec l'oxygène et permettre la polymérisation. Le gel 1D est placé dans la solution d'équilibration (tableau II.9) deux fois 15 min. Les 15 premières minutes, le gel est placé 5 ml de tampon d'équilibration (comprenant du SDS) auquel a été ajouté du DTT 1%. Les 15 autres minutes, le gel est placé dans 5ml de tampon d'équilibration comprenant de l'iodoacétamide 2,5%. Les plaques comprenant les gels sont ensuite placées dans la cuve à électrophorèse remplie de tampon d'électrophorèse (tableau II.10). La migration s'effectue durant 17 h et le programme est réglé sur 1W/gel.

5.4. Révélation

5.4.1. Coloration à l'argent

Après avoir été démoulés, les gels sont placés dans une solution de fixation (tableau II.11) sous la hotte durant 30 minutes. La solution de fixation est éliminée et remplacée par une solution d'incubation (tableau II.12). Les gels sont placés dans cette solution au minimum 1h et/ou toute la nuit. Après avoir été rincés 3 fois 10 minutes avec de l'eau distillée, les gels sont laissés dans une solution d'argent (tableau II.13) pendant 30 minutes, à l'abri de la lumière. Les gels sont à nouveau rincés 2 fois 10 minutes à l'aide de l'eau ultra pure (milliQ). Ensuite, ils sont placés dans la solution de 'developing' (tableau II.14) environ 8 minutes, jusqu'à ce que les spots soient bien visibles. La révélation des spots est arrêtée par l'incubation dans une solution 'stop' (tableau II.15), enfin les gels sont rincés 3 fois 5 minutes dans de l'eau. Les gels sont scannés à l'aide du logiciel ImageMasterTM2D.

5.4.2. Révélation et analyse en 2D-DIGE

Une fois la migration en 2D terminée, les plaques sont enlevées, rincées avec de l'eau milliQ et placées dans le scanner Typhoon 9400. Chaque gel est scanné à 3 longueurs d'onde spécifiques aux 3 cyanines (Cy2, Cy3 et Cy5). Une image par longueur d'onde est enregistrée. Les 3 gels scannés aux 3 longueurs d'ondes sont analysés par le programme DeCyder 6. Ce programme va tout d'abord dénombrer les spots pour chacun des 3 gels et définir un gel *master* qui servira de référence afin de normaliser les deux autres. La moyenne des 3 gels contrôles et la moyenne des 3 gels tests sont comparées spot par spot. Les spots présentant des variations d'expression (sur- ou sous-expression) sont répertoriés dans une liste qui permettra de sélectionner les protéines d'intérêt. Les coordonnées de ces protéines doivent être envoyées au spot picker qui extraira les protéines d'intérêt. Mais pour cela un autre gel doit être réalisé (5.4.3).

5.4.3. Marquage au Ruthenium

Un autre gel marqué, cette fois, au Ruthenium et chargé deux fois plus en protéines (260 µg), est nécessaire afin de pouvoir en extraire les protéines d'intérêt.

Après avoir été démoulés, les gels sont fixés dans une solution contenant 30 % d'éthanol et 10 % d'acide acétique pendant 6 h. Ils sont ensuite rincés 3 fois 30 min dans un bain d'éthanol 20 % avant d'être incubés toute une nuit dans de l'éthanol 20 % auquel du Ruthenium a été

Tableau II.16 : Liste des produits utilisés en protéomique

Produit	Firme
Glycine	Amersham Plus One
Urée	Amersham Plus One
SDS	Amersham Plus One
CHAPS	Amersham Plus One
APS	BioRad
TEMED	BioRad
Tris	Fluka
DDT pour électrophorèse	Sigma
Glycérol 87 %	Merck
Acryl/bis 30 %- 0,8 %	BioRad
AgNO ₃	Merck
Thiourée	Sigma
Inhibiteurs de protéase	Sigma
IPG buffer 4-7	Amersham
Iodoacétamide	Acros
Agarose	Amersham Biosciences
Isobutanol	Merck
Na acetate.3H ₂ O	Merck
Acide Acétique	Merck
Ethanol	Merck
Na ₂ S ₂ O ₃ .5H ₂ O	Merck
Na ₂ CO ₃	Merck
2-D clean-up kit	Amersham
Glutaraldéhyde	Fluka
Formaldéhyde	Sigma
EDTA	Merck
Ruthénium	Ulg
IPG	Amersham Biosciences
Cover Fluid	Amersham Biosciences

ajouté (10µl pour 1,5 l) à l'abri de la lumière. Les gels sont ensuite équilibrés 2 fois 10 min dans de l'eau distillée et scannés au moyen du Typhoon 9400. L'analyse des gels se fait par le programme DeCyder 6.

Après cette étape, les protéines d'intérêt sont extraites au spot picker et peuvent être identifiées par spectrométrie de masse

La liste des produits utilisés se trouve dans le tableau II.16.

5.5. Dosage des protéines selon la méthode Bradford

10 mg d'albumine de sérum bovin (BSA) sont ajoutés à 1 ml d'eau puis dilués 10 fois dans du tampon de lyse DLA (tableau II.4). Une courbe d'étalonnage est réalisée avec 1 blanc spectrophotomètre (tampon de lyse DLA) et des concentrations croissantes en BSA, le tout dans 1ml de solution Biorad diluée 5 fois. Ensuite, l'absorbance des échantillons (1 et 5 µl) est lue au spectrophotomètre à 595 nm.

6) Dosage des PCBs dans les tissus des larves de *X. laevis*

Les PCBs ont été dosés sur des larves prélevées le 5^{ème} jour PF et provenant uniquement du 3^{ème} couple.

Les dosages ont été réalisés par le Laboratoire d'Ecologie Aquatique et Ecotoxicologie du Professeur Jean-Pierre Thomé à l'Université de Liège.

Le protocole complet est détaillé en annexe 9.

7) Traitement statistique des données

Les données brutes sont encodées et traitées dans le logiciel Excel (Microsoft). L'analyse statistique est effectuée à l'aide du logiciel STATISTICA. Un test paramétrique est effectué par la méthode de l'analyse de la variance à un critère (ANOVA I). Un seuil de probabilité significatif de 5 % est utilisé. L'homogénéité des variances est vérifiée par le test de Hartley-Bartlett et la normalité de la distribution des points est vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Afin de déterminer quel traitement diffère des autres, les tests LSD et HSD de Tuckey sont employés. Lorsque les variances ne sont pas homogènes, une transformation logarithmique des valeurs est effectuée. Si cette transformation ne permet toujours pas d'obtenir des variances homogènes, un test non paramétrique de type Kruskal-Wallis est alors effectué.

Pour terminer, la puissance de notre test est contrôlée en calculant le risque β et le risque α à l'aide du logiciel G*POWER (www.psych.uni-duesseldorf.de/aap/projects/gpower/).

Troisième partie

Résultats

Chers lecteurs,

Veillez m'excuser pour un désagrément survenu lors de l'impression du mémoire : en effet, les résultats sont imprimés en recto-verso suite à une erreur de la personne chargée de l'impression.

Bonne lecture,

Céline DIVOY

Résultats

Pour rappel, l'objectif de ce travail est d'étudier les effets des PolyChloroBiphényles sur les premières étapes du développement larvaire du xénope *X. laevis* aux niveaux biochimique et protéomique.

1) Effet d'une exposition à des PCBs sur le taux de survie et le poids des larves

1.1. Rappel du protocole expérimental

Des larves de xénope ont été contaminées par une mixture de PCBs Aroclor 1254 du 2^{ème} jour post-fécondation (PF) au 5^{ème} jour PF, à l'aide de 3 doses ajoutées dans le milieu FETAX : 100 µg/l, 1 mg/l et 10 mg/l. Un contrôle 0 comprenant uniquement du milieu FETAX et un contrôle solvant (DMSO) étaient également présents. Les larves étaient réparties en triplicat pour chaque condition et l'expérience fut répétée 4 fois à l'aide de têtards provenant de couples différents. Le 5^{ème} jour PF, les survivants ont été prélevés, fixés dans l'azote liquide et stockés à -80°C.

1.2. Taux de survie

Le nombre de survivants a été enregistré pour les larves issues des différentes conditions et des quatre semaines d'expérimentation. Un minimum de 4 observations pour chaque condition nous a permis, sur base d'un calcul des moyennes et des écarts-types, de caractériser l'évolution de la survie (figure III.1.). Nous pouvons observer un taux de survie élevé en ce qui concerne les 4 premières conditions : $92,5 \pm 4,5$ % pour le contrôle 0, $90,9 \pm 3,6$ % pour le contrôle DMSO, $93,1 \pm 5,2$ % pour la dose 100 µg/l et $89,7 \pm 5,1$ % pour la dose 1000 µg/l. Par contre, un taux de survie de $29,2 \pm 38,1$ % est observé dans le groupe 10000 µg/l. Aucune différence significative n'a pu être décelée par les tests statistiques.

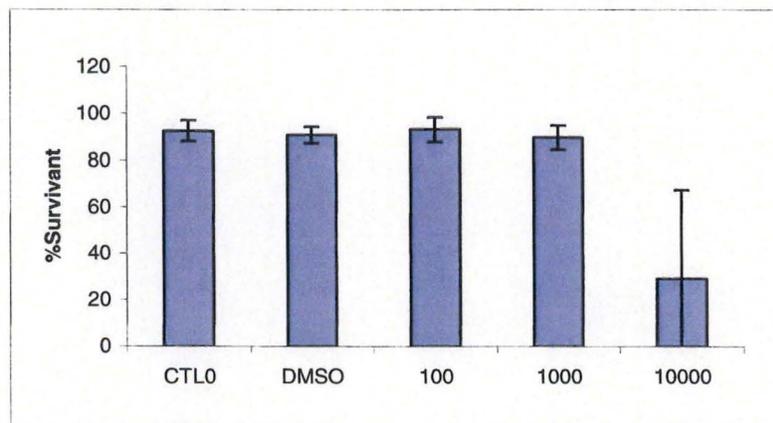


Figure III.1. Taux de survie moyen des larves pour chacune des différentes conditions. Les valeurs sont exprimées en pourcentage. CTL 0 = contrôle 0, DMSO= diméthylsulfoxyde, 100 = 100µg/l, 1000 = 1000 µg/l, 10000 = 10000 µg/l

Une évolution de la survie des larves (5^{ème} jour PF) en fonction des semaines de contamination nous montre une variabilité importante en ce qui concerne la dernière dose

(10000 $\mu\text{g/l}$). Un taux de survie de 80,3% était enregistré pour la première semaine d'exposition alors qu'à la deuxième semaine, ce taux n'était plus que de 36,5%, et une mortalité totale des xénopes a été observée lors des deux dernières semaines.

La figure III.2. illustre l'évolution temporelle de la survie, en fonction des traitements. Nous n'observons pas de mortalité importante lors des 2 premiers jours. C'est au cours du 3^{ème} jour d'exposition que la mortalité apparaît de façon accrue parmi les têtards issus du groupe 10000 $\mu\text{g/l}$.

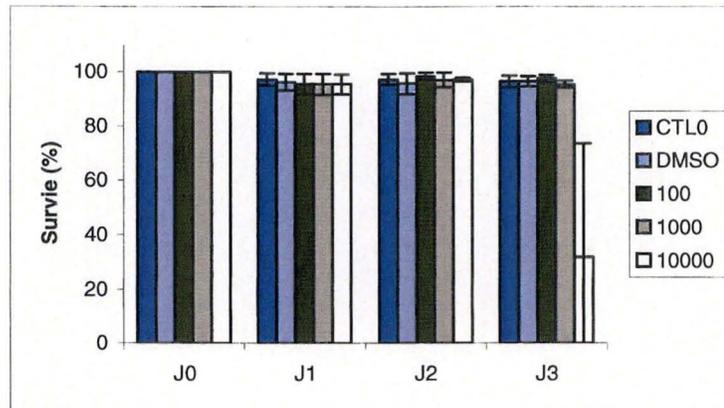


Figure III.2. Evolution du taux de survie moyen des larves en fonction du temps.

1.3. Poids

La figure III.3. nous présente l'évolution des poids des larves au 5^{ème} jour PF en fonction des différents traitements. Une tendance à une diminution du poids corrélée à l'augmentation des doses est observée dans les conditions traitées par rapport au contrôle 0. En effet, le poids passe de $6,1 \pm 0,7$ mg pour le contrôle 0 à $5,6 \pm 0,4$ mg ; $4,3 \pm 0,5$ mg et $3,8 \pm 0,14$ mg respectivement pour les groupes 100, 1000 et 10000 $\mu\text{g/l}$. Pour ce dernier groupe, le poids des larves est issu des deux premières manipulations, la mortalité étant de 100 % dans les deux autres expérimentations (voir point 1.2). Nous avons réussi à mettre en évidence une différence significative entre les différentes conditions (ANOVA, $p < 0,05$). Le test LSD a permis de révéler une différence significative entre la dose 1 mg/l et les groupes contrôle 0, DMSO et 100 $\mu\text{g/l}$. Une autre différence significative a été mise en évidence entre le groupe 10000 $\mu\text{g/l}$ et les 3 premiers traitements (figure III.3.). Cependant, nous restons prudents quant à cette dernière interprétation, les mesures portant sur 2 semaines.

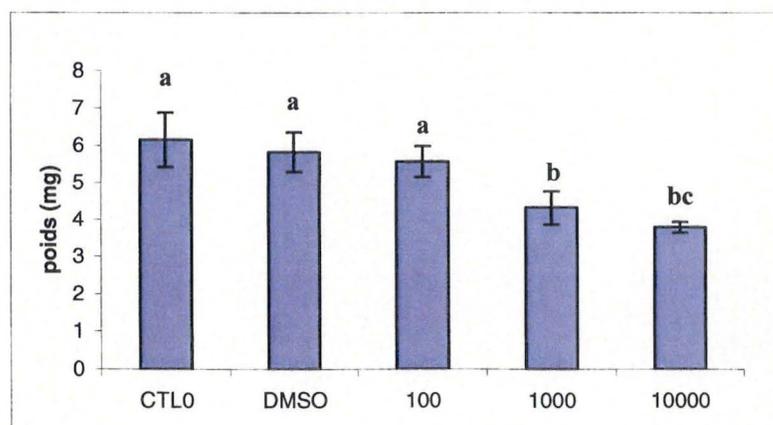


Figure III.3. Poids moyen d'une larve de xénope (5^{ème} jour PF) pour chacune des 5 conditions et pour l'ensemble des expérimentations. Les traitements qui partagent au moins une lettre (a,b) ne sont pas significativement différents ($n = 4$, sauf pour 10000 où $n = 2$ mortalité totale à J5 PF lors des essais T3 et T4)

Le suivi du poids des larves en fonction des différentes semaines nous montre que la tendance reste la même à travers les diverses manipulations (figure III.4.). Notons que lors de la 1^{ère} semaine, les poids sont les plus faibles par rapport aux autres semaines.

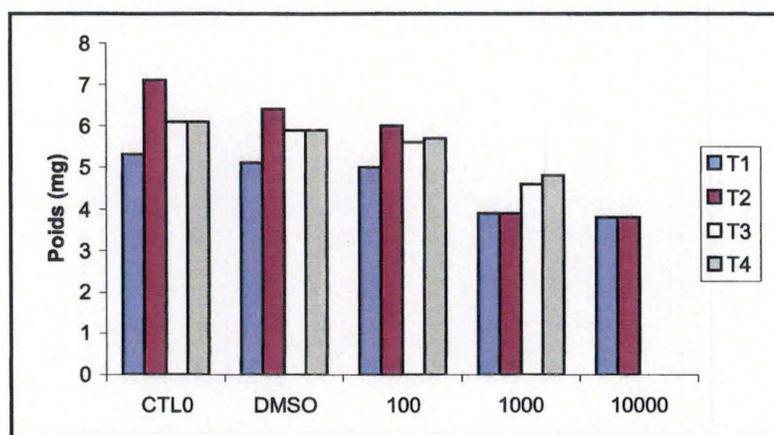


Figure III.4. Poids moyen d'une larve (5^{ème} jour PF) en fonction des conditions et suivant les semaines d'expérimentation. CTL 0 = contrôle 0 ; DMSO = contrôle solvant ; 100 = 100 µg/l ; 1000 = 1 mg/l ; 10000 = 10 mg/L ; T1 = 1^{ère} expérimentation ; T2 = 2^{ème} expérimentation ; T3 = 3^{ème} expérimentation ; T4 = 4^{ème} expérimentation

2) Dosage des biomarqueurs de stress oxydant

Pour rappel, 40 à 50 larves de chaque condition (CTL 0, DMSO, 100, 1000 et 10000 µg/l) ont été prélevées et homogénéisées afin de mettre en évidence d'éventuels effets sur les biomarqueurs sélectionnés. Un minimum de 4 répétitions ($n = 4$ excepté pour 10000 où $n = 2$) pour chaque condition nous a permis, sur base d'un calcul des moyennes et des écarts-types, de déterminer les activités dans les organismes. Nous resterons prudents quant aux résultats obtenus pour le groupe 10000 µg/l.

2.1. Dosage de la peroxydation lipidique (LPO)

La peroxydation lipidique a été déterminée par la mesure de la quantité de TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances) dans les organismes entiers en fonction des différentes conditions d'expérimentation (figure III.5.).

Aucune différence significative n'a pu être décelée par l'ANOVA ($p=0,173$). Nous observons toutefois une tendance à une augmentation de la peroxydation lipidique jusqu'à la dose 1000 µg/l, soit de $166,7 \pm 61,55$ nmol MDA/g tissu pour la dose 100 µg/l à $218,8 \pm 70,4$ nmol MDA/g tissu pour 1000 µg/L suivie d'une diminution pour la dose 10000 µg/l ($119,4 \pm 29,7$ nmol MDA/g tissu).

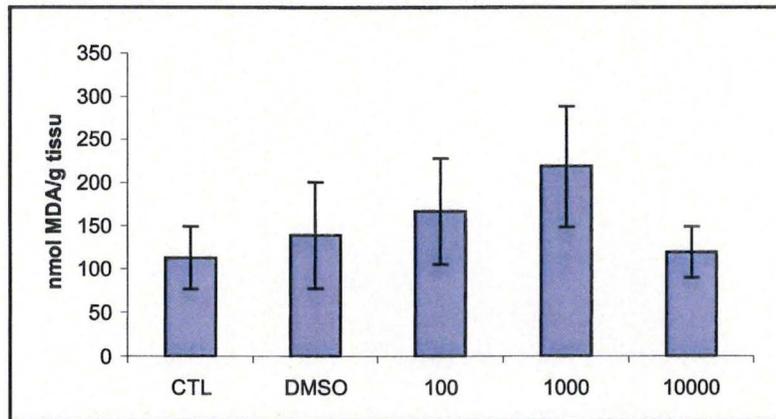


Figure III.5. Taux de TBARS au niveau de l'organisme en fonction de différentes conditions et pour l'ensemble des expérimentations.

La puissance de notre test a été calculée par le logiciel G*POWER. Elle est de $1-\beta = 0,4832$. La puissance est très faible. Par conséquent, nous avons 52 % de risque de ne pas voir une différence alors qu'elle est présente. Notre test étant peu puissant, nous risquons de passer à côté d'un effet alors qu'il y en a un. Pour avoir 80 % de chance de mettre en évidence une différence, nous avons calculé qu'il faudrait un 'n' égal à 28, c'est-à-dire 3 répétitions en plus tout en gardant un risque α de 5 % et en postulant que les moyennes et les variabilités restent inchangées.

De plus, une évolution de la LPO en fonction des semaines et à travers toutes les conditions nous apprend que la LPO pour le groupe 1000 $\mu\text{g/l}$ est toujours supérieure au contrôle 0 ainsi qu'au contrôle DMSO (figure III.6.). Nous observons également que les valeurs de la peroxydation lipidique sont plus élevées lors de la 3^{ème} expérimentation par rapport aux valeurs des autres semaines alors qu'au cours de la deuxième semaine, les taux de LPO sont les plus faibles.

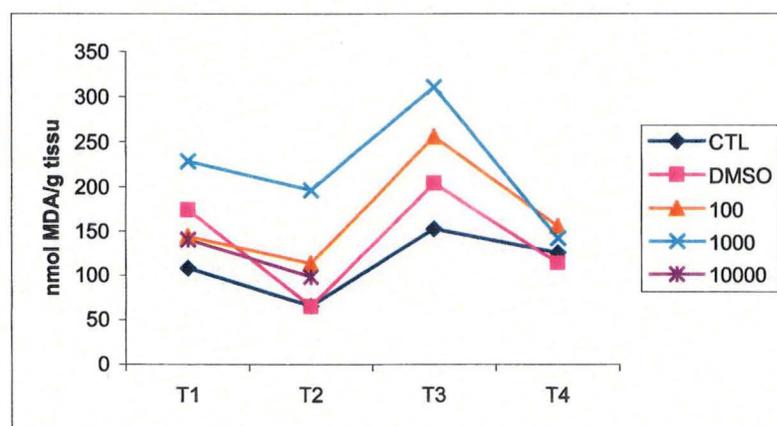


Figure III.6. Evolution de la LPO (nmol MDA/ g tissu) en fonction des semaines d'expérimentation et de la condition traitée.

2.2. Dosage du glutathion total (GSH)

Dans l'ensemble, les taux de GSH restent constants parmi les différents traitements, excepté pour le groupe 100 $\mu\text{g/l}$ où nous observons une légère diminution des taux de GSH (figure III.7.). Les contenus moyens en glutathion total (GSH) varient entre 127,9 et 192,3 nmol de GSH/g tissu, avec des valeurs minimales de 65,4 nmol de GSH/g tissu et des valeurs maximales de 266,8 nmol de GSH/g tissu. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les traitements.

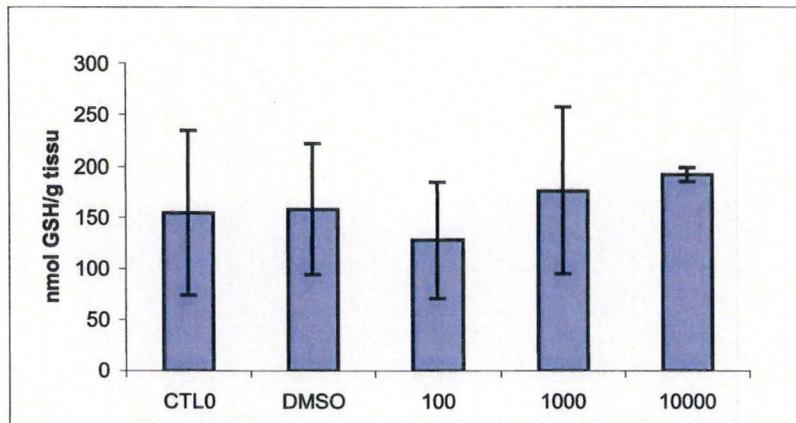


Figure III.7. Mesure du glutathion total en nmol de GSH/ g tissu en fonction des différentes conditions et pour l'ensemble des expériences

L'évolution du glutathion total en fonction des conditions et suivant les semaines d'exposition (figure III.8.) nous montre que c'est au cours de la deuxième semaine que les taux en GSH sont les plus élevés. Cette tendance va dans le sens contraire de celle rencontrée pour de la LPO où les valeurs étaient les plus faibles au cours de cette deuxième semaine.

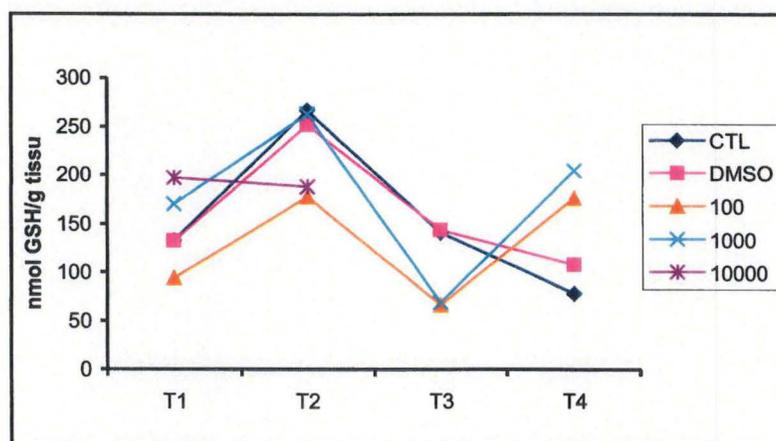


Figure III.8. Evolution du glutathion total (nmol GSH/g tissu) en fonction des différentes semaines d'exposition et suivant le traitement appliqué.

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

Globalement, l'activité de cette enzyme reste constante à travers les différents traitements (figure III.9.) et aucune différence significative n'a pu être mise en évidence par nos tests statistiques même pour la dernière dose où l'activité semble plus élevée que le contrôle 0 (28 ± 13 nmol NADPH/min/mg prot). Nous obtenons en effet une activité de 42 ± 11 nmol NADPH/min/mg prot pour la dose 10000 $\mu\text{g/l}$.

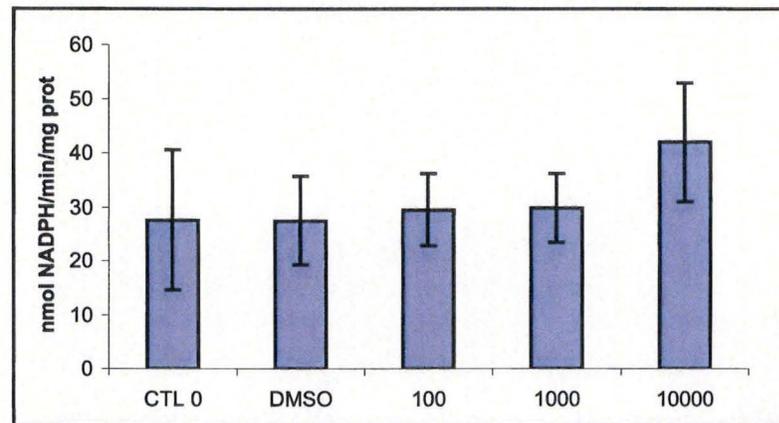


Figure III.9. Activité de la glutathion peroxydase (nmol NADPH/min/g prot) en fonction des différentes conditions et pour l'ensemble des expériences.

2.4. Dosage de l'activité de la glutathion réductase (GR)

Nous n'observons pas de modification apparente de l'activité de cette enzyme à travers les diverses conditions (figure III.10.). L'activité moyenne de la glutathion réductase (GR) passe de 8,13 à 9,57 nmol NADPH/min/mg prot avec des valeurs minimales de 6,49 nmol NADPH/min/mg prot pour le contrôle 0 et des valeurs maximales de 11,85 nmol NADPH/min/mg prot concernant la dose 1000 $\mu\text{g/l}$. Les tests statistiques n'ont pas révélé de différence significative entre les différents traitements.

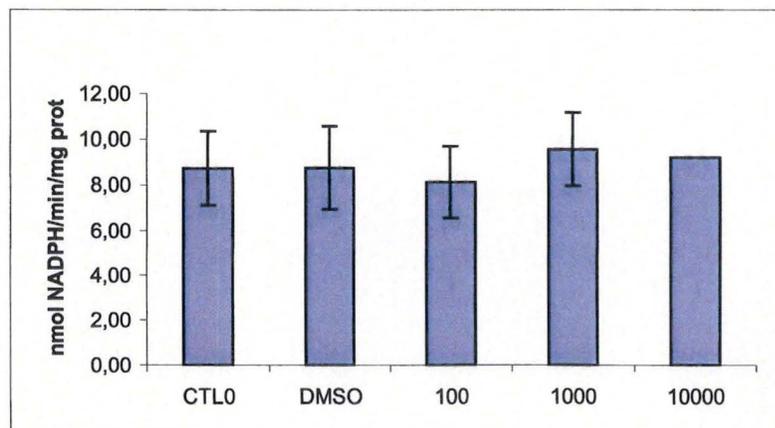


Figure III.10. Activité de la glutathion réductase (nmol NADPH/min/mg prot) en fonction des différentes conditions et pour l'ensemble des expériences (n=1 pour 10mg/l)

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

L'activité de la GST ne semble pas être modifiée pour les trois premiers traitements (CTL0, DMSO et 100 $\mu\text{g/l}$) ainsi que pour le dernier (10000 $\mu\text{g/l}$) (figure III.11.). Par contre, nous observons une augmentation de l'activité de la GST pour le groupe 1000 $\mu\text{g/l}$. En effet, l'activité passe de 1357 ± 289 pour le contrôle 0 à 2233 ± 452 nmol CDNB/min/mg de protéine pour la dose 1000 $\mu\text{g/l}$. Le test ANOVA montre qu'il existe une différence significative entre les différents traitements ($p < 0,05$). Les tests LSD et HSD de Tukey indiquent que cette différence se marque en faveur du groupe 1000 $\mu\text{g/l}$ par rapport aux 4 autres groupes.

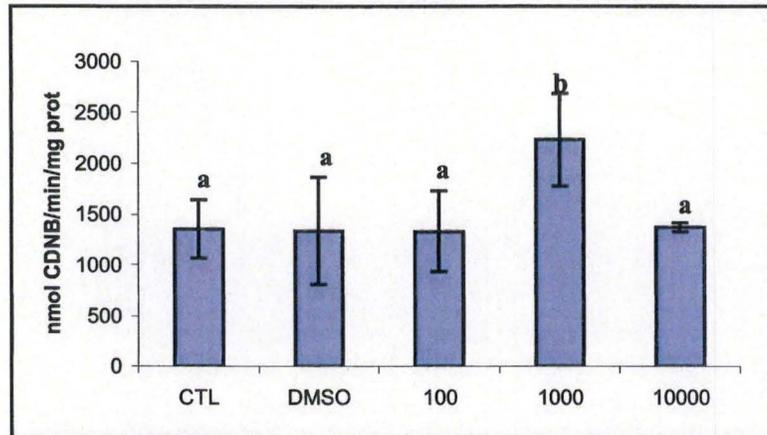


Figure III.11. Activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg prot) en fonction des différentes conditions et pour l'ensemble des expériences. Les traitements qui partagent au moins une lettre (a,b) ne sont pas significativement différents.

La figure III.12. illustre l'évolution de l'activité de la GST pour les différents traitements en fonction des semaines d'expérimentation. Les données ne sont pas très explicites, mais nous observons cependant que l'activité de la GST pour la dose 1000 $\mu\text{g/l}$ est toujours supérieure aux autres groupes. C'est au cours de la dernière semaine que l'activité semble la plus élevée pour l'ensemble des traitements.

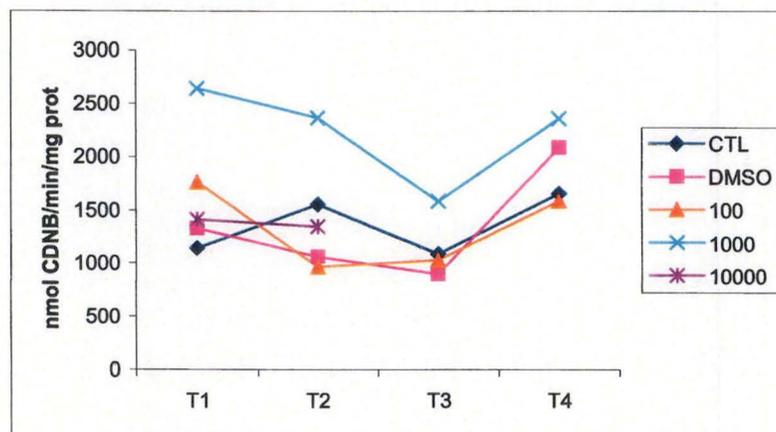


Figure III.12. Evolution de l'activité de la glutathion S-transférase (nmol CDNB/min/mg de protéine) en fonction des différentes semaines de contamination et suivant le traitement.

2.6. Dosage de l'activité de la superoxyde dismutase totale (SOD)

L'activité de la SOD passe de $76,2 \pm 37,3$ U/mg prot pour le contrôle 0 à $117,2 \pm 46,7$ U/mg prot pour le groupe DMSO (figure III.13.). L'activité moyenne de la SOD semble plus élevée pour le groupe 1000 $\mu\text{g/l}$ par rapport à la condition 0 suivie d'une diminution pour le traitement à 10000 $\mu\text{g/l}$. En effet, l'activité est de $149,0 \pm 86,0$ U/mg prot pour la dose 1000 $\mu\text{g/l}$ et de $108,0 \pm 32,5$ U/mg prot pour le groupe 10000 $\mu\text{g/l}$. Cependant, la variabilité étant très importante au sein des traitements, et plus particulièrement pour le groupe 1000 $\mu\text{g/l}$, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence ($p=0,197$).

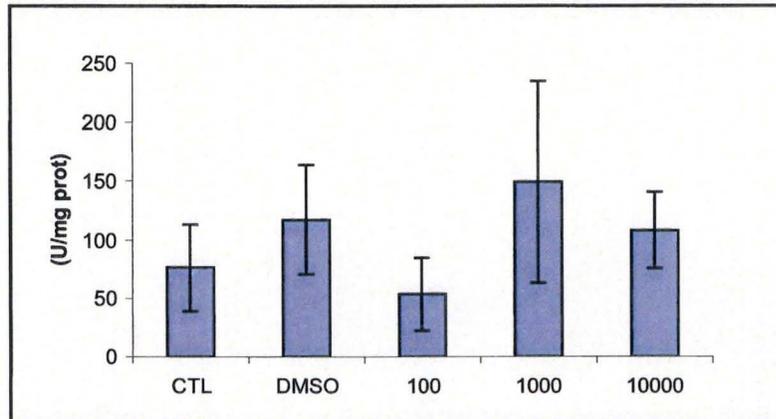


Figure III.13. Activité de la superoxyde dismutase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions et pour l'ensemble des expériences.

La puissance de notre test a été calculée par le logiciel G*POWER, elle est de 0,5395 ce qui signifie que nous avons 46 % de risque de ne pas voir une différence alors qu'elle est présente. Pour avoir 80 % de chance de mettre en évidence une différence, nous avons calculé qu'il faudrait un 'n' égal à 25, c'est-à-dire 2 répétitions en plus tout en gardant un risque α de 5 % et en postulant que les moyennes et les variabilités restent inchangées.

2.7. Dosage de l'activité de la catalase (CAT)

Par rapport aux contrôles 0 ($0,0071 \pm 0,0014$ U/mg prot) et DMSO ($0,0068 \pm 0,0025$ U/mg prot), l'activité de la catalase semble plus faible en ce qui concerne la dose 100 $\mu\text{g/l}$ ($0,0052 \pm 0,0017$ U/mg prot) (figure III.14.). Nous observons une tendance à une augmentation pour les deux derniers traitements. Cependant, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les différents traitements.

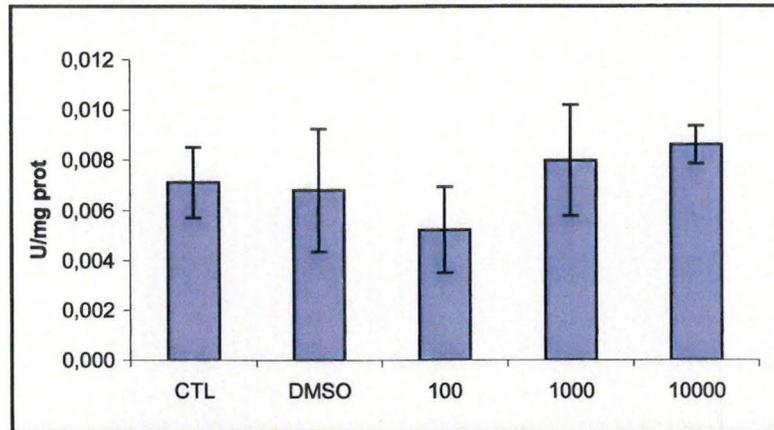


Figure III. 14. Activité de la catalase (U/mg prot) en fonction des différentes conditions et pour l'ensemble des expériences.

3) Dosage des PCBs dans les tissus de larves de xénopes

Le dosage des PCBs a été réalisé sur des larves (5^{ème} jour PF) issues de la troisième semaine d'expérimentation (T3). Le tableau III.1. présente les concentrations en équivalent d'Aroclor 1254 ($\mu\text{g/g}$) par rapport au poids frais et par rapport au poids de lipides des têtards.

Tableau III.1. Concentrations en PCBs (équivalent en Aroclor 1254) mesurées dans les tissus de xénopes. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{g/g}$ de poids frais et en $\mu\text{g/g}$ de lipides.

Echantillon	$\mu\text{g/g}$ de poids frais	$\mu\text{g/g}$ de lipides
CTL 0 T3	6,75	2669
DMSO T3	5,70	1737
100 $\mu\text{g/l}$ T3	51,41	13693
1000 $\mu\text{g/l}$ T3	180,01	39653
10000 $\mu\text{g/l}$ T3	434,50	76911

Les contrôles 0 et DMSO présentent de faibles niveaux en PCBs dans les tissus. Une contamination à l'Aroclor 1254 semble induire une augmentation dose-dépendante des PCBs dans les tissus de tous les organismes. Les têtards (70 individus regroupés) exposés à une faible concentration en Aroclor 1254 (100 $\mu\text{g/l}$) contiennent 51,41 $\mu\text{g/g}$ et 13693 $\mu\text{g/g}$ en équivalent d'Aroclor par rapport au poids frais et au poids de lipides respectivement. Les individus (pool de 70 larves) issus de la dose 1000 $\mu\text{g/l}$ contiennent 180,01 $\mu\text{g/g}$ et 39653 $\mu\text{g/g}$ en équivalent d'Aroclor par rapport au poids frais et au poids de lipides. En ce qui concerne la dose 10000 $\mu\text{g/l}$, les PCBs n'ont pas été dosé sur des survivants mais sur des individus déjà morts avant le prélèvement au 5^{ème} jour PF.

4) Approche protéomique en gels 2D-DIGE

Etant donné les résultats obtenus avec les biomarqueurs, nous avons choisi d'étudier la condition 1 mg/l. En effet, la mortalité était trop importante à une concentration de 10 mg/l et un effet GST a été mis en évidence pour le groupe 1 mg/l. Vu le coût des sondes fluorescentes, nous avons d'abord réalisé des gels préliminaires colorés à l'argent. Ces gels nous ont permis de maîtriser la technique, de sélectionner les meilleures conditions

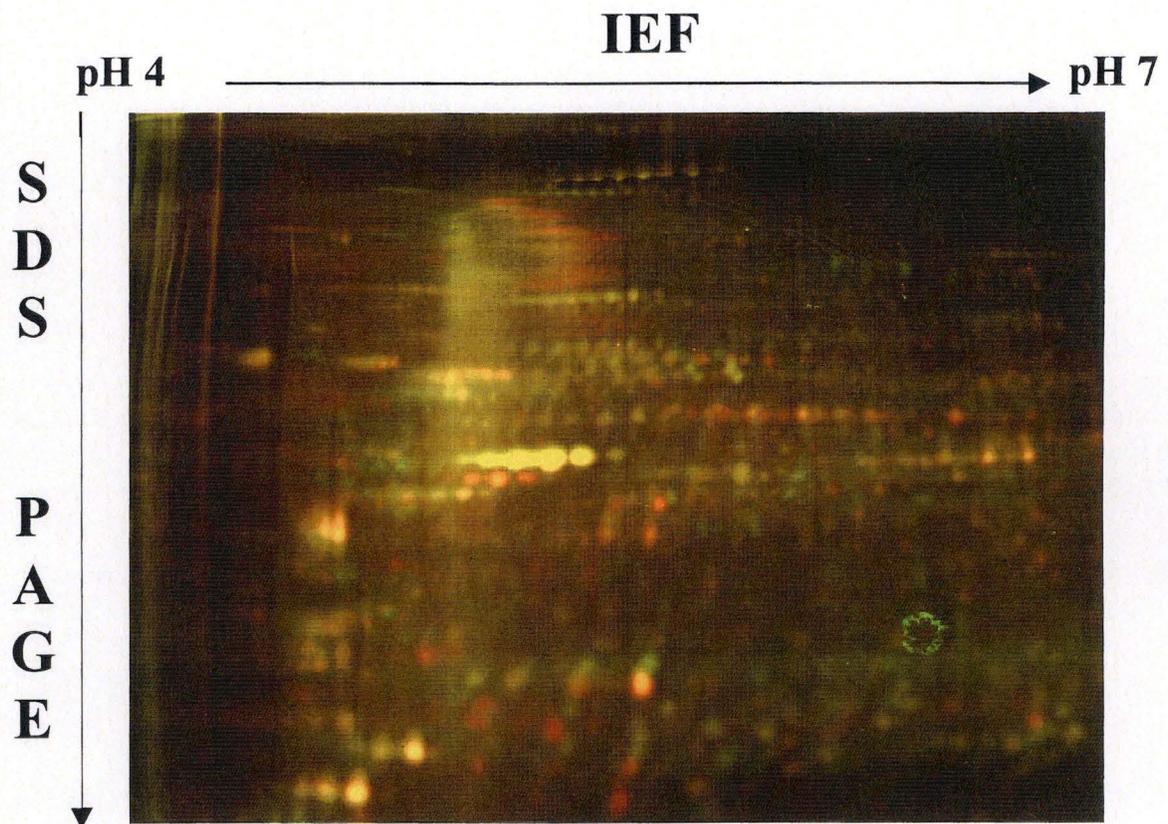


Figure III.15. Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE scanné au moyen du scanner Typhoon 9400 aux longueurs d'onde spécifiques des cyanines. Les échantillons de ce gel proviennent de larves issues de la semaine T1. (IEF : isoelectric focusing ; SDS PAGE : Sodium Docecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

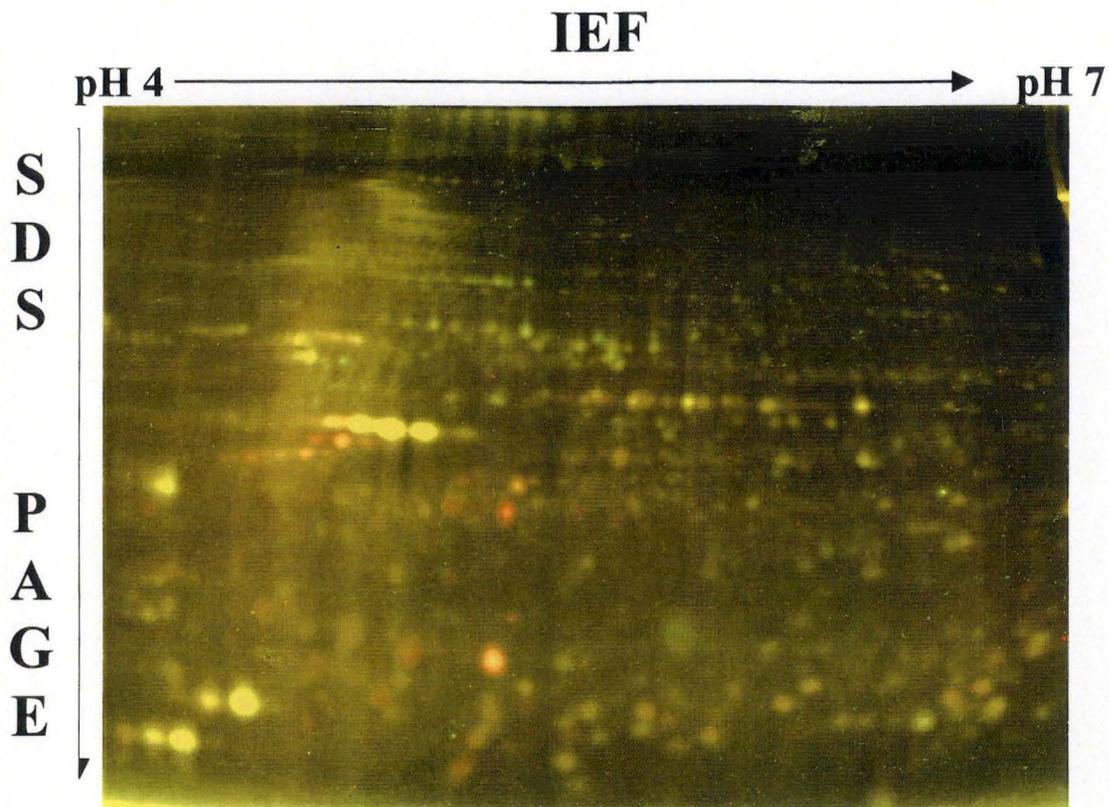


Figure III.16. Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE scanné au moyen du scanner Typhoon 9400 aux longueurs d'onde spécifiques des cyanines. Les échantillons de ce gel proviennent de larves issues de la semaine T2. (IEF : isoelectric focusing ; SDS PAGE : Sodium DocecyL Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

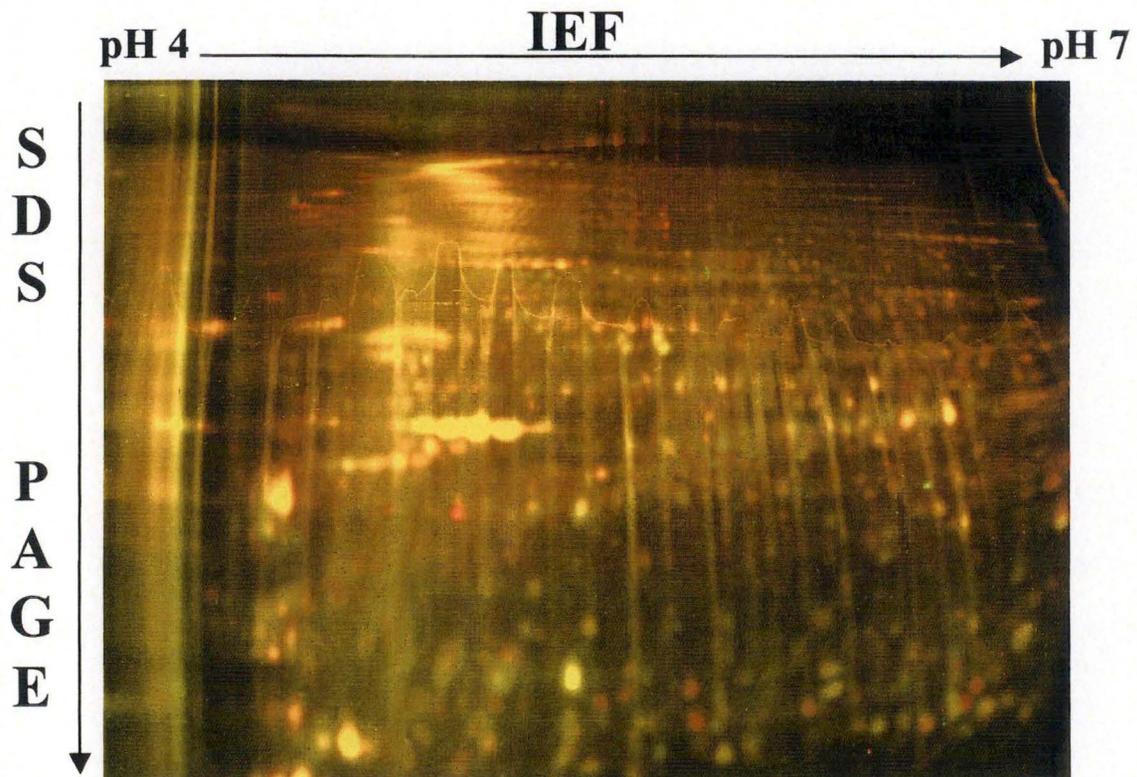


Figure III.17. Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE scanné au moyen du scanner Typhoon 9400 aux longueurs d'onde spécifiques des cyanines. Les échantillons de ce gel proviennent de larves issues de la semaine T3. (IEF : isoelectric focusing ; SDS PAGE : Sodium DocecyL Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis).

Tableau III.2. Liste des spots dont l'abondance varie de 30 % parmi les 3 gels suite à une exposition à de l'Aroclor 1254 durant 72h chez des larves de *X. laevis*.

Position	Master		
	No.	T-test	Av. Ratio
1	527	0,62	1,4
2	1317	0,54	1,5
3	1538	0,52	-3,55
4	1494	0,50	1,37
5	333	0,49	-1,31
6	1429	0,42	2,55
7	346	0,41	1,46
8	1425	0,35	2,52
9	1478	0,33	1,36
10	1372	0,28	1,44
11	239	0,28	-1,57
12	1832	0,27	1,51
13	1427	0,27	1,36
14	1857	0,24	1,75
15	1645	0,23	-2
16	1863	0,22	2,95
17	123	0,21	-1,49
18	1840	0,20	2
19	1518	0,17	2,18
20	1318	0,16	1,97
21	1378	0,15	1,7
22	526	0,15	1,47
23	1823	0,14	1,53
24	1016	0,13	-2,04
25	1745	0,12	1,48
26	1555	0,10	1,33
27	1937	0,093	1,78
28	1934	0,078	2,65
29	1932	0,042	2,45
30	111	0,031	-1,31

Average ratio : facteur de variation d'abondance dans la 'condition traitée' (1 mg/l) par rapport à la condition 'contrôle DMSO'. Les spots colorés en rouge sont ceux qui varient significativement. Le spot coloré en vert est le spot pris en exemple dans le texte.

expérimentales pour nos échantillons ; de nous assurer que les échantillons étaient analysables en DIGE (résultats non montrés).

Nous avons ensuite réalisé 3 gels 2D-DIGE en fluorescence (figures III.15 ; 16 et 17). Cette approche permet l'utilisation d'un standard interne, de mettre en évidence des variations d'abondance de protéines, de manière significative, même pour des variations relativement faibles. Nous avons choisi une gamme de pH à 4-7, ce qui permet de limiter le nombre de protéines visualisées et de mieux séparer les protéines se situant dans cette gamme de pH.

Rappelons que la présente étude est la première, à notre connaissance, à utiliser l'analyse protéomique en 2D-DIGE dans le but de mettre en évidence d'éventuelles protéines sur- ou sous-exprimées chez un organisme aquatique suite à une exposition à un xénobiotique.

Premièrement, remarquons que les 3 gels réalisés sont a priori tout à fait utilisables pour ce type d'analyse. Cependant, un des gels présente une série de traînées verticales ce qui pourrait quelque peu gêner l'analyse informatique. Après les étapes de détection et de *matching*, un total de 1942 spots différents ont été repérés. Cependant, seulement 970 de ces spots se retrouvent conjointement sur 2 des 3 gels. Cela signifie donc qu'un millier de spots ne sont présents que sur un seul gel. Si l'on continue l'analyse, seuls 231 spots sont présents sur les 3 gels. Par soucis de reproductibilité, nous n'allons rechercher des variations d'expression que dans ces 231 spots.

Afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications du niveau d'expression des protéines, nous allons utiliser 3 critères. Premièrement, nous allons sélectionner uniquement les spots dont les variations d'expression de la condition « PCBs 1 mg/l » par rapport au contrôle DMSO, sont supérieures ou égales à 30%, soit des rapports de sur- ou sous-expression supérieurs ou égaux à 1,3 ou inférieurs ou égaux à -1,3. En effet, l'analyse 2D-DIGE permet de comparer au sein d'un même gel les niveaux d'expression des mêmes spots provenant d'un échantillon contrôle et d'un échantillon test après normalisation par rapport à un standard interne. L'expression des résultats sous forme de rapport est donc tout à fait adaptée à cette méthodologie. Ainsi, les variations d'expression sont de maximum 4,94 et de -3,55 respectivement pour les spots sur- et sous-exprimés suite à une exposition aux PCBs. Hors des 231 spots présélectionnés, 49 ont un rapport supérieur à 1,3 alors que 21 ont un rapport inférieur à -1,3, soit un total de 70 spots sur 231 (30%).

Cependant, le seul rapport d'expression n'est pas suffisant. En effet, celui-ci est une valeur moyenne entre les rapports calculés dans chaque gel. Si la variabilité inter-gels est importante – par exemple si le rapport est proche de 1 pour 2 gels mais égal à 3 pour le troisième – cela voudrait dire que la protéine concernée n'est sur-exprimée que dans un seul gel sur 3 alors que son rapport moyen serait supérieur à 1,3. Ainsi, afin de nous assurer de la plus grande fiabilité dans notre interprétation, nous n'avons sélectionné que les spots dont le rapport d'expression allait dans le même sens pour les 3 gels. Rappelons que chaque gel contient des échantillons contrôles et traités provenant de la même semaine d'expérimentation, et donc du même couple de xénopes, ce qui donne un sens scientifique à cette démarche. De cette analyse, nous ne trouvons plus que 30 spots dont le rapport d'expression va dans le même sens dans les 3 gels (tableau III.2.). En d'autres termes, pour 40 spots dont le niveau moyen d'expression était supérieur à 30% chez les larves exposées aux PCBs par rapport aux contrôles, nos expériences manquent de reproductibilité.

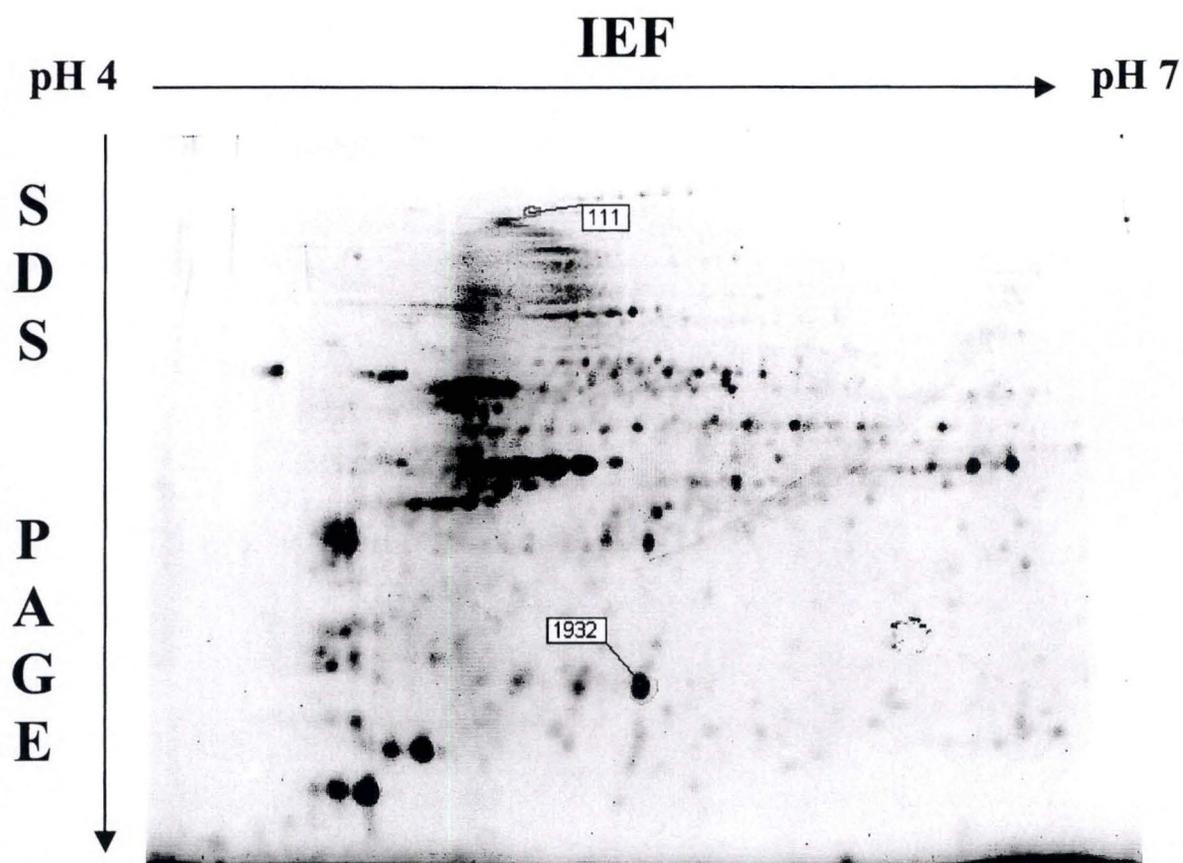


Figure III.18. Photo représentant un gel bidimensionnel DIGE avec les deux spots présentant des variations d'abondance significatives dans la condition traitée (1 mg/l) par rapport à la condition contrôle DMSO. (IEF : isoelectric focusing ; SDS PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis). Les poids moléculaires (de haut en bas) s'étalent entre 66,2 et 21,5 kDa.

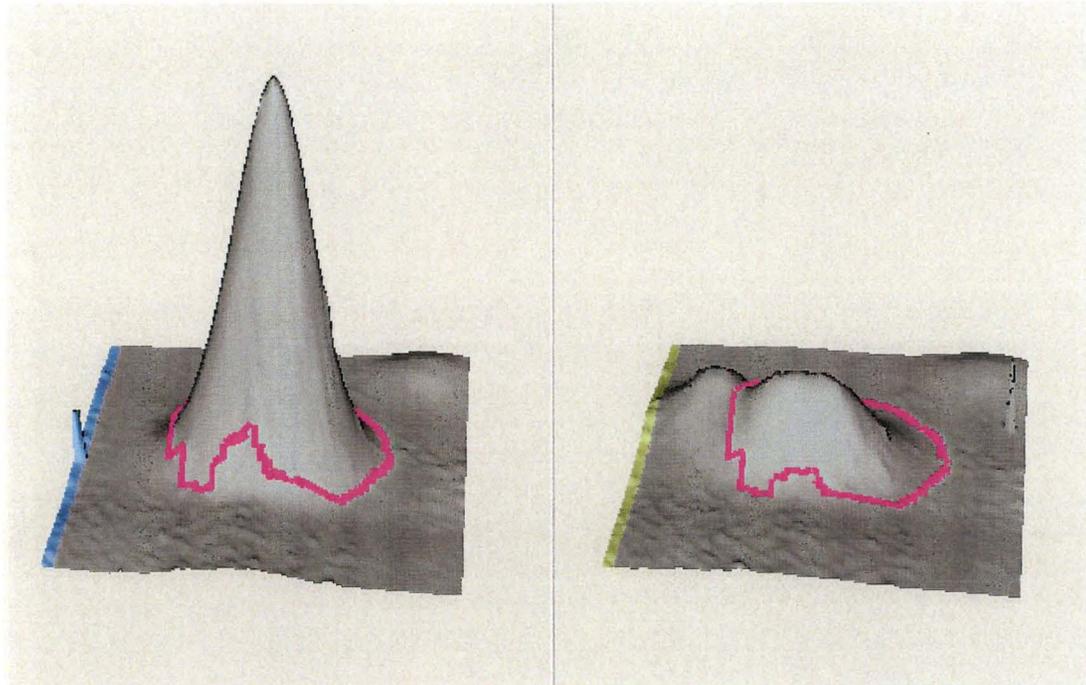


Figure III.19. Représentation 3D de la variation d'expression des protéines. Il s'agit du spot n°1932 qui augmente de 2,45 fois dans la condition '1 mg/l' (gauche) par rapport à la condition DMSO (droite).

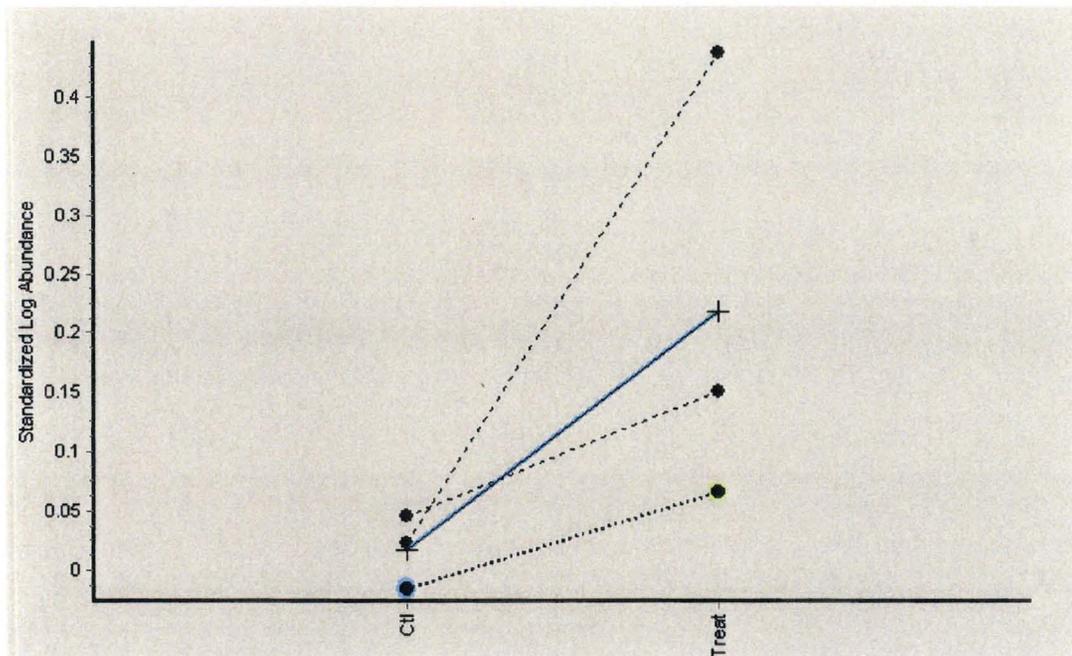


Figure III.20. Cette figure représente l'évolution de la variation d'expression du spot 1378 à travers les 3 gels (les 3 lignes en pointillées) dans la condition contrôle et la condition traitée. La ligne bleue représente la moyenne des 3 gels. *Standardized Log Abundance* = log de l'abondance standardisée

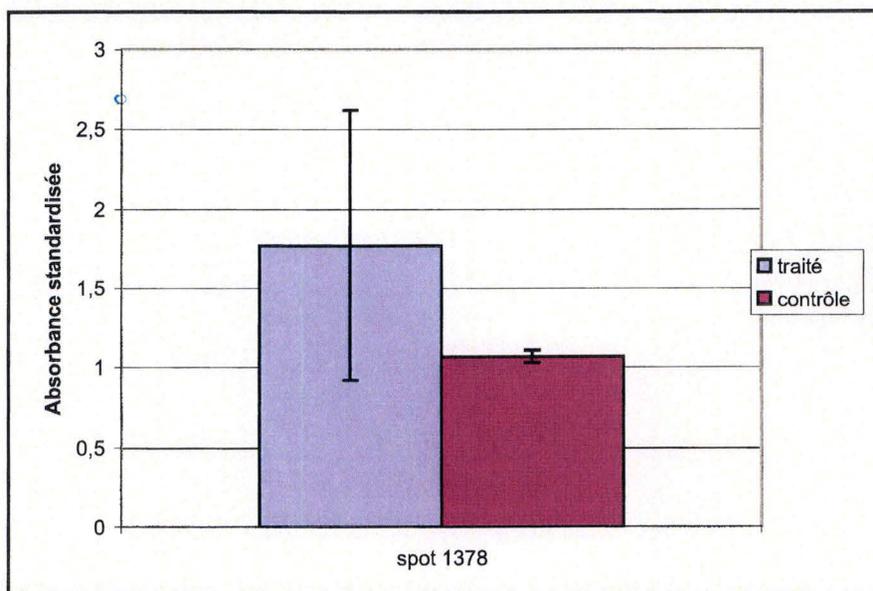


Figure III.21. Abondances standardisées moyennes \pm S.D. pour la condition contrôle et la condition traitée dans le spot 1378. Nous observons un écart-type important pour la condition traitée, avec un coefficient de variation de 48 % (= SD/moyenne X 100)

Le logiciel utilisé dans cette analyse effectue également des tests de t-student afin d'aider à décider si les rapports d'expression observés sont significatifs ou non. Ce test statistique représente notre troisième critère. Seulement 2 spots hors des 30 pré-sélectionnés ont des rapports d'expression significatifs. Il s'agit des spots n° 111 et 1932. Pour le premier, le rapport est de -1,31, soit une sous-expression de 31% de la protéine concernée dans les larves de xénopes exposées aux PCBs à une concentration de 1 mg/l par rapport aux larves uniquement exposées au DMSO. Pour le second, le rapport est plus important puisqu'il est de 2,45, soit une sur-expression de 145 % (figures III.18. et III.19). De manière rigoureuse, ces 2 spots sont les seuls pour lesquels nous pouvons être certains qu'il y a effectivement une variation du niveau d'expression d'une protéine suite à l'exposition à l'Aroclor 1254 telle que définie dans notre protocole expérimental. Remarquons également qu'aucun spot parmi les 231 présents dans les 3 gels et dont le rapport d'expression était inférieur à 30% de variation, ne présentait un t-student significatif.

Cependant, nous pouvons nous demander si le fait que la plupart des valeurs du t-student soient supérieures au seuil de 5% est suffisant pour affirmer qu'il n'y a pas davantage d'effets significatifs. En effet, la méthodologie employée ici s'est limitée à 3 réplicats, ce qui est relativement peu pour effectuer un test statistique. On peut donc se demander si le fait d'augmenter le nombre de réplicats n'apporterait pas davantage de résultats. Par exemple, si l'on s'attarde sur le spot n° 1378, le rapport d'expression moyen est de 1,7, soit largement supérieur à notre seuil de 1,3. De plus, le rapport va dans le même sens dans les 3 gels analysés (figure III.20.). Pourtant, le t-student n'est pas significatif ($p=0,15$) et nous ne pouvons donc pas affirmer que la protéine correspondante est sur-exprimée suite à une exposition aux PCBs. Sur la figure III.21., nous observons la forte variabilité des absorbances standardisées (par rapport au standard interne) pour les larves exposées aux PCBs puisque le coefficient de variabilité (écart-type / moyenne x 100) est égal à 45%.

Enfin, pour terminer ce chapitre « résultats », nous devons mentionner les difficultés techniques que nous avons rencontrées lors de la réalisation d'un gel coloré au ruthénium et destiné à identifier nos protéines d'intérêt grâce à la spectrométrie de masse. Ce gel devant être parfaitement superposable aux autres gels afin de retrouver les spots d'intérêt, nous avons dû nous résigner, après 2 essais infructueux, à arrêter notre analyse ici.

Quatrième partie

Discussion

Discussion

La discussion qui suit peut se résumer en trois parties distinctes, traitant respectivement de l'influence des PCBs sur les taux de survie et le poids de larves (5^{ème} jour PF), sur les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques et, pour finir, sur une éventuelle modulation de l'expression des protéines par les PCBs.

1) Modification des taux de survie lors d'une exposition à court terme à de l'Aroclor 1254

De nombreuses études ont montré que les PCBs étaient responsables, *in vitro*, d'une diminution du nombre de survivants parmi les organismes en cours de développement, comme chez les embryons de vison *Mustela vison* et de zebrafish *Danio rerio* (dans Fisher *et al.*, 2003). Les études dans lesquelles les têtards étaient exposés à des PCBs dissous dans du DMSO et ajoutés au milieu FETAX nous apprennent qu'une diminution du taux de survie se produit parmi les têtards de *X. laevis* exposés du 7^{ème} au 11^{ème} jour PF (stade 47) à 25 et à 50 mg/l d'Aroclor 1254, mais que le taux de survie n'est pas affecté chez des têtards exposés du 5^{ème} au 7^{ème} jour PF (stade 46) (Jelaso *et al.*, (2002). D'après Fisher *et al.* (2003), des expositions à partir de 10, 50 et 100 mg/l d'Aroclor 1254 (également dissous dans 0,25 % de DMSO) diminuaient le nombre de survivants parmi les têtards de *X. laevis* exposés du 5^{ème} au 9^{ème} jour PF (2 jours supplémentaires à Jelaso *et al.*, 2002).

Dans notre étude, nous avons pu remarquer qu'une contamination à court terme (72 h) par des PCBs n'altérerait pas le taux de survie des têtards de *X. laevis* (5^{ème} jour PF) pour des concentrations de 100 µg/l et 1 mg/l. Cependant, la concentration 10 mg/l provoque une mortalité de 63 % lors de la deuxième exposition et une mortalité de 100 % lors des deux dernières expérimentations. Par contre, lors de la première expérimentation, le taux de survie était de 80 % pour cette même concentration. Lors des 3 dernières expositions, la mortalité n'est apparue qu'à partir du 4^{ème} jour PF, après nourrissage des larves avec de la spiruline. A 10 mg/l, nous pouvions observer que toutes les larves restaient immobiles dans le fond des récipients en fin de journée du 4^{ème} jour PF alors que dans les autres groupes, les larves étaient actives et nageaient normalement.

Les effets létaux pour le groupe 10 mg/l confirment les constatations formulées dans les études citées ci-dessus, avec toutefois des différences sensibles au niveau du taux de survie. En effet, dans les travaux de Fisher *et al.*, (2003), le taux de survie à 10 mg/l était de 70 % pour des têtards exposés du 5^{ème} au 9^{ème} jour PF, contre 30 % pour des larves exposées du 2^{ème} au 5^{ème} jour PF, dans notre étude. Dans les travaux de Zhou *et al.*, (2004), des larves au 5^{ème} jour PF sont exposées à de l'Aroclor 1524 durant 96h. A 96h d'exposition, les larves sont toutes mortes pour des concentrations supérieures à 1 mg/l.

Les travaux de Jelaso *et al.* (2002) et Fisher *et al.* (2003) suggèrent que deux jours de contamination aux PCBs restent insuffisants pour induire de la mortalité chez des jeunes larves au 5^{ème} jour PF, mais que celle-ci apparaît si la contamination est prolongée sur une période de 4 jours. Dans notre étude, la mortalité est apparue après 3 jours d'exposition à la dose 10 mg/l, confirmant l'effet de la combinaison concentration-temps d'exposition sur la survie des têtards.

Il est également important de souligner le fait que c'est uniquement à partir du moment où les larves sont nourries, dans la condition 10 mg/l, que nous observons un taux de mortalité important. La mortalité commence-t-elle à apparaître après 72h de contamination par baignade ou est-ce dû à l'ajout de l'aliment, et donc à une contamination par voie alimentaire (adsorption des PCBs sur les algues) en plus d'une contamination tégumentaire et branchiale? En effet, nous savons que dans l'eau, les PCBs se retrouvent préférentiellement au niveau des sédiments et des particules en suspension. Les têtards se sont nourris de particules alimentaires qui concentrent particulièrement les PCBs. Par un phénomène de bioaccumulation, il se peut que les PCBs se soient retrouvés à de plus grandes concentrations dans les individus et principalement dans les lipides. Signalons toutefois que c'est à travers les branchies et la peau perméable que les PCBs entrent préférentiellement dans les organismes aquatiques (Safe, 1994).

D'autres hypothèses, tel qu'un effet combiné densité d'élevage-toxique ou température-toxique pourraient être suggérées pour expliquer cette mortalité. Pour les deux dernières expositions, 40 individus étaient stockés par récipient, dans 200 ml de milieu FETAX. Dans l'étude de Savage *et al.*, (2002), différents lots de têtards étaient exposés à des sédiments contaminés ou non, et les mortalités observées parmi les différents groupes résultaient de la dégradation de la qualité du milieu suite aux modifications de la densité durant leurs expériences (Savage *et al.*, 2002). Dans la littérature, il est bien documenté que la croissance larvaire des amphibiens est largement affectée par la densité. En effet, Girish *et al.*, (2003) ont démontré qu'en augmentant progressivement la densité des têtards dans l'eau, leur poids diminuait systématiquement tandis que la durée de la période larvaire augmentait.

Au cours des trois dernières expérimentations, nous avons rencontré des problèmes de variations de la température des milieux de stockage. En effet, dans un test FETAX, l'idéal de température est à $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Lors de notre deuxième semaine d'expérimentation, la température de la pièce avoisinait les 35°C . Nous avons donc installé un système de bain-marie avec une température réglée sur 23°C . Cependant, la température de l'eau dépassait 25°C . D'après Zhou *et al.*, (2004), d'autres facteurs environnementaux tels que la température et la qualité de l'eau agissent en synergie avec des polluants comme les PCBs, ce qui cause des variations dans le succès de l'éclosion et de la survie. Dans notre cas, il est possible que la température ait agi en synergie avec les PCBs et ait amplifié leurs effets, entraînant une mortalité totale à la dose 10 mg/l.

Pour chacune des expérimentations, les têtards provenaient de pontes différentes. Dans certains cas, les têtards issus de différentes pontes répondent différemment à l'Aroclor 1254 (Jelaso *et al.*, 2003). Cette différence dans les taux de mortalité était également apparue dans leur précédente étude en 2002 (Jelaso *et al.*, 2002). Nous retrouvons également cette différence de mortalité en fonction des expositions et nous pensons que la variabilité génétique entre les différentes pontes pourrait intervenir dans nos résultats.

Burgin *et al.* (2001), (dans Jelaso *et al.*, 2003) rapportent que des lots individuels de mixture commerciale, Aroclor 1254, produisent des effets différents. Dans notre étude, il est possible que la variabilité dans l'Aroclor 1254 puisse avoir joué un rôle, car nous avons été obligés d'utiliser plusieurs lots d'Aroclor 1254 pour réaliser nos expériences.

L'Aroclor 1254 est une mixture commerciale de PCBs qui regroupe une variété de congénères individuels coplanaires et non coplanaires. Les PCBs coplanaires peuvent évoluer en une molécule plane pouvant se lier à des récepteurs. Ces molécules coplanaires exerceraient leurs effets biologiques néfastes à travers le récepteur Ah et par l'activation du système CYP450

1A1. Nous savons que le CYP450 1A1 est une enzyme métabolique qui peut être induite et qui active la dégradation partielle et la détoxification des PCBs, la plupart du temps via le récepteur Ah. Cette dégradation des PCBs par le CYP1A1 peut engendrer des produits de dégradation cytotoxiques, carcinogènes et/ou mutagènes. Les congénères non coplanaires seraient quant à eux associés à des dysfonctionnements neurologiques, probablement via une perturbation de l'homéostasie des taux de calcium dans les organismes.

2) Effets d'une exposition à court terme à de l'Aroclor 1254 sur le poids des larves

Au cours de nos diverses expérimentations, nous avons observé une diminution du poids des larves (5^{ème} jour PF ; stade 46~47 = début de la prémétamorphose) dans les différents traitements par rapport aux contrôles. Des différences significatives (ANOVA ; $p < 0,05$) ont été mises en évidence pour les groupes 1 mg/l et 10 mg/l par rapport aux autres conditions. Lors des changements de nos milieux, nous observions déjà, de visu, une plus petite taille pour les larves issues des conditions traitées par rapport aux conditions contrôle, lors de chaque expérimentation. De plus, les larves paraissaient moins colorées dans ces mêmes groupes traités. Ensuite, même avant que les larves ne reçoivent leur première alimentation, nous observions déjà cette tendance à une diminution de la taille et du poids des larves, tendance qui se confirme après l'ingestion de nourriture. Ces observations sont en accord avec la littérature :

Au cours des travaux de Fisher *et al.*, (2003), une exposition (du 5^{ème} au 9^{ème} jour PF) à l'Aroclor 1254 provoquait une diminution générale de la taille des têtards de *X. laevis* en développement. Des différences de taille se produisaient déjà à partir de 1 mg/l par rapport aux contrôles et ces différences étaient significatives pour des concentrations de 10 mg/l et plus. Cette même étude nous apprend que les PCBs induisent une dépigmentation des larves par réduction du nombre des mélanocytes dans la région de la peau recouvrant le cerveau pour des concentrations de 1 mg/l et plus. De plus, des expositions aux PCBs et autres composés chlorés sont associées à des altérations de la croissance et du développement chez les animaux et les humains. Powell *et al.*, (1996) ont montré qu'une exposition à 6,67 mg/l d'Aroclor 1254 réduit la croissance et le poids d'embryons de poulet. De même, Henry *et al.*, (1997) ont montré une diminution de la croissance du zebrafish suite à une exposition au 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxine (2,3,7,8-TCDD). Dans les travaux de Sridhar *et al.*, (2004), le poids des rats *Rattus norvegicus*, diminuait significativement suite à une exposition à une mixture de PCBs, l'Aroclor 1254.

D'après Savage *et al.*, (2002), les différents congénères de PCBs agissent sur de multiples récepteurs cellulaires qui peuvent produire divers effets. Par exemple, l'activation du récepteur Ah est associée avec la perte de poids chez les mammifères et les oiseaux (dans Savage *et al.*, 2002). En ce qui concerne nos résultats, il serait possible que l'activation du récepteur Ah par les PCBs soit responsable d'une diminution du poids chez les survivants.

Gutleb *et al.*, (1999) ont mis en évidence une diminution significative du poids chez des larves de *X. laevis* et *R. temporaria* après exposition à des mixtures de PCBs durant 96 heures. Les PCBs altèrent les niveaux de thyroxine (T_4), ce qui affecte la mise en route de la métamorphose et est suivi par des changements au niveau du poids (Gutleb *et al.*, 1999). Dans notre étude, nous mesurons le poids de larves qui sont en début de prémétamorphose, étape durant laquelle l'hormone T_4 est présente, mais de façon infime. Or nous savons que c'est l'hormone thyroïdienne qui est responsable de la mise en place du processus de

métamorphose. Cette dernière se produit toujours lorsque les larves ont atteint une taille et un poids requis pour débiter la métamorphose. Ce niveau de poids requis en début de métamorphose, permet de maximiser la survie et la taille de première reproduction des juvéniles. Si les taux de T₄ sont affectés par les PCBs, les têtards risquent de ne pas atteindre le poids voulu pour entamer la métamorphose qui pourrait, dès lors, être retardée. Plusieurs publications ont, par ailleurs, rapporté que la petite taille des têtards est corrélée à des altérations de la vitesse de nage, ce qui résulte en une augmentation de la prédation (Gutleb *et al.*, 1999).

3) Effet d'une exposition à court terme à de l'Aroclor 1254 sur les systèmes antioxydants des larves

Nous venons de montrer que l'Aroclor 1254 a un effet indéniable sur le développement des larves de *X. laevis*. D'une part, une mortalité élevée est observée avec les concentrations les plus élevées. D'autre part, la croissance des larves est ralentie avec 1 mg/l. Nous avons voulu comprendre plus en détails, les mécanismes d'action de ces PCBs. Pour ce faire, nous avons tenté de caractériser le niveau de stress oxydant dans lequel se trouvaient les têtards.

3.1. Taux de peroxydation lipidique

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

Dans notre étude, les niveaux de TBARS chez les larves de *X. laevis* (5^{ème} jour PF) tendent à augmenter progressivement pour les groupes DMSO, 100 µg/l et 1mg/l par rapport au contrôle 0 (augmentation non significative). Alors que pour la dernière dose (10 mg/l), les taux de TBARS diminuent à des valeurs intermédiaires aux contrôles 0 et DMSO. Les taux de TBARS varient en moyenne de 112,8 à 218,8 nmol MDA/g tissu.

L'évolution des niveaux de TBARS obtenus lors de nos expérimentations est conforme à ce qui était attendu. Même si aucune différence significative n'a pu être décelée, nous pouvons dire qu'une tendance à la lipoperoxydation est toutefois observée pour les survivants issus des deux premiers groupes traités (100 µg/l et 1 mg/l). En effet, la puissance de notre test étant faible, nous avons calculé avoir 52 % de risque de ne pas voir un effet entre les traitements alors qu'il existe. Clairement, l'expérience devrait être répétée afin de diminuer le risque β. Si on sait que la peroxydation lipidique est un indicateur de l'état général de stress oxydant, les larves exposées à 1 mg/l d'Aroclor 1254 semblent subir un stress oxydant plus important que les têtards issus des autres conditions. Ce stress semble diminuer lors de l'exposition à 10 mg/l. Il est important de signaler que les survivants de ce dernier groupe étaient probablement moribonds, et présentaient une activité très diminuée par rapport aux survivants des autres

conditions. Nous pourrions penser qu'il s'agit de survivants donc d'individus plus résistants et que leurs défenses sont meilleures. Nous resterons extrêmement prudents quant à une quelconque interprétation concernant le groupe 10 mg/l.

De plus, c'est au cours de la troisième semaine d'expérimentation que les valeurs de TBARS ont été les plus élevées, quel que soit le traitement, suggérant que les larves issues de cette semaine aient donc subi un stress oxydant plus important que lors des autres semaines d'exposition. Plusieurs facteurs, en s'additionnant, ont peut-être joué un rôle lors de cette troisième semaine, augmentant le niveau de stress oxydant. D'une part, rappelons que c'est durant cette semaine, que nous avons rencontré des augmentations de température dans la pièce. Or, la température peut agir en synergie avec les substances polluantes comme les PCBs (Zhou *et al.*, 2004). Les valeurs dans les groupes exposés au toxique étant toujours plus élevées que les contrôles ; l'effet température aurait agi en synergie avec l'effet des polluants, en augmentant la toxicité de ces derniers. D'autres facteurs, telle que la variabilité génétique lors des différentes semaines d'expérimentation, peuvent également expliquer, du moins en partie, ces différences. Au cours de cette troisième semaine, la densité des individus a été doublée dans chaque récipient, ce qui a pu augmenter l'état de stress des larves par dégradation accrue de la qualité du milieu (production accrue de métabolites). Notons toutefois qu'une densité élevée, similaire à celle de la 3^{ème} semaine, a été appliquée lors de la 4^{ème} semaine d'expérimentation, sans augmentation du stress oxydant, ce qui suggère un rôle limité de ce facteur. Nous pensons donc que les différents facteurs cités pourraient intervenir conjointement chacun dans l'augmentation du stress oxydant lors de cette troisième semaine.

Enfin, les résultats obtenus dans notre étude rejoignent ceux d'autres études concernant d'autres espèces exposées à des contaminants. Après avoir exposé des moules *Mytilus edulis* à 1 mg/l de CCl₄ et de ménadione, Ribera *et al.*, (1991) ont observé une augmentation des taux de LPO dans la glande digestive après deux jours d'exposition. Cela représente un indice des dommages oxydatifs provoqués chez ces moules. Chez des poissons d'eau douce *Wallago attu* vivant dans des sites pollués de la rivière Yamuna (Inde), les valeurs de LPO étaient augmentées dans le foie, le rein et les branchies avec des valeurs respectivement de 38, 62 et 79 nmol de MDA/g tissu (Pandey *et al.*, 2003).

L'augmentation de LPO chez les larves *X. laevis* contaminées peut être due à une augmentation de la formation des radicaux libres lors de la métabolisation des PCBs. Sridhar *et al.*, (2004) rapportent que les PCBs (Aroclor 1254) causent une réduction de l'activité des enzymes antioxydantes telles la SOD, CAT, GPx et GST et qu'ils augmentent la formation de l'H₂O₂ et les taux de LPO. La peroxydation lipidique traduit l'inefficacité des systèmes antioxydants à enrayer une agression toxique par des composés chimiques (Lagadic *et al.*, 1997). Elle peut avoir lieu même en présence d'activités antioxydantes augmentées, l'induction pouvant être insuffisante pour faire face au stress. Nous allons nous intéresser à l'activité de certaines de ces enzymes antioxydantes.

3.2. Réponse des systèmes de défense antioxydants à une exposition à de l'Aroclor 1254

3.2.1. Les niveaux de glutathion total (GSH + GSSG)

Le glutathion agit comme réducteur ou capteur de radicaux et vient renforcer l'action des enzymes antioxydantes. Le glutathion, un tripeptide γ glutamyl-cystéinyl-glycine, est le thiol non protéique le plus abondant dans les organismes vivants. Il est présent majoritairement à l'état réduit (GSH) dans les cellules ; une augmentation de la forme oxydée (GSSG) traduit un

stress oxydant. Il intervient comme donneur d'électrons permettant de désactiver les ROS comme OH° , mais il sert surtout comme substrat aux glutathion peroxydases pour la réduction des peroxydes. Ce thiol non protéique intervient également dans la conjugaison de substances électrophiles, lesquelles sont catalysées par des glutathion S-transférases (Lagadic *et al.*, 1997). Les enzymes antioxydantes peuvent être inactivées par les radicaux $\cdot\text{OH}$, la présence de systèmes antioxydants non enzymatiques (comme le glutathion) est essentielle afin de neutraliser ces radicaux.

Souvent, les taux de GSH totaux sont augmentés suite à une exposition à des substances polluantes. Dans l'étude d'Allen, (1991), il est rapporté que des insectes exposés à du paraquat (un herbicide dichloride) présentent des concentrations en GSH élevées. De même, le foie ainsi que les tissus gastriques des mammifères ont des concentrations élevées en GSH en réponse aux substances chimiques induisant un stress.

Cependant, nous n'observons pas de modification particulière des taux moyens de GSH à travers les groupes de larves exposées à de l'Aroclor 1254. Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les traitements. Dans l'étude d'Anguiano *et al.*, (2001), des embryons et des larves de *Bufo arenarum* ont été exposés à 4 types de pesticides (parathion, malathion, lindane et dieldrine). Aucun d'entre eux n'altérait les taux de GSH excepté le lindane qui provoquait une réduction des taux de GSH seulement dans les toutes premières étapes du développement des embryons, mais n'altérait pas les contenus en GSH des larves. De plus, ces réductions significatives se produisaient à partir de 144h d'exposition. Twaroski *et al.*, (2000) ont montré que diverses doses de PCBs injectées à des rats *Sprague-Dawley* mâles et femelles n'avaient pas d'effet significatif sur les concentrations hépatiques en glutathion total. Bien que les taux de GSH ne semblent pas affectés, ils suggèrent que les effets d'un stress oxydant seraient plus facilement observés dans le rapport GSH/GSSG que dans les valeurs en GSH total.

Dans les travaux de Peña-Llopis *et al.*, (2003), des anguilles *Anguilla anguilla*, capables de préserver ou d'augmenter la valeur du rapport GSH/GSSG, survivent plus longtemps à une exposition de dichlorvos (insecticide organophosphoré) que les individus avec un rapport fortement diminué. Ces mêmes auteurs ont trouvé que la mortalité de deux bivalves marins exposés à un insecticide organophosphoré, le fénitrothion, était associée à des modifications dans les niveaux de glutathion.

Dans de futures études, il serait intéressant d'analyser l'évolution de la valeur du rapport GSH/GSSG en mesurant également les taux de glutathion oxydés. Le rapport GSH/GSSG aurait pu être modifié alors que le GSH total serait resté constant. Il est aussi possible que ce rapport GSH/GSSG ait été maintenu constant dans nos larves *X. laevis* contaminées par des PCBs et qu'il ait été suffisant pour combattre les radicaux libres ainsi que pour éviter un stress oxydant. Augmenter le rapport GSH/GSSG en réduisant le GSSG en deux molécules de GSH est énergétiquement moins coûteux que de synthétiser du nouveau GSH (Peña-Llopis *et al.*, 2003). La LPO observée n'étant pas significative, s'il y a un stress oxydant, il est relativement faible.

Enfin, la mortalité, pour le groupe 10 mg/L, ne semble pas être associée à une diminution des taux de GSH bien que les valeurs de GSH pour les deux dernières semaines (correspondant à la plus grande mortalité) n'aient pas été mesurées.

Lorsque nous examinons le profil d'évolution des taux de GSH en fonction des semaines, nous remarquons que les taux en GSH sont élevés lors de la deuxième semaine dans les groupes exposés à l'Aroclor 1254, alors qu'au cours de la troisième semaine, les taux sont les

plus faibles. Remarquons que ce profil va dans le sens opposé à celui obtenu pour la peroxydation lipidique où un stress oxydant important était mis en évidence pour la troisième semaine. Nous pourrions penser que les larves issues de la 3^{ème} ponte, exposeraient des taux en GSH plus faibles que ceux présents dans les autres larves. Dès lors, la protection et la neutralisation des radicaux libres dans les individus pourraient être diminuées ce qui augmenterait le stress oxydant chez ces individus. Venditti *et al.*, (1999) ont mis en évidence le fait que des vertébrés qui avaient de grandes capacités antioxydantes au niveau du foie, présentaient de faibles taux de TBARS et inversement.

3.2.2. Activité de la glutathion S-transférase (GST)

L'augmentation d'activité de la GST suite à une exposition à de l'Aroclor 1254, rejoint les résultats obtenus dans la littérature. En effet, nous montrons une augmentation significative de l'activité de la GST ($p < 0,05$) en ce qui concerne la concentration 1 mg/l par rapport aux autres conditions. L'activité spécifique moyenne passe de 1357 pour le contrôle 0 à 2233 nmol CDNB/min/mg prot pour la concentration 1 mg/l. L'activité reste constante pour l'ensemble des autres groupes.

La glutathion S-transférase réfère à un large groupe de protéines ubiquistes qui catalysent l'attaque nucléophile du GSH sur différentes espèces de composés toxiques. Il s'agit de protéines dimériques ayant une masse moléculaire comprise entre 22-28 kDa (Angelucci *et al.*, 2001) et un point isoélectrique de 5,5 (Yang *et al.*, 2003). Les GSTs ont un grand rôle à jouer dans les systèmes de détoxification des organismes et il a été postulé qu'elles ont évolué pour protéger les cellules contre le métabolisme des ROS (Angelucci *et al.*, 2001). La GST est présente dans les stades très précoces du développement des amphibiens (Amicarelli *et al.*, 2004). Ces mêmes auteurs ont purifié et caractérisé la GST dans les premiers stades des embryons du crapaud commun *Bufo bufo*. Une fois adulte, ces derniers ont un taux en GST augmenté en réponse à un mode de vie terrestre et à la défense contre l'augmentation des ROS. Cependant, un amphibien comme le crapaud africain *X. laevis* qui ne quitte jamais son milieu aquatique, n'est pas soumis à des changements drastiques dans les niveaux d'expression de GST durant la transition de la vie embryonnaire à la vie adulte (Amicarelli *et al.*, 2004). Ces derniers ont soumis des embryons de *B. bufo* à une condition de stress oxydant, correspondant à un traitement à de l' H_2O_2 . Les résultats ont montré que le stress oxydant provoque une anticipation significative de l'expression à la fois du transcrit et des protéines correspondant à une des classes de la GST (Amicarelli *et al.*, 2004).

Dans une autre étude, Twaroski *et al.*, (2001) injectent diverses doses de PCBs à des rats *Sprague-Dawley* mâles et femelles. Cette injection est responsable d'une augmentation de l'activité de la GST à la fois chez le mâle et la femelle. Les principaux inducteurs de la GST incluent les inducteurs classiques du CYP450 et également tous les congénères de PCBs (Twaroski *et al.*, 2001). Dans cet ordre d'idées, une exposition des embryons *B. arenarum* à 4 sortes de pesticides provoque, dans chacun des cas, une augmentation de l'activité de la GST (Anguiano *et al.*, 2001). Manduzio *et al.*, (2004) étudient les variations saisonnières de l'activité de plusieurs enzymes dont la GST chez la moule bleue *Mytilus edulis* provenant de 4 sites industriels pollués ou non (Le Havre en Seine-Maritime en France). Ces auteurs ont observé une augmentation de l'activité de la GST dans les branchies des moules provenant d'un site pollué par rapport à un site non pollué. Les valeurs d'activité dans les branchies passaient d'environ 700 nmol GSH/min/mg prot pour le site de référence à 4000 nmol GSH/min/mg prot pour le site pollué, durant le mois de juin.

Nos résultats indiquent donc clairement que les PCBs (1 mg/l) ont des effets sur les larves de xénopes. L'augmentation observée de l'activité GST est à mettre en parallèle avec la perte de poids des larves (voir point 2) et avec une tendance à observer une augmentation de la peroxydation lipidique. De plus, les concentrations en PCBs mesurées dans ces larves sont assez élevées en comparaison à celles mesurées sur des larves mortes et exposées à 10 mg/l. On peut donc supposer que cette accumulation de PCBs induit une situation de stress dans les larves de xénopes au stade 46~47. Toutefois, la signification de l'augmentation de l'activité de la GST doit encore être élucidée. Il est néanmoins probable que l'organisme tente de réagir face à ce stress. La GST pourrait alors être utilisée comme antioxydant ou pour rendre les PCBs plus hydrophiles et donc plus faciles à être éliminés. Dans ce cas, il serait intéressant de mesurer l'activité des systèmes EROD ou CYP450. Nous n'obtenons aucune augmentation dans le groupe 10 ppm, malgré la concentration élevée, mais nous rappelons que les valeurs ne proviennent que des deux premières semaines et que la mortalité était élevée.

3.2.3. Activités de la superoxyde dismutase totale (SOD) et de la catalase (CAT)

La SOD et la CAT sont deux enzymes antioxydantes majeures qui sont mises en œuvre pour la réduction des ROS. La SOD catalyse la dismutation de l'anion superoxyde en oxygène moléculaire et en peroxyde d'hydrogène. La CAT catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

Ces deux enzymes sont bien présentes dans les premières étapes de développement des amphibiens. L'activité de la superoxyde dismutase reste inchangée durant la métamorphose jusqu'au stade 40, elle n'augmente pas avec les modifications environnementales et l'augmentation de l'O₂ due à la respiration (Starrs *et al.*, 2001). Quant à l'activité de la catalase, elle reste inchangée durant le développement du *X. laevis* (Starrs *et al.*, 2001). Les systèmes antioxydants chez les têtards d'amphibiens en métamorphose se mettent en place beaucoup plus tôt et plus rapidement que chez d'autres vertébrés.

Dans notre étude, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence des différences d'activité de la SOD entre les différents traitements même si elle semble plus faible pour la concentration 100 µg/l.

En ce qui concerne l'activité de la catalase, nos résultats indiquent qu'elle n'est pas modifiée chez les larves de *X. laevis* (5^{ème} jour PF) exposées à diverses doses d'Aroclor 1254. A priori, nous pouvons être étonnés, étant donné les effets déjà observés sur l'activité de la GST et l'état probable de stress dans lequel les larves de *X. laevis* se trouvent après une exposition à 1 mg/l d'Aroclor 1254, de ne pas observer de modification des activités de la SOD et de la CAT. Cependant, la littérature nous apprend que l'augmentation de l'activité des enzymes antioxydantes en réponse à l'exposition aux contaminants de l'environnement n'est pas un phénomène constant.

Manduzio *et al.*, (2004) étudient les variations saisonnières de l'activité de plusieurs enzymes dont la SOD chez la moule bleue *Mytilus edulis* provenant de quatre sites industriels pollués ou non (Le Havre en Seine-Maritime en France). Ces auteurs ont observé une augmentation de l'activité de la SOD dans les branchies des moules provenant d'un site pollué par rapport à un site non pollué. De plus, les réponses des activités enzymatiques, SOD et catalase, présentent souvent des profils parallèles.

Dans les travaux de Sridhar *et al.*, (2004), l'Aroclor 1254 provoque une diminution de l'activité de la SOD et de la catalase dans les rats *Rattus norvegicus* suite à une injection intrapéritonéale de cette mixture. De même, une diminution de l'activité de la SOD et de la catalase est observée dans les cellules de Leydig chez ces mêmes rats *Rattus norvegicus* suite

à une contamination à de l'Aroclor 1254 (Murugesan *et al.*, 2005). Dans ces études, une diminution de la catalase pourrait être associée à la notion de stress oxydant induite par les PCBs. La CAT est la principale source de protection de l' H_2O_2 et est liée à l'activité de la SOD. La diminution de l'activité de la SOD chez ces rats exposés à des doses prolongées (30 jours) de PCBs peut résulter en davantage d'accumulation de O_2^- qui est capable d'inhiber la catalase (Venkataraman *et al.*, 2004).

Nous pouvons dès lors émettre l'hypothèse que nos conditions expérimentales ne produisent pas suffisamment de ROS et/ou que d'autres systèmes antioxydants sont suffisants que pour induire des modifications de l'activité de ces 2 enzymes.

3.2.4. Activités de la glutathion peroxydase (GPx) et de la glutathion réductase (GR)

La GR catalyse la réduction du glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Il est essentiel pour le cycle rédox du glutathion de maintenir des niveaux adéquats en GSH. La GPx est une des trois enzymes antioxydantes majeures. Elle catalyse la réduction de H_2O_2 en eau et des peroxydes organiques (ROOH) en alcool stable (ROH) en utilisant le glutathion comme source d'équivalents réducteurs. Il est important que la GR fonctionne de façon optimale pour fournir le substrat nécessaire à l'activité de la GPx.

Chez les amphibiens, l'activité de la GPx, comme celle de la SOD, reste inchangée tout au long de la métamorphose. Ces niveaux d'activité de la GPx sont élevés pour protéger l'épithélium contre les dommages oxydatifs lors du développement (Starrs *et al.*, 2001).

Dans leur travaux, Twaroski *et al.*, (2001) ont exposé des rats Sprague-Dawley mâles et femelles à différents congénères de PCBs. Ils ont observé une augmentation significative de l'activité de la GR au niveau du foie, par rapport à des rats contrôles. Des activités de 7,59 à 11,1 nmol /min/mg prot étaient observées dans le foie des rats contaminés par rapport à une activité de 4,43 nmol /min/mg prot pour les contrôles. Par contre, les activités de la glutathion peroxydase étaient quant à elles diminuées. Des activités de 555 à 483 nmol/min/mg prot dans les foies de rats contaminés étaient obtenues par rapport à des valeurs de 787 nmol/min/mg prot pour les contrôles. Cette diminution de l'activité de la GPx était accompagnée d'une diminution de la transcription du gène codant pour les GPx. Une diminution de l'activité de la GPx a également été observée chez des rats *R. norvegicus* exposés à de l'Aroclor 1254 (Venkataraman *et al.*, 2004).

En ce qui concerne notre étude, il n'y a aucune modification de la GR chez les larves de *X. laevis* (5^{ème} jour) après une exposition à court terme à de l'Aroclor 1254, l'activité étant stable à travers les différents traitements. Cela signifie qu'il n'y pas de perturbation, dans ce cas, de la GR, celle-ci pouvant théoriquement fournir le substrat nécessaire au bon fonctionnement de la GPx.

La même constatation est réalisée pour la GPx où les activités sont extrêmement stables sauf pour le groupe 10 mg/l, où l'activité semble avoir augmenté par rapport aux contrôles. Cependant, aucune différence significative n'a été décelée pour ce groupe et nous restons prudents sur les valeurs obtenues.

Nous pouvons admettre qu'à cette durée d'exposition et à ces concentrations, les PCBs ne perturbent en aucun cas les activités de la GR et de la GPx. Ceci semble conforter l'absence de modification du niveau de GSH total. Ainsi, malgré la situation de stress dans laquelle les larves de xénopes semblent être plongées, le métabolisme du glutathion ne semble pas modifié.

4) Dosage des PCBs dans les organismes de *X. laevis* exposés à de l'Aroclor 1254

Les concentrations en PCBs ont été mesurées dans les tissus de xénopes par rapport au poids frais total et au poids des lipides. Remarquons tout d'abord que les PCBs sont présents à des concentrations basales de 6,75 µg/g dans les larves contrôles. Des concentrations en PCBs, de l'ordre de 1,18 µg/g étaient également retrouvées dans les larves de *X. laevis* issues des groupes contrôles (Fisher *et al.*, 2003). Par rapport aux groupes contrôles, nous observons des augmentations de l'ordre de 10 fois pour le groupe 100 µg/l, avec des valeurs de 51,4 µg/g de poids frais et 13690 µg/g de poids de lipides. Pour le groupe 1 mg/l, nous obtenons des valeurs augmentées d'un facteur 3 par rapport à la dose 100 µg/l, avec des valeurs respectivement de 180,01 et 39655 µg/g de poids frais et de lipides, soit 2 fois plus que pour des larves exposées à 10 mg/l mais mortes. Nos valeurs sont du même ordre de grandeur que celles trouvées dans la littérature. En effet, dans les travaux de Fisher *et al.*, (2003), des valeurs de 114,09 et de 956,44 µg/g de poids frais sont retrouvées dans les tissus de larves *X. laevis* exposées respectivement à 1 et 10 mg/l.

Au vu de ces résultats, nous pouvons affirmer que les PCBs augmentent de façon dose-dépendante dans les tissus des larves contaminées. Les taux de PCBs sont plus élevés quand ils sont exprimés par rapport au poids des lipides. Vu leur caractère lipophile, les PCBs, et surtout les congénères hautement chlorés, ont tendance à s'accumuler dans les tissus riches en lipides. On les retrouve en grandes quantités dans les tissus adipeux.

Malgré le fait qu'il s'agisse d'une exposition à court terme, nous retrouvons de fortes concentrations de PCBs dans les tissus. Jelaso *et al.*, (2002) rapportent qu'une accumulation de PCBs dans les larves de xénopes, suite à une contamination par de l'Aroclor, est plus rapide lorsque les larves sont exposées à des PCBs dissous dans l'eau qu'à travers leur alimentation. En effet, l'ingestion par les branchies est plus efficace qu'une ingestion à travers le régime alimentaire. Dans ce dernier cas, les PCBs sont d'abord transportés à travers l'épithélium intestinal via une diffusion passive pour enfin gagner le flux sanguin.

5) Modification de l'expression des protéines suite à une exposition aux PCBs

Afin d'aller plus loin dans la mise en évidence des mécanismes d'action des PCBs, nous avons entrepris une étude originale d'analyse du niveau d'expression des protéines par la méthodologie 2D-DIGE. Notre travail a permis de tester cette méthodologie particulière afin d'étudier des variations de l'expression des protéines chez des larves de *X. laevis* soumises à une exposition à 1 mg/l de PCBs du 2^{ème} au 5^{ème} jour PF.

En première analyse, nous avons observé la sur- ou sous-expression moyenne d'un total de 30 spots. Ces spots présentent des variations d'expression supérieures à 30 %. Si nous considérons qu'en moyenne, nous avons pu détecter un total de 231 spots présents sur les 3 gels, cela signifie que 13 % des spots ont un niveau d'expression moyen modifié de 30 % et plus. Toutefois, parmi ces 30 spots, nous avons trouvé que seulement 2 spots présentaient des variations d'expression significatives ($p < 0,05$) dans les 3 gels par rapport à la condition contrôle. Un des deux spots a une abondance qui augmente de 2,45 fois dans la condition traitée (1 mg/l) par rapport à la condition 'contrôle DMSO'. L'abondance du deuxième spot diminue de 1,31 fois dans la condition traitée par rapport à la condition contrôle. Nous ne pouvons donc seulement affirmer que les PCBs modifient les niveaux d'expression de ces 2

seuls spots. Cependant, les 28 autres spots présentent également des variations d'expression de l'ordre de 30 % mais en dessous du seuil de signification. Cela pourrait être dû à la variabilité interindividuelle ajoutée à la variabilité de l'expérimentation. Pour en être sûr, il faudrait plus de réplicats.

Nous n'avons hélas pas réussi à identifier les 2 protéines d'intérêt. Sur base du pI et du PM, nous pouvons toutefois émettre une hypothèse :

La protéine sur-exprimée pourrait correspondre à la glutathion S-transférase (GST) qui appartient à un large groupe de protéines ubiquistes catalysant de nombreuses attaques nucléophiles. En effet, le niveau d'expression de la GST est considéré comme étant un facteur important dans la protection des organismes contre les effets délétères des composés toxiques (Casalino *et al.*, 2004). De plus, dans notre étude, nous avons observé une augmentation significative de l'activité de la GST pour les larves exposées à 1 mg/l de PCBs. Cette protéine dimérique qu'est la GST, a une masse moléculaire comprise entre 22-28 kDa (Angelucci *et al.*, 2001) et a un point isoélectrique de 5,5 (Yang *et al.*, 2003). Or, sur la photo du gel bidimensionnel DIGE comprenant les deux spots marqués, nous voyons que le spot n°1932 a un pI se situant à un pH entre 5 et 6 et un poids moléculaire proche de 28 kDa. Le spot n°1932 pourrait effectivement correspondre à la GST. Mais une identification des protéines grâce à la spectrométrie de masse est nécessaire. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la GST pourrait également être employée après transfert des protéines sur une membrane en nitrocellulose.

De plus, il reste une incertitude à lever. Les modifications de l'expression des protéines suite à une exposition aux PCBs sont-elles réellement dues à une modification de la transcription des gènes correspondants ? En effet, de nombreux paramètres interviennent dans la présence et la quantité de protéines dans une cellule. Parmi ces paramètres nous retrouvons les niveaux de taux de transcription du gène, l'exportation de l'ARNm dans le cytoplasme, la régulation de la traduction, les modifications post-traductionnelles ainsi que la dégradation de la protéine (Graves et Haystead, 2002). Rien ne nous permet d'affirmer, par exemple, que la sous-expression observée pour le spot n°111 soit le résultat de la répression du gène codant pour cette protéine. Il se pourrait que cette diminution d'expression soit le résultat de la dégradation de la protéine (pouvant être oxydée par les PCBs) par un centre protéolytique. Pour venir à bout de ce genre d'interrogations, une étude au niveau transcriptomique devrait être menée conjointement à une étude au niveau protéomique. Cela permettrait de savoir si la quantité d'ARNm codant pour les protéines sur- ou sous-exprimées est modifiée ce qui serait le reflet des taux de transcription des gènes correspondants.

Jelaso *et al.* (2002) se sont intéressés à la définition de patrons d'expression de gènes en tant que biomarqueurs d'effets sur la santé induits par une exposition à court terme (deux jours) chez des larves *X laevis* à des PCBs. Ils ont sélectionné 11 gènes biomarqueurs ayant des rôles bien définis dans les processus de régulation physiologique chez les amphibiens. Les têtards exposés du 5^{ème} au 7^{ème} jour PF à des PCBs présentent peu de changement dans l'expression des 11 gènes sélectionnés. Les têtards exposés du 11^{ème} au 13^{ème} jour PF aux doses élevées d'Aroclor 1254 (25 ou 50 mg/l) présentent des diminutions dans l'expression de 9 gènes sur 11. Cette diminution est également obtenue lors d'exposition aux faibles doses (10 mg/l), tandis qu'à 1 mg/l, l'expression de 4 gènes sur 11 était modifiée. Avant le 11^{ème} jour PF, il n'y aurait pas d'effet des PCBs sur l'expression des gènes. Or, ces auteurs utilisent une méthode « avec *a priori* » pour quantifier l'expression des 11 gènes sélectionnés. Ces méthodes sont réductionnistes car elles se focalisent sur un petit nombre de gènes, suspectés intervenir dans le processus biologique étudié. En ce qui nous concerne, nous utilisons une approche

« sans *a priori* » au niveau protéomique, c'est-à-dire qu'aucune sélection n'est réalisée au départ. Maintenant, des techniques « sans *a priori* » existent également au niveau transcriptomique. Il s'agit notamment de l'utilisation de puces à ADN (*microarrays*) ou encore de la technique du SAGE (« *Serial Analysis of Gene Expression* »). Il serait tout à fait intéressant de relier les résultats obtenus « sans *a priori* » par l'approche transcriptomique et protéomique.

Les principales études au niveau protéomique concernent le domaine biomédical. En ce qui concerne le domaine de l'écotoxicologie aquatique, quelques études utilisent l'analyse protéomique pour mettre en évidence des profils d'expression de protéines (PEPs) induits suite à l'exposition à un xénobiotique donné. Cela permet ainsi de caractériser au niveau protéomique, les modifications occasionnées par ce polluant. Ainsi, des différences significatives dans les PEPs en réponse à des métaux et à des polluants ont été mises en évidence chez la palourde *Chamalea gallina* incluant des altérations dans les niveaux d'expression des protéines du cytosquelette (Rodriguez-Ortega *et al.*, 2003 dans McDonagh *et al.*, 2005). Silvestre F. (2005) a réussi à mettre en évidence des profils d'expression de protéines induits chez le crabe chinois suite à une exposition à du cadmium. Pour ce faire, il a utilisé la technique des gels bidimensionnels colorés à l'argent. Cette analyse protéomique a mis en évidence la sur- ou sous- expression d'un total de 34 spots dans les branchies antérieures de crabes chinois soumis à une exposition aiguë (0,5 mg/l – 3 jours) ou chronique (50 µg/l – 30 jours) au cadmium. Toutefois, une des limitations des gels colorés à l'Ag lorsqu'on travaille sur des organismes entiers est l'importante variabilité. Ainsi, Silvestre F. (2005) stipule que cette technique est surtout intéressante pour mettre en évidence des variations d'expression supérieures ou égales à 2 fois.

Un des avantages de l'analyse DIGE est la rapidité à laquelle nous avons obtenu des résultats aussi bien dans l'analyse que dans la comparaison des gels. Elle nous a permis également de diminuer le nombre de gels à réaliser. En effet, un total de 3 gels a été réalisé, chacun des gels comprenait un standard interne regroupant les différents échantillons utilisés, la condition 'contrôle DMSO' et la condition 1 mg/l. Cependant, les 3 gels doivent être parfaitement réussis or nous en avons un qui était moins beau que les autres, ce qui a pu être la cause de plus de variabilité. Le *matching* devrait être amélioré car sur un total de 1942 spots, seulement 231 se retrouvaient dans les 3 gels. De plus, le t-student nous montre seulement 2 variations d'expression significatives ce qui pourrait signifier que le nombre de gels réalisés devrait être augmenté. La reproductibilité des expériences n'est pas toujours bonne. En effet, parmi les 3 gels réalisés, 40 sur 70 spots dont l'expression varie de 30 % et plus n'évoluent pas dans le même sens (cette limite n'est cependant pas due au DIGE). Enfin, la sensibilité semble meilleure car l'analyse a permis de détecter des variations d'abondance de 1,31 fois mais aucun t-student n'est significatif en-dessous de 1,3 fois. Cela semble être la limite de la méthodologie employée dans notre travail mais la sensibilité reste toutefois meilleure qu'à l'Ag.

Cinquième partie

Conclusions et
perspectives

Conclusions et perspectives

Actuellement, une des causes avancée par la communauté scientifique pour expliquer le déclin significatif des populations d'amphibien à travers les continents est leur exposition prolongée à des xénobiotiques dont font partie les PCBs. Plusieurs études ont montré qu'une exposition à des PCBs pouvait perturber la croissance, le développement et le comportement de jeunes organismes aquatiques, incluant les amphibiens. Les larves d'amphibiens constituent de bons indicateurs des pollutions environnementales car en plus de développer tous leurs stades dans le milieu aquatique, elles sont particulièrement sensibles aux polluants pouvant interagir avec leurs différents constituants cellulaires et venir notamment perturber le bon déroulement de la métamorphose.

Au cours des premiers stades de développement des larves de *X. laevis* (exposées du 2^{ème} au 5^{ème} jour PF), les PCBs sont responsables d'une diminution du poids des individus. A des doses élevées (10 mg/l), les larves ne résistent pas, elles meurent. A la vue de ces résultats, nous pouvons dire que la limite de tolérance des larves semble se situer aux alentours de la concentration 1 mg/l. En effet, c'est à cette concentration que des augmentations significatives dans l'activité d'une enzyme détoxifiante de phase II, la glutathion S-transférase, sont apparues suite à une exposition à court terme à des PCBs. Ces larves survivent sans présenter de malformations ou de dysfonctionnements du comportement apparents. Cependant, aucun effet significatif des PCBs sur les autres systèmes antioxydants n'a été relevé pour les larves exposées à 1 mg/l ainsi que pour les autres groupes.

Soulignons le fait que les systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques constituent des biomarqueurs pertinents en écotoxicologie aquatique. La surveillance de la qualité des écosystèmes repose en grande partie sur l'évaluation de l'impact écotoxicologique des polluants grâce à des méthodes simples et fiables, bien adaptées à l'étude des effets des polluants sur les organismes aquatiques. Dans ce contexte, les biomarqueurs apparaissent comme des outils essentiels dans l'évaluation d'effets chroniques ou aigus à des polluants sur des individus ou des populations. Le terme biomarqueur s'applique aux structures ou processus biologiques dont les variations, induites par des xénobiotiques ou autres composés environnementaux, sont observables et/ou mesurables au niveau de l'individu. Cependant la combinaison de plusieurs biomarqueurs à différents niveaux (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental) reste indispensable pour évaluer l'impact et les réponses d'organismes aquatiques suite à une exposition à des contaminants.

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

Les PCBs exercent également leurs effets au niveau des protéines. En effet, l'analyse protéomique nous apprend que l'exposition de larves à 1 mg/l de PCBs induit une modification significative de l'expression de deux protéines. Cependant, rien ne nous prouve qu'il s'agisse d'une augmentation du taux de transcription du gène correspondant. Il se peut que cette surexpression corresponde à une augmentation de la dégradation de la protéine par des centres protéolytiques. Ces constatations rejoignent les travaux de Jelaso *et al.*, (2002 ; 2003) dans lesquels les niveaux d'expression des gènes étaient également modifiés chez des larves, en cours de développement, suite à une contamination à de l'Aroclor 1254 sans aucunes modifications apparentes du comportement.

Au vu des résultats obtenus, peu de protéines ont leur expression modifiée à la suite d'une contamination à court terme par des PCBs. Cependant, une grande variabilité a été mise en évidence au sein de la dose traitée ce qui signifie que le nombre de répétitions devraient être augmenté à ce niveau afin d'obtenir davantage de modifications d'expression significatives. La technique du 2D-DIGE, employée dans notre travail, a été pour la première fois utilisée dans une étude en écotoxicologie. Elle comporte de nombreux avantages et est porteuse de succès à l'avenir dans un domaine d'écotoxicologie aquatique.

Il serait bien évidemment intéressant d'identifier, par spectrométrie de masse, les protéines dont l'abondance varie significativement. Cela nous renseignerait sur la nature de la protéine, le rôle qu'elle tient dans les organismes étudiés et de comprendre la raison pour laquelle elle a été sur- ou sous- exprimée.

A l'exposition des amphibiens aux polluants environnementaux comme une des cause du déclin de leur population, s'ajoute également d'autres facteurs comme la dégradation de l'habitat par l'homme, les radiations UV, la dégradation du milieu aquatique,... Il est donc indispensable de replacer la problématique dans son contexte général et de tenir compte de tous les éléments du milieu pour expliquer un tel changement dans la population d'amphibiens. De plus, il serait intéressant d'étudier l'effet d'une contamination par un polluant non plus uniquement à l'échelle de l'individu mais regarder ce qui se passe au sein de la population.

Ce travail nous a permis de mettre en évidence un état de stress chez les larves de *X. laevis* en contact avec les PCBs. A 1 mg/l, l'activité de la GST ainsi que l'expression de 2 protéines sont modifiées. De tels biomarqueurs pourraient être utiles dans le sens où ils nous permettraient de mettre en évidence un changement induit chez des larves en contact avec un environnement stressant alors même que les niveaux d'organisation supérieurs de l'organisme peuvent paraître intacts. Les biomarqueurs seraient des systèmes d'alarme vis-à-vis de pollutions, et permettraient de prendre des dispositions avant que l'écosystème ne soit affecté de manière irréversible.

Bibliographie

Bibliographie

Allen, R.G. (1991). Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Society for Experimental Biology and Medicine* **196**, 117-129.

Amicarelli, F., Falone, S., Cattani, F., Alamanou, M.T., Bonfigli, A., Zarivi, O., Miranda, M., Ragnelli, A.M., Di Ilio, C. (2004). Amphibian transition to the oxidant terrestrial environment affects the expression of glutathione S-transferases isoenzymatic pattern. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1691**, 181-192.

Angelucci, S., Sacchetta, P., De Luca, A., Moio, P., Amicarelli, F., Di Ilio, C. (2002). Glutathione transferase isoenzymes from frog (*Xenopus laevis*) liver and embryo. *Biochimica et Biophysica Acta* **1569**, 81-85.

Anguiano, O.L., Caballero de Castro, A., Pechen de D'Angelo, A.M. (2001). The role of glutathion conjugaison in the regulation of early toad embryo's tolerance to pesticides. *Comparative Biochemistry and Physiology* **128**, 35-43.

Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P., De Duve, C. (1964). Tissue fractionation studies, 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **92**, 179-184.

Carey, C. & Bryant, C.J. (1995). Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. *Environmental health perspectives* **103**, Supplement 4, 13-17.

Carldberg, I., Mannervik, B. (1975). Purification and characterization of the flavo enzyme glutathione reductase from the rat liver. *J. Biol. Chem.* **250**, 5475-5480.

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

Celander, M., Weisbrod, R., & Stegeman, J.J. (1997) Glucocorticoid potentiation of cytochrome P4501A1 induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in porcine and human endothelial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **232**, 749-753

Cristea, I.M., Gaskell, S.J. & Whetton, A.D. (2004). Proteomics techniques and their application to hematology. *Blood* **103**, 3624-3634.

Debie, C., Pomeroy, P.P., Thomé, J.P., Mignolet, E., de Tillesse, T., Larondelle, Y. (2004). An unexpected parallelism between Vitamin A and PCBs in seal milk. *Aquatic Toxicology* **68**, 179-183.

Fadhel, Z., Lu, Z., Roberston, L.W., Glauert, H.P. (2002). Effect of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the induction of the hepatic

lipid peroxidation and cytochrome P-450 associated enzyme activities in rats. *Toxicology* **175**, 15-25.

Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S. (2000). Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat. Toxicol.* **49**, 243-250.

Fisher, M. A., Jelaso, A.M., Predenkiewicz, A., Schuster, L., Means, J., Ide, C.F. (2003). Exposure to the PCB mixture Aroclor 1254 alters melanocyte and tail muscle morphology in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 321-328.

Flohé, L., Günzler, W.A. (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**, 114-121.

Franquinet, R. et Foucrier, J. (1998). Atlas, embryologie descriptive. Dunod, Paris, 147 pp.

Freeman, W.M. & Hemby, S.E. (2004). Proteomics for protein expression profiling in neuroscience. *Neurochemical Research* **29**, 1065-1081.

Girish, S. & Saidapur, S.K. (2003). Density-dependant growth and metamorphosis in the larval bronze frog *Rana temporalis* is influenced by genetic relatedness of the cohort. *J. Biosc.* **28**, 489-496.

Graves, P.R. & Haystead, A.J. (2002). Molecular Biologist's Guide to Proteomics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **66**, 39-63.

Gutleb, A.C., Appelman, J., Bronkhorst, M.C., van der Berg, J.H.J., Spenkeliink, A., Brouwer, A., Murk, A. (1999). Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environnemental Toxicology and Pharmacology* **8**, 1-14.

Gutleb, A.C., Appelman, J., Bronkhorst, M., van der Berg, J.H.J., Murk, A.J. (2000). Effects of oral exposure to PCBs on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *The Science of the Total Environment* **262**, 147-157.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130-7139.

Henry, T.R., Spitsbergen, J.M., Hornung, M.W., Abnet, C.C., Peterson, R.E. (1997). Early life stages toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol* **142**, 56-68.

Hilscherova, K., Blankenship, A.L., Nie, M., Coady, K.K., Upham, B.L., Trosko, J.E., Giesy, J.P. (2003). Oxidative stress in liver and brain of the hatchling chicken (*Gallus domesticus*) following in ovo injection with TCDD. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **136**, 29-45.

- Jelaso, A.M., Lehigh-Shirey, E., Predenkiewicz, A., Means, J., Ide, C.F. (2002). Aroclor 1254 alters morphology, survival and gene expression in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **40**, 24-35.
- Jelaso, A.M., Lehigh-Shirey, E., Means, J., Ide, C.F. (2003). Gene expression patterns predict exposure to PCBs in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **42**, 1-10.
- Kadokami, K., Takeishi, M., Kuramoto, M., Ono, Y. (2004) Maternal transfer of organochlorine pesticides, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and coplanar polychlorinated biphenyls in frogs to their eggs. *Chemosphere* **57**, 383-389.
- Katynski, A.L., Viyayan, M.M., Kennedy, S.W., Moon, T.W. (2003). 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) impacts hepatic lipid peroxidation, membrane fluidity and β -adrenoceptor kinetics in chick embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology* **137**, 81-93.
- Knowles, M.R., Cervino, S., Hunt, P.S., de Felipe, C., Salim, K., Meneses-Lorente, G., McAllister, G., Guest, P.C. (2003). Multiplex proteomic analysis by two-dimensional differential in-gel electrophoresis. *Proteomics* **3**, 1162-1171.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. Masson, Paris, 419 pp.
- Livingstone, D.R., Archibald, S., Chipman, J.K., Marsh, J.W. (1992). Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea. *Mar.Ecol. Prog. Ser.* **91**, 97-104.
- Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., Rocher, B. (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutases and of glutathione S-transferase. *Aquatic Toxicology* **70**, 83-93.
- McDonagh, B., Raymont, T., Sheehan, D. (2005). Carbonylation and glutathionylation of proteins in the blue mussel *Mytilus edulis* detected by proteomic analysis and Western blotting: Actin as a target for oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, Article in press, 1-11.
- Mockett, R.J., Bayne, A.C., Sohal, B.H., Sohal, R.S. (2002). Biochemical assay of superoxide dismutases activity in *Drosophila*. *Methods Enzymol.* **349**, 287-292.
- Mohandas, J., Marshall, J.J., Duggin, G.G., Horvath, J.S., Tiller, D.J. (1984). Low activities of glutathione-related enzymes as factors in the genesis of urinary bladder cancer. *Cancer Res.* **44**, 5086-5091.
- Murugesan, P., Kanagaraj, P., Yuvaraj, S., Balasubramanian, K., Aruldhas, M.M., Arunakaran, J. (2005). The inhibitory effects of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on Leydig cell LH receptors, steroidogenic enzymes and antioxidant enzymes in adult rats. *Reproductive Toxicology* **20**, 117-126.

- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S. (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *The Science of the Total Environment* **309**, 105-115.
- Peña-Llopis, S., Ferrando, M.D., Peña, J.B. (2003). Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by *N*-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology* **65**, 337-360.
- Perez-Campo, R., Lopez-Torres, M., Cadenas, S., Barha, G. (1993) A comparative study of free radicals in vertebrates, antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology* **105**, 749-755.
- Powell, D.C., Aulerich, R.J., Stromborg, K.L., Bursian, S.J. (1996). Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on the developing chicken embryo when injected prior to incubation. *J Toxicol Environ Health* **49**, 319-338.
- Radi, A.A.R. et Matkovics, B. (1988). Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology* **90**, 69-72.
- Reijnders, P.J.H. & Brasseur, S.M.J.M. (1997). Xenobiotic induced hormonal and associated developmental disorders in marine organisms and related effects in humans; an overview. *Journal of Clean Technology, Environmental Toxicology, and Occupational Medicine* **6**, 367-380
- Ribera, D., Narbonne, J.F., Michel, X., Livingstone, D.R., O'Hara, S. (1991). Responses of antioxidants and lipid peroxidation in mussels to oxidative damage exposure. *Comp. Bioch. Physiol.* **100**, 177-181.
- Rodriguez-Ariza, A., Peinado, J., Pueyo, C., Lopez-Barea, J. (1993). Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* **50**, 2568-2573.
- Roy, N.K., Courtenay, S., Maxwell, G., Yuan, Z., Chambers, C.R., Wirgin, I. (2002). Cytochrome P4501A1 is induced by PCB 77 and benzo[a]pyrene treatment but not by exposure to the Hudson River environment in Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) post-yolk sac larvae. *Biomarkers* **7**, 162-173.
- Safe, S.H. (1994). Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment. *Critical Review Toxicology* **21**, 87-149.
- Savage, W.K., Quimby, F.W., DeCaprio, A.P. (2002). Lethal and sublethal effects of polychlorinated biphenyls on *Rana Sylvatica* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 168-174.
- Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* **106**, 715-792.

- Shara, M.A., Stohs, S.J.** (1987) Biochemical and toxicological effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) congeners in female rats. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **16**, 599-605.
- Shepard, J.L., Olsson, B., Tedengren, M., Bradley, B.P.** (2002). Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Mar. Environ. Res.* **50**, 337-340.
- Shi, Y-B.** (1999). Amphibian metamorphosis: from morphology to molecular biology. Wiley-Liss, United States of America, 288 pp.
- Silvestre, F.** (2005). Thèse: Réponses à un stress environnemental induit par le cadmium chez un crustacé euryhalin, *Eriocheir sinensis*. Approche intégrative incluant une analyse du protéome. In Département de biologie 247 (Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix).
- Sridhar, M., Venkataramen, P., Dhanammal, S., Arunkumar, A., Aruldas, M.M., Srinivasan, N., Arunakaran, J.** (2004). Impact of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) and vitamin C on antioxidant system of rat ventral prostate. *Asian J Androl* **6**, 19-22.
- Starrs, A.P., Orgeig, S., Daniels, C.B., Davies, M., Lopatko, O.V.** (2001). Antioxidant enzymes in the developing lungs of egg-laying and metamorphosing vertebrates. *The Journal of Experimental Biology* **204**, 3973-3981.
- Tata, J.R.** (1999). Amphibian metamorphosis as a model for studying the developmental actions of thyroid hormone. *Biochimie* **81**, 359-366.
Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA), 2001, France.
- Thomé, J.P., Bertand, A., Brose, F., Carabin, O., De Pauw, E., Dykmans, C., Eppe, G., Gaspar, P., Louvet, M., Maghuin-Rogister, G., Marneffe, Y., Massart, A.C., Phillippart, J.C., Rimbaut, G.** (2003) Evaluation du niveau de contamination des rivières par les PCBs et les « Dioxines », Tome 1. Convention avec la Région Wallonne, Ministère de l'Aménagement du Territoire, de l'Urbanisme et de l'Environnement. Engagement n°01/41431. L.E.A.E. : Université de Liège, Centre d'Analyse des Résidus en Traces.
- Tinsley, R.C. & Kobel, H.R.** (1996). The biology of *Xenopus*. Oxford, Londres, 440 pp.
- Toft, G., Hagmar, L., Giwercman, A., Bonde, J.P.** (2004). Epidemiological evidence on reproductive effects of persistent organochlorines in humans. *Reproductive Toxicology* **19**, 5-26.
- Twaroski, T.P., O'Brien, M.L., Robertson, L.W.** (2001). Effects of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on hepatic glutathione, glutathione-related enzymes, and selenium status: implications for oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* **62**, 273-281.
- Ulbrich, B. & Stahlmann, R.** (2004). Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. *Arch. Toxicol.* **78**, 252-268.

- Unlu, M., Morgan, M.E., & Minden, J.S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**, 2071-2077.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, C.J., van Leeuwen, F.X.R., Liem, D.A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S.,
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**, 57-149.
- Venditti, P., Daniele, C.M., Balestrieri, M., Di Meo, S. (1999). Protection against oxidative stress in liver of four different vertebrates. *Journal of Experimental Zoology* **284**, 610-616.
- Venkataraman, P., Sridhar, M., Dhanammal, S., Vijayababu, M.R., Srinivasan, N., Arunakaran, J. (2004). Antioxidant role of zinc in PCB (Aroclor 1254) exposed ventral prostate of albino rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **15**, 608-613.
- Venturino, A., Rosenbaum, E., Caballero de Castro, A., Anguiano, O.L., Gauna, L., Fonovich de Schroeder, T., Pechen de D'Angelo, A.M. (2003). Biomarkers of effect in toads and frogs. *Biomarkers* **8**, 167-186.
- Walker, M.K., Peterson, R.E. (1992) Toxicity of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls during early development in fish. *Modern Environmental Toxicology* **21**, 195-202.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996). Current challenges and future applications for protein maps and posttranslational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* **17**, 830-838.
- Yamamoto, K., Fukuda, N., Shiroy, S., Shiotsuki, Y., Nagata, Y., Tani, T., Sakai, T. (1994). Ameliorative effect of dietary probucol on polychlorinated biphenyls-induced hypercholesterolemia and lipid peroxidation in the rat. *Life Sciences* **54**, 1019-1026.
- Yang, H-L., Zeng, Q-Y., Nie, L-J., Zhu, S-G., Zhou, X-W. (2003). Purification and characterization of a novel glutathione S-transferase from *Atactodea striata*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **307**, 626-631.
- Zhou, G., Li, H., DeCamp, D., Chen, S., Hongjun, S., Gong, Y., Flaig, M., Gillespie, J.W., Hu, N., Taylor, P., Emmert-Buck, M.R., Liotta, L.A., Petricoin, E.F., Zhao, Y. (2002). 2D Differential In-Gel Electrophoresis for the identification of esophageal cancer cell cancer-specific protein markers. *Molecular & Cellular Proteomics* **1.2.**, 117-123.
- Zhou, J.M., Qin, Z.F., Cong, L., Xu, B. (2004). Toxicity of PCBs (Aroclor-1221, 1254) to embryos and larvae of *Xenopus laevis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **73**, 379-384.

Sites internet:

http://www.chem.unep.ch/pops/POPS_Inc/proceedings/bamako/eng/FIEDLER1.html

<http://w3.umh.ac.be/~ichim/docs/99-04/99-04.html>

<http://www.on.ec.gc.ca/>

<http://www.amershambiosciences.com>

<http://w3.umh.ac.be/~ichim/docs/99-04/99-04.html>

www.psycho.uni-duesseldorf.de/aap/projects/gpower/