



UNIVERSITÉ DE LIÈGE  
Faculté des Sciences  
Département des Sciences et Gestion de l'Environnement  
Laboratoire d'Ecologie animale et d'Ecotoxicologie



Contribution au développement de biomarqueurs  
d'exposition aux PCBs chez *Gammarus pulex* Linné, 1758  
(Crustacé Amphipode)

Mémoire présenté par Loïc MICHEL  
en vue de l'obtention du titre de Licencié en Sciences Biologiques  
Orientation Biologie animale  
Promoteur : Prof. J.-P. THOMÉ

Année Académique 2004-2005

## Remerciements

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de celui-ci :

Le Professeur Jean-Pierre Thomé, promoteur de ce travail, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire, et qui a supervisé ce travail, pour ses critiques pertinentes et ses efforts de disponibilité. A l'expression de ma gratitude, je souhaite ajouter tous mes vœux de prompt rétablissement.

Le Professeur Eric Haubruge, pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire, ainsi que pour ses conseils, sa disponibilité et surtout pour l'attention qu'il a bien voulu apporter à la relecture de ce mémoire.

Le Professeur Erwin De Pauw, pour m'avoir permis d'utiliser le matériel de son laboratoire, ainsi que pour ses conseils.

Arnaud Bertrand, pour ses conseils, son aide technique précieuse lors des dosages d'activités enzymatiques et les bons moments passés ensemble. Je lui souhaite, à lui aussi, un prompt rétablissement.

Murielle Louvet, pour son aide technique, sa bonne humeur quotidienne et ses inestimables capacités à rattraper ou réparer les erreurs de manipulations et autres problèmes expérimentaux.

Laurence Fagot, Alabi Taofic et Nicolas Smargiasso, pour leur aide dans la réalisation des analyses protéomiques.

Nicole Decloux, Christine Dykmans et Célia Joaquim-Justo, pour leur aide technique, leur sympathie et leur gentillesse.

Dorian Kempeneers, pour le précieux coup de main lors de la campagne de prélèvements.

Enfin mes parents, ma copine, Dorothée, et mes amis (que je ne citerai pas ici, plus par peur d'une omission que d'autre chose), pour leur soutien non seulement durant la réalisation de ce mémoire, mais aussi tout au long de mes études.

## Résumé

Le présent travail avait pour but la mise en évidence de biomarqueurs d'exposition aux polychlorobiphényles (PCBs) chez le crustacé amphipode d'eau douce *Gammarus pulex*.

Dans cette optique, deux biomarqueurs potentiels ont été testés, à savoir l'activité d'une enzyme de détoxification de la phase I (l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase, ou EROD) et l'activité d'une famille d'enzymes de détoxification de la phase II (les glutathion-S-transférases, ou GSTs).

Afin de détecter une éventuelle induction de l'activité de ces enzymes chez des individus exposés aux PCBs, un protocole a été mis au point pour contaminer des gammares *in vitro*. Des spécimens provenant d'un site de référence faiblement contaminé, le Blanc Gravier à Colonster, ont ainsi été exposés à des congénères de PCBs utilisés seuls (congénères n° 77 ou n° 169) ou en mélange (congénères n° 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180). Ce protocole s'est révélé adéquat, dans la mesure où il allie une mortalité acceptable et des taux élevés d'accumulation des toxiques.

Une induction significative de l'activité des GSTs a pu être mise en évidence chez les gammares exposés *in vitro* aux PCBs, mais aussi chez des gammares prélevés dans le milieu naturel en des sites pollués par les PCBs (Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont, Ourthe à Angleur et Mehaigne à Wanze). Ceci nous amène à penser que l'induction de l'activité des GSTs constitue un biomarqueur d'exposition potentiel intéressant.

Nous ne sommes pas parvenus à mettre au point le dosage de l'activité de l'EROD chez *Gammarus pulex*. Ces essais ne peuvent donc être considérés que comme une première approche, et il nous est impossible d'arriver à une conclusion concernant l'intérêt de l'induction de l'activité de l'EROD en tant que biomarqueur d'exposition aux PCBs chez *Gammarus pulex*.

A côté de ces mesures d'activité enzymatiques, des analyses protéomiques (électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide) ont également été réalisées, dans le but de détecter d'éventuelles variations d'expression protéique entre individus témoins ou contaminés *in vitro* par les PCBs. Ces variations pourraient, le cas échéant, être utilisées pour le développement de biomarqueurs d'exposition aux PCBs.

Bien que, dans le cadre de ce mémoire, nous n'ayons pas pu mettre en évidence de différences d'expression directement imputables à l'action des toxiques, nous sommes parvenus à obtenir des gels d'électrophorèse potentiellement utilisables pour l'identification des protéines contenues dans ces gels, et la méthode utilisée ici est donc susceptible d'être utilisée lors d'études ultérieures similaires.

# Table des matières

I. Avant-propos.....	1
II. Objectifs.....	2
III. Introduction.....	3
1. Les biomarqueurs.....	3
1.1 : Définition du terme.....	3
1.2 : Différentes classes de biomarqueurs .....	3
1.3 : L'espèce sentinelle : définition.....	4
2. Les PCBs.....	5
2.1 : Structure chimique.....	5
2.2 : Propriétés physico-chimiques et historique de l'utilisation des PCBs .....	5
2.3 : Bioaccumulation et distribution dans les organismes.....	6
2.4 : Toxicité des PCBs vis-à-vis des organismes contaminés.....	7
3. La biotransformation.....	8
3.1 : Métabolisation et élimination des xénobiotiques .....	8
3.2 : La phase I : Les monooxygénases à cytochrome P450 .....	9
3.3 : La phase II : les glutathion-S-transférases.....	10
4. Le gammare.....	12
4.1 : Position systématique et répartition géographique.....	12
4.2 : Ecologie et morphologie.....	13
4.3 : Reproduction et développement .....	13
4.4 : Intérêt du gammare comme espèce sentinelle .....	14
5. Etudes préalables concernant le gammare .....	15
5.1 : Réponses comportementales.....	15
5.2 : Réponses au niveau reproductif.....	15
5.3 : Réponses au niveau de la croissance et de la prise de nourriture .....	15
5.4 : Réponses morphologiques.....	16
5.5 : Réponses au niveau de la bioaccumulation .....	16
5.6 : Réponses physiologiques et biochimiques .....	16
IV. Matériel & méthodes.....	19
1. Mise en place d'un élevage de gammares .....	19
2. Choix des sites de prélèvement.....	19
3. Détermination des gammares.....	20

4. Contaminations de gammare <i>in vitro</i> .....	20
4.1 : Protocole de contamination .....	20
4.2 : Choix des toxiques.....	20
4.3 Concentrations et enrichissement des solutions aqueuses de PCBs .....	21
5. Dosages de PCBs dans les tissus animaux.....	21
5.1 : Lyophilisation.....	22
5.2 : Extraction des lipides.....	22
5.3 : Clean-up acide .....	23
5.4 : Clean-up Florisil .....	23
5.5 : Conditionnement de l'extrait à injecter en GC/ECD.....	24
5.6 : Analyse de l'échantillon .....	24
5.7 : Traitement des données .....	24
6. Dosages des PCBs dans les solutions aqueuses.....	25
6.1 : Extraction des PCBs co-planaires en solution aqueuse .....	25
6.2 : Etapes suivantes.....	25
7. Dosage de l'activité des GSTs .....	25
7.1 : Principe du dosage.....	25
7.2 : Préparation des homogénats et mesure de l'activité enzymatique .....	26
7.3 : Calcul de l'activité des GSTs .....	26
8. Dosage de l'activité EROD.....	27
8.1 : Principe du dosage.....	27
8.2 : Protocole basé sur celui de FISHER <i>et al.</i> , 2003 .....	27
8.3 : Protocole basé sur celui de KUTLU & SUSUZ, 2004.....	28
9. La protéomique .....	29
9.1 : Concepts généraux et principes de la méthode.....	29
9.2 : Extraction et purification des protéines .....	29
9.3 : Première dimension : focalisation isoélectrique.....	30
9.4 : Seconde dimension : SDS-PAGE.....	30
9.5 : Coloration de gels.....	31
9.6 : Traitement des données .....	31
10. Analyses statistiques .....	32
V. Résultats et discussion.....	33
1. Déterminations des gammare de l'élevage.....	33
2. Survie des gammare durant les contaminations .....	33
3. Concentrations des solutions aqueuses de PCBs .....	34
4. Dosages des PCBs dans les gammare .....	35
4.1 : Dosages des PCBs dans les gammare contaminés en laboratoire.....	35
4.2 : Dosages des PCBs dans les gammare prélevés dans l'environnement.....	36

5. Mise au point de la mesure de l'activité des GSTs.....	39
5.1 : Influence du pH .....	39
5.2 : Influence de la température .....	41
5.3 : Influence du type d'échantillon .....	42
5.4 : Conclusion .....	42
6. Dosages de l'activité des GSTs sur des individus exposés aux PCBs.....	43
6.1 : Dosages de l'activité des GSTs sur des individus contaminés en laboratoire.....	43
6.2 : Dosages de l'activité des GSTs sur des individus prélevés dans l'environnement..	45
7. Mise au point de la mesure de l'activité de l'EROD .....	47
8. Analyse du protéome par électrophorèse 2D .....	49
8.1 : Comparaison des gammars témoins et des gammars non contaminés.....	49
8.2 : Comparaison des gammars contaminés et des gammars non contaminés .....	50
8.3 : Discussion.....	51
 VI. Conclusions et perspectives.....	 52
 VII. Bibliographie	
 VIII. Annexes	

# I. Avant-propos

De nos jours, l'environnement est de plus en plus soumis à l'activité de l'homme, au point qu'il n'existe quasiment plus de milieux réellement naturels. Cette réalité est particulièrement marquée dans les pays industrialisés, comme le nôtre.

Parmi les perturbations engendrées au niveau des différents écosystèmes, on observe notamment le déclin d'un certain nombre d'espèces animales ou végétales. L'une des causes de ce déclin est l'intoxication des organismes par des agents polluants.

Certains de ces polluants, les Polluants Organiques Persistants (POPs), ont une période de rémanence très longue. Par exemple, le DDT, un pesticide organochloré, nécessite de 4 à 30 ans pour être dégradé à 95 % (THOMÉ, 1984). Parmi les molécules regroupées au sein du groupe des POPs, on retrouve des composés comme les PCBs, dioxines, furannes, HAPs, pesticides organochlorés, ...

Une fois libérées dans le milieu de vie des organismes, ces molécules vont contaminer le sol, l'air, l'eau et la nourriture, et, par leur biais, s'accumuler dans les organismes, engendrant ainsi des perturbations à divers niveaux d'organisation s'étalant de l'individu à l'écosystème entier.

De plus, les effets toxiques de ces substances peuvent également se manifester chez l'être humain, souvent lors d'accidents comme l'explosion survenue à Seveso (Italie du Nord, 10/7/1976), ou encore les contaminations d'huile de riz par des PCBs à Yusho (Japon, 1968) ou Taichung (Taïwan, 1969). Plus récemment, en 1999, la "crise de la dioxine", survenue dans notre pays, a permis une prise de conscience généralisée de la problématique de la contamination globale de l'environnement par les xénobiotiques.

Aussi, à l'heure actuelle, les autorités commencent à prendre des mesures afin de réduire l'utilisation des polluants, mais aussi pour rétablir la qualité des écosystèmes touchés à un niveau proche de celui qu'ils montraient auparavant. Parmi ces initiatives, citons la directive 2000/60/CE du Parlement Européen, qui établit un cadre fixant les principes de base pour une politique durable de gestion de l'eau dans l'UE, ce qui implique aussi bien une utilisation prudente des ressources hydriques qu'une surveillance et une protection de la qualité des eaux.

Dans un autre registre, le traité de Johannesburg (2001) a permis l'acceptation d'un accord global sur l'élimination d'une douzaine de POPs, parmi lesquels des pesticides (aldrine, chlordane, dieldrine, DDT, endrine, heptachlore, hexachlorobenzène, mirex et toxaphène), des substances chimiques organochlorées d'origine industrielle (PCBs) ainsi que certains sous-produits de nature industrielle (dioxines et furannes).

Toutefois, bien que leur utilisation soit l'objet d'une réglementation, les propriétés de ces composés sont telles que leur présence dans l'environnement se marquera encore longtemps après l'arrêt, même complet, de leur usage. Dès lors, dans l'optique d'une protection des écosystèmes, il apparaît comme primordial de connaître et de comprendre les effets des xénobiotiques sur les organismes vivants, notamment les organismes constituant les biocénoses aquatiques.

C'est dans ce contexte que se place le présent travail.

## II. Objectifs

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche visant à mettre sur pied une méthode utilisant les puces à ADN dans le cadre de programmes de biomonitoring, et ce en utilisant comme modèle biologique le gammare, *Gammarus pulex*. Ce programme est mené en collaboration par l'Unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive du Professeur Eric Haubruge (FUSAGX) et le Laboratoire d'Ecologie Animale et d'Ecotoxicologie du Professeur Jean-Pierre Thomé (ULg).

Dans le cadre de ce projet, une première phase implique le développement de biomarqueurs d'exposition envers les différents polluants envisagés. Dans cette optique, le présent travail a pour but de mettre en évidence des biomarqueurs d'exposition aux biphényles polychlorés (PCBs) chez *Gammarus pulex*.

A cet effet, deux biomarqueurs potentiels seront testés : l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) ainsi que celle des glutathion-S-transférases (GSTs).

La première étape visera à mettre au point les dosages de ces deux enzymes chez *G. pulex*.

Ensuite, un protocole permettant de contaminer, en laboratoire, des gammarés provenant d'un site de référence très faiblement pollué sera établi.

Des spécimens seront alors contaminés à l'aide de PCB 77, de PCB 169 et d'un mélange contenant les 7 congénères dits "traceurs" (PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180). Ces organismes seront utilisés afin de mesurer les niveaux d'activité des enzymes précitées, et de pouvoir les comparer aux niveaux observés chez les organismes témoins.

Enfin, nous avons tenté de valider ces méthodes en utilisant des animaux directement prélevés dans un milieu naturel, dans des cours d'eau connus pour leur contamination élevée par les PCBs.

Parallèlement à ces mesures d'activités enzymatiques, des analyses protéomiques (électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide) ont également été réalisées, dans le but de détecter des variations éventuelles d'expression protéique entre des individus témoins et des individus contaminés en laboratoire par des PCBs. Ces analyses ont été réalisées à l'Unité du professeur E. Haubruge, en collaboration avec le Laboratoire de Spectrométrie de Masse du Professeur E. De Pauw (ULg).

## III. Introduction

# 1. Les biomarqueurs

## 1.1 : Définition du terme

Plusieurs définitions ont été données pour le terme "biomarqueur", qui est souvent utilisé, dans son acception la plus large, pour désigner presque toutes les mesures reflétant une interaction entre un système biologique et un risque environnemental potentiel, qu'il soit d'origine chimique, physique ou biologique (WHO, 1993 *in* VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Bien que celle de PEAKALL (1994) soit la plus reconnue, d'autres définitions existent, comme celle de VAN GASTEL & VAN BRUMMELEN (1996), qui redéfinissent les termes de biomarqueur, bioindicateur et indicateur écologique en les reliant à différents niveaux d'organisation biologique.

Ainsi, le biomarqueur peut être défini comme un changement d'une réponse biologique pouvant être mis en relation avec l'exposition à des substances chimiques ou avec les effets toxiques de celles-ci. Le terme "réponse biologique" est ici à prendre dans son acception la plus large, depuis le niveau d'une réponse biochimique ou physiologique sub-individuelle jusqu'à celui de la modification de la structure de l'écosystème entier, en passant par le niveau de modifications comportementales d'une population. (PEAKALL, 1994).

Selon cette définition, les espèces bioindicatrices sur lesquelles sont basés les indices biotiques constituent un type particulier de biomarqueurs, la réponse consistant en la présence et/ou l'absence de certains organismes dans un milieu donné.

## 1.2 : Différentes classes de biomarqueurs

On distingue traditionnellement 3 classes de biomarqueurs (NRC, 1987 & WHO, 1993 *in* VAN DER OOST, 2003) :

- Les biomarqueurs **d'exposition** renseignent sur la présence (et éventuellement sur la quantité présente) dans un organisme donné d'une substance exogène ou de ses métabolites, ou d'un produit résultant de l'interaction entre un xénobiotique et une molécule-cible. Généralement, il est possible d'établir un lien entre le degré d'exposition externe et le niveau de réponse interne. Un exemple de biomarqueur d'exposition est l'induction des monooxygénases hépatiques à cytochrome P450 par une exposition aux PCBs, par exemple chez la caille japonaise *Coturnix coturnix japonica* (STOUVENAKERS *et al.*, 1996) ou chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (LIVINGSTONE *et al.*, 1997). En outre, la bioaccumulation de certains polluants environnementaux persistants dans les tissus animaux peut également être considérée comme un biomarqueur d'exposition à ces polluants (VAN DER OOST, 2003).
- Les biomarqueurs **d'effet** sont des altérations au niveau biochimique, physiologique ou autre, mesurables dans les tissus ou fluides corporels d'un organisme et pouvant être corrélées avec une altération de santé établie ou possible. La modification par les PCBs de l'ultrastructure hépatique du barbeau *Barbus barbus*

(HUGLA *et al.*, 1995) ou la formation d'adduits de DNA chez la moule *Mytilus galloprovincialis* suite à une contamination par le benzo[a]pyrène (AKCHA *et al.*, 2000) sont des exemples de biomarqueurs d'effet.

- Enfin, les biomarqueurs **de sensibilité** montrent la capacité innée ou acquise d'un organisme à répondre à une exposition à un xénobiotique spécifique. Cette classe inclut les facteurs génétiques et les changements de récepteurs qui altèrent la sensibilité d'un organisme à cette exposition. Ainsi, HONG & YANG (1997) ont montré que le polymorphisme génétique des cytochromes P450 chez les êtres humains peut être considéré comme un biomarqueur de sensibilité vis-à-vis de l'induction de cancers par des polluants environnementaux.

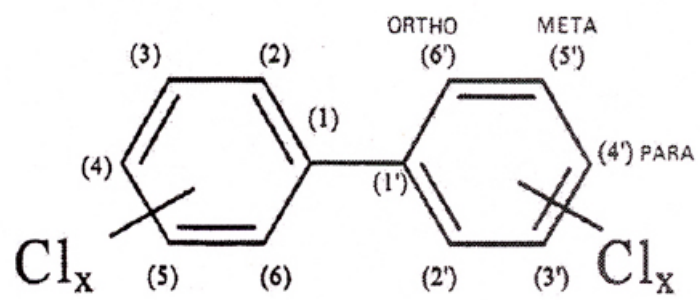
Ainsi, les biomarqueurs d'exposition peuvent être utilisés pour détecter et confirmer l'exposition d'individus à une substance ou à un groupe de substances, tandis que les biomarqueurs d'effet peuvent servir à montrer des altérations pré-cliniques et/ou des effets nocifs pour la santé dus à l'exposition à une substance ou à son absorption. Ces deux types de biomarqueurs diffèrent donc plus au niveau du but dans lequel ils sont utilisés qu'au niveau de leur nature inhérente. Les biomarqueurs de sensibilité, quant à eux, aident à élucider les variations inter-individuelles du niveau de réponse à l'exposition à un toxique au sein d'une population (VAN DER OOST, 2003).

Enfin, pour qu'un biomarqueur soit considéré comme valide et utilisé dans le cadre de programmes de biomonitoring, il doit satisfaire à un certains nombres de conditions (HYNE & MAHER, 2003) :

- Le biomarqueur doit être relié de façon causale à des effets au niveau populationnel ou écologique ;
  - La réponse du biomarqueur au toxique doit être proportionnelle à la quantité de toxique (réponse dose-dépendante) ;
  - Le biomarqueur doit être validé sur le terrain ;
  - La spécificité de la réponse ainsi que son indépendance de sources de variabilité indépendantes du toxique (telles que la saison, la température, le sexe de l'animal, ...) doivent être établies ;
  - Le biomarqueur doit être sensible et être appliqué sur de larges échelles de temps et d'espace ;
  - Le biomarqueur doit être une mesure d'une réponse représentative d'un processus biologique important ;
  - Le biomarqueur doit être facile à mesurer, si possible à faible coût.

### 1.3 : L'espèce sentinelle : définition

L'**espèce sentinelle** se définit comme une espèce constituant un témoin de la pollution environnementale par la mesure de variations biologiques individuelles ou sub-individuelles (contrairement aux bioindicateurs, basés sur la simple présence/absence ou l'abondance des organismes), engendrées par des niveaux de contamination de l'organisme sub-létaux (toxicité chronique). Les paramètres biologiques mesurés dans les espèces sentinelles ne sont autre que les biomarqueurs évoqués plus haut (RAMADE, 1992 ; WALKER *et al.*, 2001). L'avantage des espèces sentinelles par rapport aux espèces indicatrices (bioindicateurs) est



**Figure 1** : Structure chimique des PCBs (d'après THOMÉ *et al.*, 1992).

donc qu'elles constituent une approche prédictive, et qu'ils sont sensibles à des doses plus faibles de toxiques (RAMADE, 1992).

## 2. Les PCBs

NB : Une grande partie des informations contenues dans cette partie proviennent des synthèses de THOMÉ *et al.* (1992) et DEBIER (2001).

### 2.1 : Structure chimique

Les polychlorobiphényles, ou PCBs, sont des composés aromatiques chlorés, constitués d'un noyau biphényle sur lequel sont fixés un ou plusieurs atomes de chlore (figure 1). Dix groupes d'isomères peuvent ainsi être distingués, suivant le nombre d'atomes de chlore substitués (mono- à décachlorobiphényles). Les atomes de chlore peuvent se trouver en position *ortho* (2, 2', 6, 6'), *meta* (3, 3', 5, 5') ou *para* (4, 4'). Les positions de substitution adjacentes, comme 2 et 3 ou 3 et 4, sont appelées positions vicinales.

Au total, on peut dénombrer 209 molécules (également appelées congénères) de PCBs différentes. Celles-ci sont numérotées en fonction du nombre croissant d'atomes de chlore substitués, et ce en suivant les règles de nomenclature IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) (BALLSCHMITTER & ZELL, 1980).

Les anneaux benzènes pouvant pivoter autour de la liaison 1-1', certains congénères vont pouvoir adopter une configuration coplanaire. Ce sera le cas des congénères ne présentant aucune ou une seule substitution en position *ortho* (congénères *non-ortho* et *mono-ortho*). Dans le cas des composés portant 2 atomes de chlore ou plus en position *ortho*, l'encombrement stérique empêche la coplanarité de la molécule et lui donne un aspect globulaire. (DEBIER, 2001).

Les congénères coplanaires, en raison de leur configuration très proche de celle de la 2,3,7,8-tétra-chloro-dibenzo-*p*-dioxine (2,3,7,8-TCDD ou dioxine de Seveso), sont qualifiés de "dioxin-like", et sont susceptibles de posséder un pouvoir toxique comparable à ce composé, considéré comme l'un des micropolluants les plus toxiques qui soient. Parmi ces molécules, on retrouve les congénères n° 77, 81, 126 et 169. (MC FARLAND & CLARKE, 1989).

### 2.2 : Propriétés physico-chimiques et historique de l'utilisation des PCBs

La synthèse des PCBs a été décrite pour la première fois en 1881. Toutefois, leur production à l'échelle industrielle n'a commencé qu'en 1929 (WAID, 1986). Cette utilisation dans l'industrie a été motivée par un certain nombre des propriétés physico-chimiques des PCBs, comme leur stabilité thermique, leur résistance à l'oxydation par les acides et les bases et surtout leurs qualités diélectriques, qui font d'eux des agents isolants remarquables (HUTZINGER *et al.*, 1974). Dès lors, ils ont été utilisés très largement aussi bien dans l'industrie plastique (additifs dans des adhésifs, vernis, peintures, ...) que dans l'industrie électrique (transformateurs et condensateurs).

Il est intéressant de noter que les différents congénères de PCBs n'ont jamais été produits ou utilisés individuellement, mais sous forme de mélanges de différentes molécules. Les noms attribués à ces mélanges commerciaux varient selon les pays de production. Citons, entre autres, les Aroclor<sup>®</sup> de Monsanto (USA), les Clophen<sup>®</sup> de Bayer (Allemagne), les Pyralene<sup>®</sup> de Prodelec (France) ou encore les Kanechlor<sup>®</sup> de Kanegafushi (Japon) (WAID, 1986).

Ce n'est qu'en 1966, en Suède, que les PCBs furent découverts pour la première fois dans l'environnement (JENSEN, 1966). Suite à cette découverte, les études sur ces composés se sont multipliées, révélant non seulement la dispersion généralisée des PCBs dans tous les écosystèmes, mais aussi leur toxicité vis-à-vis des organismes contaminés.

La présence généralisée des PCBs dans tous les compartiments de la biosphère découle également de leurs propriétés physico-chimiques.

En effet, leur faible hydrosolubilité (par ailleurs inversement proportionnelle au nombre d'atomes de chlore substitués) leur confère une tendance marquée à l'adsorption aux particules organiques et inorganiques, particules qui peuvent ensuite être entraînées par les cours d'eau ou s'accumuler dans les sédiments (THOMÉ *et al.*, 1992 ; DEBIER, 2001).

De plus, bien que leurs pression de vapeur soit faible (et elle aussi inversement proportionnelles au degré de chloration de la molécule), les PCBs en solution dans l'eau présentent une vitesse de volatilisation relativement élevée (THOMÉ *et al.*, 1992). Une fois dans l'atmosphère, les PCBs peuvent être emportés par les vents dominants et transportés dans des endroits parfois très éloignés du site d'utilisation, ce qui entraîne une contamination généralisée de la biosphère (MC KAY *et al.*, 1979 ; WAID, 1986).

Enfin, ces molécules montrent une résistance élevée aux processus de biodégradation et de métabolisation par les organismes contaminés. Toutes ces caractéristiques, associées à leur liposolubilité élevée, font des PCBs des substances susceptibles de s'accumuler dans les organismes vivants à des concentrations nettement supérieures à celles détectées dans l'environnement (THOMÉ *et al.*, 1992).

A la lumière de certains de ces éléments, le Japon fut le premier pays à réglementer l'utilisation des PCBs en 1973. Il fut imité par les USA en 1979. Actuellement, l'emploi des PCBs en UE est restreint à la seule industrie électrique (transformateurs et condensateurs) et sera complètement interdit en 2010 (Directive 96/59/EC). En outre, le Traité de Johannesburg (12/2000) prévoit l'élimination totale des installations contenant des PCBs pour 2025.

### 2.3 : Bioaccumulation et distribution dans les organismes

Dans les cas des PCBs, comme pour un grand nombre de polluants, on distingue deux voies principales d'entrée des toxiques dans les organismes.

D'une part, une contamination par voie trophique (ingestion de nourriture contaminée) est possible. Cette contamination orale est responsable du phénomène de **bioamplification**, c'est-à-dire d'accumulation du polluant dans le prédateur à partir de la proie.

D'autre part, on peut assister à une pénétration directe des PCBs à travers les surfaces d'échange, comme la peau et/ou les branchies. Cette voie sera responsable des phénomènes de

**bioconcentration**, c'est-à-dire d'accumulation du polluant dans l'organisme depuis le milieu environnant (RAMADE, 1992 ; HUGLA, 1994).

L'ensemble des phénomènes de bioamplification et de bioconcentration sont regroupés sous le terme générale de **bioaccumulation** (RAMADE, 1992).

Les contributions relatives des deux voies d'entrée des PCBs dans l'organisme varient selon l'organisme envisagé. Ainsi, chez les animaux terrestres et les mammifères marins, la quasi totalité de la contamination sera le fait de l'ingestion de PCBs par voie orale (HUGLA, 1994 ; DEBIER, 2001). Par contre, chez les organismes à respiration aquatique, comme les poissons ou les crustacés, la pénétration à travers les surfaces d'échange intervient également dans une proportion importante (HUGLA, 1994).

Après avoir pénétré dans l'organisme, les PCBs vont gagner le flux sanguin, après diffusion passive à travers l'épithélium intestinal dans le cas d'une contamination orale. Il vont alors se lier à des composés comme l'albumine ou certaines lipoprotéines, avec une affinité d'autant plus grande que le degré de chloration du congénère est élevé. Ces composés vont assurer le transport des PCBs dans l'organisme, notamment vers les organes de détoxification comme le foie des vertébrés ou l'hépatopancréas des crustacés (voir section I.3).

Le sang circulant à travers tous les organes, un équilibre va s'établir entre la concentration sanguine en PCBs et celle des autres organes. Toutefois, de par leurs propriétés lipophiles, les PCBs ne vont pas s'accumuler de la même manière dans tous les organes. Ainsi, les tissus adipeux seront contaminés à des taux beaucoup plus importants que les autres organes. De même, le foie, la peau et, chez les mammifères, le lait, contiennent également des concentrations en PCBs élevées. Enfin, les muscles, de par la grande proportion d'espace corporel qu'ils occupent, sont également susceptibles de contenir d'importantes quantités de PCBs (DEBIER, 2001).

## 2.4 : Toxicité des PCBs vis-à-vis des organismes contaminés

Les effets toxiques consécutifs à une contamination aux PCBs peuvent être de différents types.

D'abord, une mortalité par toxicité aiguë peut être observée. Toutefois, les seuils de toxicité aiguë des mélanges et/ou congénères seuls de PCBs sont généralement assez élevés. Ainsi, chez le gammarus *Gammarus pseudolimnaeus*, la  $LC_{50}$  de l'Aroclor 1242 varie de 5 à 10  $\mu\text{g/L}$ , selon la durée de l'intoxication (STALLING & MAYER, 1972 ; JOHNSON & FINNLEY, 1980). Dans le cas de l'Aroclor 1248, la  $LC_{50}$  est de 52  $\mu\text{g/L}$  (STALLING & MAYER, 1972 ; NEBEKER & PUGLISI, 1974), et dans le cas de l'Aroclor 1254 (un des mélanges commerciaux les plus utilisés), elle atteint même 2400  $\mu\text{g/L}$  (STALLING & MAYER, 1972).

Dans le cas de congénères seuls, MAYER *et al.* (1977) rapportent pour l'espèce *Gammarus fasciatus* des valeurs de  $LC_{50}$  à 96 heures de 70  $\mu\text{g/L}$  pour le congénère n°22, 100  $\mu\text{g/L}$  pour le congénère n°15, 120  $\mu\text{g/L}$  pour le congénère n°8, 150  $\mu\text{g/L}$  pour le congénère n°155 et 210  $\mu\text{g/L}$  pour le congénère n°101. Chez l'amphipode *Hyallela azteca*, il a en outre été montré que si l'exposition à 40  $\mu\text{g/L}$  de PCB n°52 induisait la mort de tous les individus exposés, une

exposition à des quantités beaucoup plus élevées (2700 µg/L) n'induisait qu'une mortalité très faible (BORGSMANN *et al.*, 1990).

En outre, de nombreuses études, principalement basées sur des vertébrés ou sur l'humain, ont révélé un grand nombre d'effets néfastes inhérents à la toxicité chronique des PCBs. Parmi ceux-ci, citons la toxicité hépatique (dégâts ultrastructuraux des hépatocytes et inductions des enzymes de détoxification), la dérégulation endocrinienne, la diminution de fécondité, les altérations de développement des jeunes, la carcinogénicité, l'atrophie du thymus, la perte de poids, la diminution de la réponse immunitaire, des altérations du comportement locomoteur ou sexuel, des problèmes respiratoires ou encore des nécroses (THOMÉ *et al.*, 1992 ; SAFE, 1994 ; STOUVENAKERS *et al.*, 1996 ; QUABIUS *et al.*, 1998 ; HUGLA *et al.*, 1999 ; CHUNG *et al.*, 2001 ; DEBIER, 2001).

Il est important de signaler que l'amplitude des réponses toxiques engendrées par les PCBs dépend de nombreux facteurs, comme l'espèce envisagée, le sexe et l'âge de l'individu considéré, la durée de l'exposition et surtout le congénère utilisé. En effet, comme cela a déjà été signalé plus haut, le degré de chloration et la position des atomes de chlore substitués influent de manière importante sur la toxicité de la molécule. Enfin, signalons que certaines formes de toxicités peuvent être causées par l'interaction de métabolites résultant de la dégradation de certains congénères de PCBs (généralement faiblement chlorés) avec l'ADN, l'ARN ou certaines protéines (SAFE, 1994).

### **3. La biotransformation**

#### 3.1 : Métabolisation et élimination des xénobiotiques

Contrairement aux composés hydrophiles (et donc relativement hydrosolubles), les xénobiotiques hydrophobes ne peuvent être aisément excrétés sous leur forme native. On distingue généralement 2 voies d'élimination de ces composés chez les animaux.

La première est le stockage dans les compartiments lipidiques de l'organisme. Cette voie, utilisée pour les composés très lipophiles comme les organochlorés, permet d'isoler les xénobiotiques du reste de l'organisme et ainsi d'empêcher leur action toxique. Toutefois, lorsque les réserves de graisses sont consommées, les composés sont à nouveau libérés dans l'organisme et retrouvent leur toxicité (BOELSTERLI, 2003).

La seconde voie permet la conversion de composés hydrophobes en composés hydrophiles, par l'intermédiaire d'enzymes. Ce processus, appelé **biotransformation**, est généralement divisé en deux phases (LIVINGSTONE, 1998 ; TIMBRELL, 2000) :

- La **phase I** voit l'altération du xénobiotique par addition, modification ou clivage d'un groupement fonctionnel ( -OH, -COOH, -NO<sub>2</sub>, ...). Il résulte de cette phase, aussi connue sous le nom de phase d'activation, un métabolite prêt pour l'excrétion directe ou pour la réaction de conjugaison. Dans certains cas, le xénobiotique possède déjà un groupement fonctionnel utilisable pour la réaction de conjugaison, et la phase I n'est pas nécessaire.

- La **phase II**, quant à elle, comprend la réaction de conjugaison, dans laquelle une enzyme va coupler au groupe fonctionnel envisagé plus haut un composé endogène polaire (glutathion, sulfate, glucuronide, acide aminé, ...). Le xénobiotique ou son métabolite primaire sont ainsi rendus hydrophiles et peuvent être excrétés.

Si la plupart des processus de biotransformation peuvent être subdivisés en phases I et II, il arrive dans certains cas que les produits de la phase II subissent des réactions de métabolisation supplémentaires. Ces réactions sont regroupées sous l'appellation de réactions de la **phase III** (BOELSTERLI, 2003).

Il convient de remarquer ici que si, dans la majorité des cas, le toxique est inactivé par ces réactions, ce n'est pas toujours le cas. Ainsi, il arrive qu'on observe des phénomènes de **bioactivation**, où les composés sont transformés en métabolites dont la toxicité est plus grande que celle des composés de départ, appelés métabolites biologiquement réactifs (BOELSTERLI, 2003). C'est le cas des insecticides organophosphorés comportant un groupement thion, tels le malathion, le parathion ou le disulfoton, dont la désulfuration oxydative conduit à la formation des oxons correspondants, puissants inhibiteurs des acétylcholinestérases (WALKER *et al.*, 2001 ; ANDERSON & ZHU, 2004). C'est également le mode d'action de certains composés utilisés comme médicaments par l'industrie pharmaceutique, comme le paracétamol (TIMBRELL, 2000).

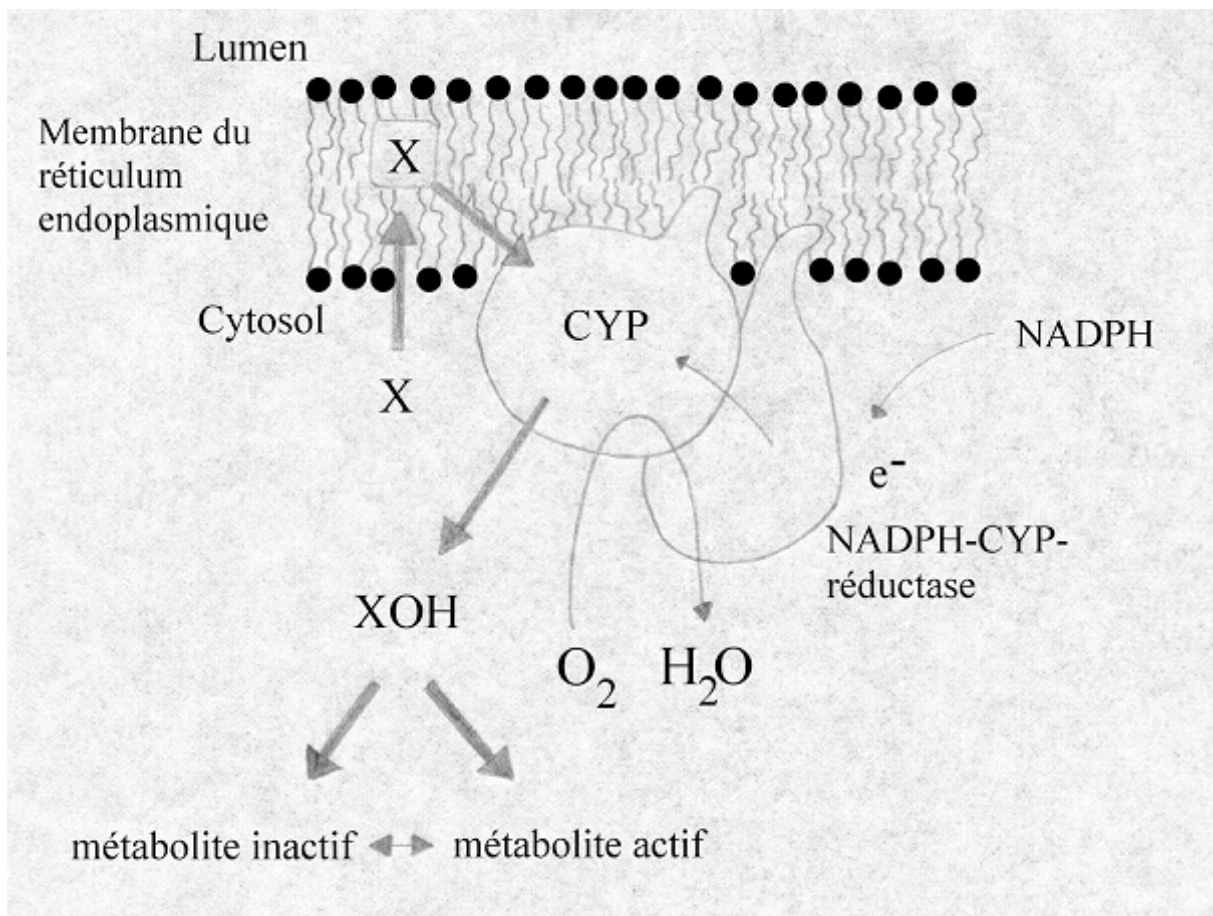
### 3.2 : La phase I : Les monooxygénases à cytochrome P450

Les monooxygénases à cytochrome P450 (en abrégé CYP ou P450), ou oxydases à fonction mixte (MFO) sont une superfamille d'isoenzymes dont la fonction première est le catabolisme de molécules endogènes telles les hormones stéroïdes. Toutefois, elles sont impliquées dans la première phase de transformation des composés peu polaires ou apolaires (dont certains xénobiotiques) en métabolites plus hydrosolubles (BOELSTERLI, 2003 ; JEWELL & WINSTON, 1989).

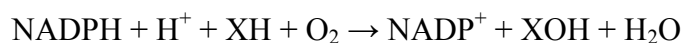
Ces enzymes sont des hémoprotéines formées d'un complexe de ferro-protoporphyrine IX (le groupement prosthétique, site catalytique de l'enzyme) et d'une apoprotéine, chaîne polypeptidique d'un poids moléculaire de 45 à 56 kDa. Le groupement prosthétique peut se lier à une molécule d'oxygène, mais aussi de dioxyde de carbone, et ce via un atome de fer sous la forme  $Fe^{2+}$  (JOKANOVIĆ, 2001 ; LEWIS, 2001).

Le nom de cytochromes P450 trouve son origine dans les premières observations relatives à ces enzymes, au cours desquelles il a été montré que lorsque le fer se complexe avec une molécule de monoxyde de carbone, les enzymes montrent un pic d'absorption à 450 nm (OMURA, 1964). Le terme "oxydases à fonction mixte", quant à lui, se rapporte au fait que lors de l'action de ces enzymes, un atome de la molécule d'oxygène consommée est réduit pour former une molécule d'eau avec l' $H_2$ , tandis que l'autre est inséré dans le xénobiotique (PAYNE *et al.*, 1987).

Les cytochromes P450 ne peuvent fonctionner seules. Elles doivent être associées à une flavoprotéine, la NADPH cytochrome P450 réductase. Cette molécule va transmettre successivement 2 électrons provenant du NADPH aux cytochromes P450, leur permettant ainsi d'hydroxyler le substrat selon la réaction suivante :



**Figure 2 :** Vue d'ensemble du système des monooxygénases à cytochrome P450, montrant la relation étroite entre le cytochrome P450 (CYP) et la NADPH cytochrome P450 réductase, relation permise par la présence de phospholipides. L'abréviation "X" désigne le xénobiotique (d'après BOELSTERLI, 2003 *in* HEINEN, 2003).



Où XH représente le substrat qui est destiné à être hydroxylé et XOH le produit de cette hydroxylation. On remarque que la réaction consomme une molécule de NADPH et une molécule d'oxygène par molécule de substrat hydroxylé. Parfois, les électrons proviennent du NADH et non du NADPH (WALKER *et al.*, 2001).

En plus de la présence de la NADPH cytochrome P450 réductase, les P450 ont également besoin de phospholipides pour fonctionner correctement. Ceux-ci jouent apparemment un rôle important dans le maintien de l'intégrité du complexe enzyme-substrat et permettent l'interaction entre les P450 et la réductase (voir figure 2) (TIMBRELL, 2000 ; BOELSTERLI, 2003). Ceci explique que les P450 soient toujours associés à des membranes, comme la membrane du réticulum endoplasmique lisse dans la majorité des cas, mais aussi la membrane plasmique ou la membrane interne des mitochondries. (BOELSTERLI, 2003).

Chez les vertébrés, ces enzymes sont principalement localisées dans le foie (organe de détoxification) ainsi que dans les tissus par lesquels les xénobiotiques pénètrent dans l'organisme, comme l'intestin, les poumons, la peau et l'épithélium nasal (BOELSTERLI, 2003). Chez les crustacés, on les trouve surtout dans l'hépatopancréas, organe associé au tube digestif et exerçant des fonctions analogues à celle du foie des vertébrés en ce qui concerne la détoxification et le stockage des composés lipophiles (JAMES, 1989)..

On sait depuis longtemps que l'induction des P450 par certaines classes de xénobiotiques présents dans l'eau peut être utilisé comme un système de prédiction très sensible pour évaluer les niveaux de contamination de l'environnement (PAYNE *et al.*, 1987). Dans la nature, deux classes majeures de micropolluants induisent les P450 : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et les organochlorés (BOELSTERLI, 2003).

Parmi ces enzymes, la famille 1A1, induite par les PCBs, dioxines et HAP et caractérisée par l'activité de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD), est la plus utilisée comme biomarqueur (STEGEMAN & HAHN, 1994 *in* FLAMMARION, 2000). Ainsi, l'induction de l'activité de l'EROD suite à l'exposition à des mélanges commerciaux de PCBs ou à des congénères seuls a été démontrée chez de nombreuses espèces de poissons (HUGLA *et al.*, 1995 ; VAN DER OOST *et al.*, 2003).

Chez les invertébrés aquatiques, la situation est moins claire et les études moins nombreuses. Toutefois, une induction du système des P450 a été mise en évidence chez un certain nombre d'espèces. Les principales études traitant de l'induction des P450 chez les invertébrés aquatiques sont présentées au tableau 1.

En ce qui concerne les crustacés, les résultats obtenus sont souvent contradictoires, et la connaissance du fonctionnement précis du système des monooxygénases à cytochrome P450 est relativement limitée (LIVINGSTONE, 1998 ; JAMES & BOYLE, 1998 ; SNYDER, 2000 ; SNYDER & MULDER, 2001).

### 3.3 : La phase II : les glutathion-S-transférases

Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont une famille d'isoenzymes intracellulaires à large spécificité de substrat intervenant dans la phase II de la biotransformation (ADEWALE &

Phase I				
Espèce	Polluant	Réponse mesurée	Taux d'induction	Référence
<i>Mytilus galloprovincialis</i> (mollusque bivalve)	Aroclor 1254 et PCB n°138	Concentration en protéines de type CYP1A1	59-72 %	LIVINGSTONE <i>et al.</i> , 1997
		Activité de la BaPH (Benzo[a]pyrène hydroxylase)	~ 100 %	
<i>Homarus americanus</i> (crustacé décapode)	Heptachlor (pesticide organochloré)	Concentration totale en P450	~ 100 %	SNYDER & MULDER, 2001
<i>Procambarus clarkii</i> (crustacé décapode)	Fenitrothion (insecticide organophosphoré)	Activité de l'EROD	300%	PORTE & ESCARTIN, 1998
<i>Daphnia magna</i> (crustacé cladocère)	Phénobarbital (inducteur modèle)	Impact sur le métabolisme de la testostérone	~ 50 %	BALDWIN & LEBLANC, 1994a
<i>Chironomus riparius</i> (diptère)	Phénobarbital et perméthrine (insecticide pyréthroïde)	Acivité de l'EROD	50-150 %	FISHER <i>et al.</i> , 2003
<i>Chironomus tentans</i> (diptère)	Atrazine (pesticide organochloré)	Acivité de l'AE (Aldrine epoxydase)	300-400 %	MIOTA <i>et al.</i> , 2000
		Concentration en protéines de type CYP450	-	
<i>Asterias rubens</i> (échinoderme)	PCBs (Clophen A50)	Activité de la BaPH	100-120 %	DEN BESTEN <i>et al.</i> , 1991
Phase II				
Espèce	Polluant	Réponse mesurée	Taux d'induction	Référence
<i>Gammarus pulex</i>	Lindane (pesticide organochloré) et perméthrine	Induction des GSTs	30-70 %	MCLOUGHLIN <i>et al.</i> , 2000
<i>Daphnia magna</i>	Phénols polychlorés	Induction des GSTs	100-130 %	LEBLANC <i>et al.</i> , 1988
<i>Procambarus clarkii</i> (crustacé décapode)	Fenitrothion (insecticide organophosphoré)	Induction des GSTs	~ 40%	BIRMELIN <i>et al.</i> , 1998
<i>Carcinus maenas</i> (crustacé décapode)	Cyperméthrine (insecticide pyréthroïde)	Induction des GSTs	40%	GOWLAND <i>et al.</i> , 2002

<i>Ruditapes decussatus</i> (mollusque bivalve)	4,4'-DDE et methoxychlor (pesticides organochlorés)	Induction des GSTs	40-50 %	HOARAU <i>et al.</i> , 2004
<i>Sphaerium corneum</i> (Mollusque bivalve)	Dieldrine, lindane et PCB n°118	Induction des GSTs	~ 10-15 %	BORYSLAWSKYJ <i>et al.</i> , 1988 ; MICHEL <i>et al.</i> , 1993

**Tableau 1 :** Synthèse des différents travaux portant sur l'induction des enzymes de la phase I et II chez les invertébrés aquatiques.

AFOLAYAN, 2005). Ces enzymes catalysent la conjugaison d'un tripeptide endogène polaire, le glutathion (constitué d'un acide glutamique, d'une cystéine et d'une glycine), avec un grand nombre de composés comportant un centre électrophile (CALLAGHAN *et al.*, 2002).

D'un point de vue structurel, ces enzymes se présentent comme étant des protéines dimériques dont la taille varie d'une quarantaine à une cinquantaine de kDa, dont les sous-unités, identiques ou non, ont généralement un poids moléculaire proche de 25 kDa (DIERICKX, 1987 ; LEBLANC & COCHRANE, 1987 ; AJELE & AFOLAYAN, 1992). ACETO *et al.* (1991) ont mis en évidence le fait qu'il existe au moins 2 GSTs chez le gammare *Gammarus italicus*. L'une d'entre, homodimérique, est constituée de 2 sous-unités d'un poids moléculaire de 28 kDa et appartiendrait à la classe  $\pi$  (voir plus bas), tandis que l'autre est un hétérodimère constitué d'une sous-unité de 27 kDa et d'une autre de 28 kDa.

En outre, les GSTs peuvent être classées en différentes classes fonctionnelles ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ,  $\mu$ ,  $\pi$ ,  $\sigma$ ,  $\theta$ ,  $\zeta$ ) d'après leurs spécificités de substrat, leurs affinités immunologiques et leurs séquences en acides aminés. Ces classes varient dans leur rôle de protection de la cellule contre des composés toxiques endogènes ou non (YANG *et al.*, 2003).

En effet, la fonction primaire de ces enzymes est généralement considérée comme étant la détoxification d'agent alkylants d'origine à la fois exogène et endogène, tels des aldéhydes ou cétones  $\alpha$ - ou  $\beta$ -insaturés ou des sels d'alkyles ou d'aryles (YANG *et al.*, 2003). D'autres fonctions de ces enzymes sont la séquestration et le transport de composés hydrophobes endogènes comme les stéroïdes ou la bilirubine (SALINAS & WONG, 1999).

De plus, les glutathion-S-transférases catalysent également la conjugaison du glutathion réduit avec certaines classes de xénobiotiques, tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les insecticides organophosphorés ou les organochlorés (CALLAGHAN *et al.*, 2002). Cette conjugaison diminue la réactivité du toxique et rend la molécule plus hydrosoluble. Le produit conjugué peut ensuite être excrété directement, ou subir d'autres réactions de métabolisation pour être transformé en acide mercapturique (HABIG *et al.*, 1974).

C'est cette capacité à métaboliser les xénobiotiques qui va faire des GSTs des biomarqueurs potentiels. En effet, l'induction de l'activité des GSTs suite à l'exposition à divers micropolluants a été mise en évidence chez diverses espèces dans divers embranchements de vertébrés mais aussi d'invertébrés (LEBLANC & COCHRANE, 1985 ; VAN DER OOST *et al.*, 1996).

La majorité des études utilisant l'induction des GSTs comme biomarqueur chez des invertébrés aquatiques sont présentées au tableau 1.

Toutefois, cette induction est souvent faible, et les résultats contradictoires ou négatifs n'étant pas rares. Ainsi, LOOISE *et al.* (1996) n'ont pu mettre en évidence aucune augmentation significative de l'activité des GSTs suite au traitement du bivalve *Sphaerium corneum* à la dieldrine, au lindane, au benzo[a]pyrène (HAP) ou au PCB n°118, alors que d'autres auteurs rapportent une induction chez cette même espèce suite à l'exposition à la dieldrine, au lindane ou au PCB n°118 (BORYSLAWSKYJ *et al.*, 1988 ; MICHEL *et al.*, 1993).

De même, aucune induction n'a pu être mise en évidence chez la larve du diptère *Chironomus riparius*, que ce soit suite à une exposition à des insecticides organophosphorés

tels le pirimiphos methyl (CRANE *et al.*, 2002 ; CALLAGHAN *et al.*, 2002) ou à des organochlorés comme le lindane (HIRTHE *et al.*, 2001).

En ce qui concerne la localisation de ces enzymes, elle varie selon l'embranchement considéré. Ainsi, si le site d'activité maximale est le foie dans le cas des vertébrés (VAN DER OOST *et al.*, 1996), la situation chez les invertébrés aquatiques est moins claire.

En effet, chez les mollusques, le site d'activité maximale semble être le rein dans le cas des gastéropodes terrestres (BALABASKARAN *et al.*, 1986), la glande digestive dans le cas des gastéropodes aquatiques comme *Lymnaea stagnalis* (WILBRINK *et al.*, 1991) et la branchie chez les bivalves (DARBY *et al.*, 1993 ; HOARAU *et al.*, 2004)

Chez les crustacés, et bien que peu d'études aient été réalisées, il a été récemment montré chez la crevette *Macrobrachium vollehovenii* que le site d'activité maximale des GSTs était, comme dans le cas des monooxygénases à cytochrome P450, l'hépatopancréas (ADEWALE & AFOLAYAN, 2005).

## **4. Le gammare**

### 4.1 : Position systématique et répartition géographique

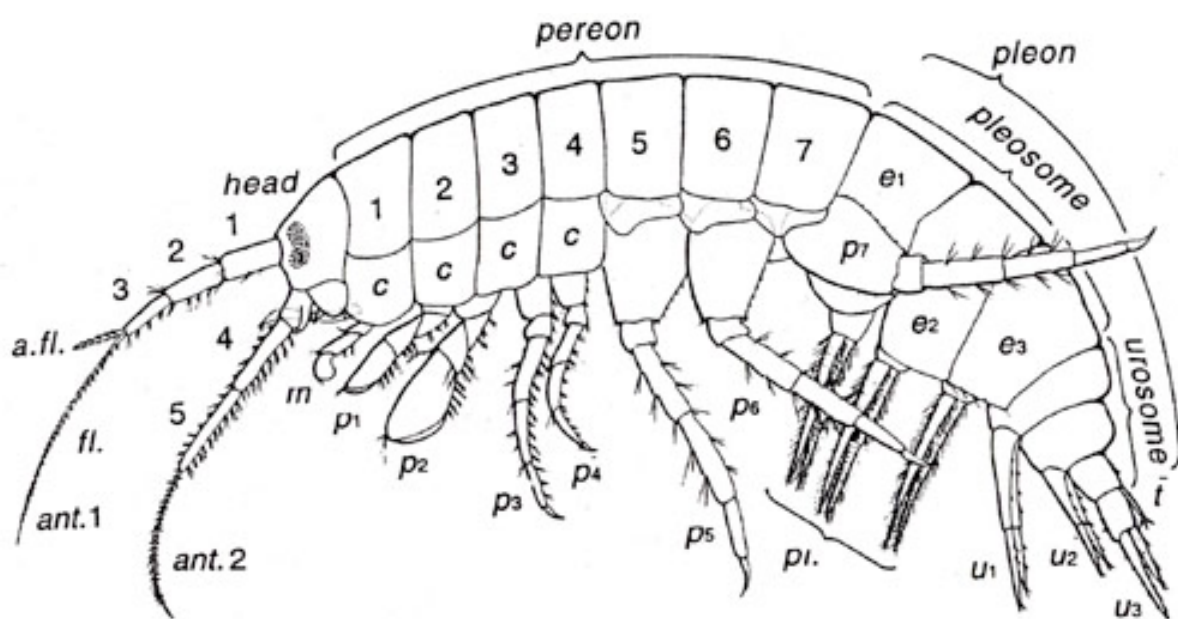
Les gammares sont des Crustacés Malacostracés Péricarides appartenant à l'ordre des Amphipodes. A ce titre, ils sont caractérisés par un aplatissement latéral du corps, une fusion du premier segment thoracique avec la tête, l'absence de carapace calcifiée ainsi qu'un cycle reproductif direct (BARNES, 1974 ; MEGLITSCH & SCHRAM, 1991).

L'ordre des Amphipodes comporte plusieurs sous-ordres, mais un seul d'entre eux, celui des Gammaridea, présente des espèces continentales, c'est-à-dire dulcaquicoles ou terrestres (HOFFMAN, 1963 ; BARNES, 1974).

Au sein du sous-ordre sus-cité, la famille des Gammaridae compte une quinzaine de genres en Europe. Parmi ceux-ci, les plus importants en termes de nombre d'espèces sont les genres *Echinogammarus* et *Gammarus*. Ce dernier compte aussi bien des espèces marines que dulcaquicoles, toutes benthiques, représentées des régions arctiques et antarctiques aux zones tropicales (HOFFMAN, 1963 ; ROUX, 1970a).

*Gammarus pulex* (L.) 1758 est l'une d'entre elles. Espèce dulcaquicole, elle est présente dans de nombreux cours d'eaux du centre, du Nord et de l'Ouest de l'Europe, ainsi que dans le Nord de l'Afrique et en Asie (HOFFMAN, 1963 ; KUTLU & SUSUZ, 2004).

Il est important de signaler que, sur le plan phylogénétique, *Gammarus pulex* est très proche de certaines autres espèces du genre *Gammarus*, notamment *Gammarus fossarum*, *Gammarus wautieri*, *Gammarus roeseli* et *Gammarus lacustris*. Des formes intermédiaires entre ces différentes espèces ont en outre été signalées, et certains auteurs regroupent ces espèces (ainsi que plusieurs autres) au sein d'un "groupe" *Gammarus pulex*, qui pourrait avoir valeur de complexe d'espèces (ROUX, 1971 ; KARAMAN & PINKSTER, 1977). Les distinctions entre espèces au sein de ce "groupe" *Gammarus pulex* étant ténues, des travaux



**Figure 3** : Morphologie générale de *Gammarus pulex* (d'après GLEDHILL *et al.*, 1993). *Ant.* : antennes, *a.fl.* : flagelle accessoire, *c.* : plaque coxale, *f.* : flagelle, *m.* : maxillipède, *p<sub>1</sub> – p<sub>7</sub>* : péréiopodes (ou pattes thoraciques) 1 à 7 (les péréiopodes 1 et 2 sont respectivement les premier et second gnathopodes), *e<sub>1</sub> – e<sub>3</sub>* : épimères, *pl.* : pléopodes, *u<sub>1</sub> – u<sub>3</sub>* : uropodes, *t.* : telson.

visant à différencier ces espèces à l'aide d'outils moléculaires, comme la comparaison des séquences de DNA mitochondrial, sont actuellement mis en place (MEYRAN *et al.*, 1997).

## 4.2 : Ecologie et morphologie

*Gammarus pulex* est une espèce benthique qui affectionne particulièrement les cours d'eau bien oxygénés à courant relativement calme, mais on peut également le trouver dans des eaux plus stagnantes, comme les endroits où les cours d'eaux pénètrent dans des lacs ou des mares (ROUX, 1971).

En outre, les cours d'eaux où *G. pulex* montre des densités de population élevées présentent généralement des températures moyennes, de l'ordre de 15°C. ROUX (1971) a montré que la température optimale est située entre 12 et 18°C (selon la température d'acclimatation des animaux utilisés), alors que la température létale est de l'ordre de 26,5 à 27°C.

De plus, *G. pulex* montre un phototropisme négatif assez marqué, les animaux vivant d'ailleurs généralement sous les pierres ou parmi les débris végétaux (HOFFMAN, 1963).

Le régime alimentaire de *G. pulex* est de type détritiphage. Il se nourrit de matière organique particulière grossière, principalement de débris de feuilles colonisés par des bactéries et des champignons ainsi que des micro-organismes colonisant ces débris, mais absorbe également une certaine quantité de débris d'origine animale (GRAÇA *et al.*, 1994b).

La taille moyenne de individus est de 8 à 10 mm pour les femelles et de 12 à 18 mm pour les mâles, certains mâles âgés atteignant exceptionnellement 23 à 25 mm. (HOFFMAN, 1963).

La morphologie générale de *G. pulex* est présentée à la figure 3. On notera le fait que la branche interne de l'uropode III mesure plus de la moitié de la longueur de la branche externe, ce qui, malgré une variabilité intraspécifique relativement importante, constitue un critère systématique majeur pour différencier *G. pulex* d'autres espèces du même genre (notamment *Gammarus fossarum*, autre espèce parfois abondamment présente dans nos cours d'eaux). (HOFFMAN, 1963 ; ROUX, 1970a ; PINKSTER & PLATVOET, 1986).

## 4.3 : Reproduction et développement

La reproduction, chez *G. pulex* comme chez la majorité des amphipodes benthiques, est précédée d'une période où les individus vont vivre en paires précopulatoires. Cette période, qui dure généralement de 7 à 10 jours, a pour but d'assurer que la fécondation a lieu dès que la femelle mue et est prête à émettre ses œufs dans la chambre incubatrice (également appelée marsupium, voir plus bas). En effet, l'émission d'œufs dans la chambre incubatrice n'est possible que durant la période de post-mue, lorsque les téguments de la femelle sont suffisamment souples (PASCOE *et al.*, 1994 ; BOLLACHE & CEZILLY, 2004).

Durant cette période, le mâle se fixe au dos de la femelle à l'aide des dactyles du premier gnathopode. Le mâle emporte ainsi la femelle, normalement inactive, dans ses déplacements, et ne la relâche qu'après l'accouplement proprement dit (HOFFMAN, 1963 ; PINKSTER &

PLATVOET, 1986). Lors de celui-ci, relativement court, le mâle place son uropode au niveau du marsupium de la femelle, chambre incubatrice formée par les 4 paires d'oostégites dépendant des plaques coxales II à V. (MEGLITSH & SCHRAM, 1991). La femelle émet alors ses œufs au niveau de la chambre incubatrice où se réalise la fécondation (BARNES, 1974).

Les œufs se développent également dans la chambre incubatrice, où ils éclosent pour donner des juvéniles identiques aux adultes, à l'exception des gonades. Le développement est donc bien de type direct, marqué par l'absence des stades larvaires habituels des crustacés. Les juvéniles ne sont relâchés qu'au moment de la mue suivante de la femelle. Ils vont alors grandir par mues successives, et acquérir des gonades fonctionnelles (BARNES, 1974). L'âge adulte est atteint en 3 à 4 semaines (HOFFMAN, 1963 ; BOLLACHE & CEZILLY, 2004).

La reproduction a lieu toute l'année, à l'exception des cours d'eaux montrant des écarts thermiques saisonniers importants, où on observe une période de repos sexuel à l'automne, les accouplements reprenant au début de l'hiver (ROUX, 1970b).

#### 4.4 : Intérêt du gammare comme espèce sentinelle

Les avantages de l'utilisation des macroinvertébrés benthiques dans les méthodes d'évaluation de la qualité de l'eau sont nombreux. Parmi ceux-ci, citons leur abondance et la facilité de leur collecte, leurs durées de vie (mois-années), suffisamment longues pour intégrer les changements de qualité de leur environnement, leur relative sédentarité et leur réponse rapide aux différents types de stress (MARNEFFE, 2003).

Parmi les nombreuses espèces de macroinvertébrés, le choix de l'espèce *Gammarus pulex* comme espèce sentinelle nous semble intéressant pour plusieurs raisons.

D'abord, *Gammarus pulex* est l'espèce de Gammaridae la plus répandue en Europe, Asie et même dans le Nord de l'Afrique. De plus, elle peut devenir très abondante, allant jusqu'à devenir l'espèce principalement consommée par la truite dans certains cas (MC NEIL *et al.*, 2000). De cette façon, les toxiques accumulés par le gammare peuvent être transmis aux prédateurs, qu'ils s'agissent de la truite ou d'autres poissons benthophages.

De plus, il a été montré que *Gammarus pulex* fait partie des espèces de macroinvertébrés les plus sensibles envers une grande variété de polluants (MC CAHON & PASCOE, 1988a). Les techniques pour l'élever en laboratoire sont en outre connues et relativement simples (MC CAHON & PASCOE, 1988b).

Signalons aussi que le gammare présente, par rapport à d'autres espèces de macroinvertébrés benthiques, comme par exemple la larve du diptère *Chironomus riparius*, l'avantage de présenter un cycle de vie entièrement aquatique, totalement dépourvu de phase aérienne. Les niveaux de contamination par des toxiques et les réponses engendrées par ceux-ci enregistrés chez les gammares seront donc uniquement le reflet du degré de pollution de la rivière échantillonnée.

Enfin, les travaux utilisant le gammare comme espèce sentinelle sont assez nombreux, comme le montre le point 5.

## **5. Etudes préalables concernant le gammare**

Cette partie a pour objet de présenter les différentes études déjà réalisées en utilisant *Gammarus pulex* (ou une autre espèce proche du point de vue systématique) comme espèce sentinelle, et ce quel que soit le type de réponse utilisé comme biomarqueur. Il va de soi qu'elle ne constitue en aucun cas une liste exhaustive.

### 5.1 : Réponses comportementales

Parmi les réponses comportementales utilisées comme biomarqueurs chez *G. pulex*, la plus répandue est sans doute la séparation des paires précopulatoires (*Gammarus pulex* precopula separation, ou GaPPS). Ainsi, PASCOE *et al.* (1994) ont remarqué que sous l'influence de divers polluants, les gammares ont tendance à former des paires précopulatoires, mais à se séparer avant l'accouplement. Ils ont ensuite testé et validé ce biomarqueur pour divers polluants, dont le cuivre, le lindane et l'atrazine (pesticides organochlorés) ou la 3,4-dichloroaniline (dérivé benzénique utilisé lors de la synthèse de certains pesticides). Plus récemment, ce biomarqueur a été utilisé avec succès pour détecter les effets de l'esfenvalérate (insecticide pyréthroïde). En effet, il a été montré que les gammares traités à l'esfenvalérate montrent des comportements de séparation prématurée des paires précopulatoires, mais aussi que le temps nécessaire pour reformer ces paires augmente avec la concentration en insecticide (COLD & FORBES, 2004).

En outre, TAYLOR *et al.* (1994) ont observé des comportements de dérive (causés par la diminution d'activité locomotrice) accrus chez des gammares contaminés au cuivre. La diminution de l'activité locomotrice a également été observée suite à l'exposition à certains insecticides (parathion-ethyl et fenvalérate) (SCHULZ & LIESS, 1999).

### 5.2 : Réponses au niveau reproductif

Une diminution du nombre de jeunes produits par les femelles *G. pulex* suite à l'exposition à des toxiques a été montrée pour divers polluants environnementaux. Parmi ceux-ci, on retrouve le cuivre, le lindane, la 3,4-dichloroaniline et l'atrazine (PASCOE *et al.*, 2000) ou encore l'esfenvalérate (COLD & FORBES, 2004). Toutefois, dans les deux cas, les auteurs avancent l'hypothèse d'un lien probable entre la séparation des paires précopulatoires et la diminution de fécondité.

De plus, il a récemment été établi que des individus de l'espèce marine *Gammarus locusta* ayant été exposés à des sédiments naturels contaminés par divers toxiques (notamment des métaux lourds, des HAP et des PCBs) montrent un déplacement du sex-ratio en faveur des femelles, ainsi qu'une diminution de la production de jeunes (COSTA *et al.*, 2005).

### 5.3 : Réponses au niveau de la croissance et de la prise de nourriture

L'activité d'alimentation et le taux de croissance peuvent tous deux être utilisés comme biomarqueurs au niveau individuel. Ainsi, BLOCKWELL *et al.* (1996a) ont montré que des individus de l'espèce *G. pulex* exposés au lindane montraient une diminution significative de

croissance. Ceci a également été mis en évidence dans le cas d'une exposition au cuivre, à l'atrazine ou à la 3,4-dichloroaniline (PASCOE *et al.*, 2000).

Le "scope for growth" (SfG) est une mesure du budget énergétique de l'animal, c'est-à-dire de la différence entre l'énergie absorbée et l'énergie métabolisée. Il est fréquemment utilisé comme indicateur de pollution dans les milieux marins, mais son application est plus rare en milieu dulçaquicole (RINDERHAGEN *et al.*, 2000). Ce biomarqueur a toutefois été utilisé avec succès chez *Gammarus pulex*, et une diminution du SfG a notamment été enregistrée suite à l'exposition au zinc (NAYLOR *et al.*, 1989 ; MALTBY *et al.*, 1990 ; MALTBY *et al.*, 1995).

#### 5.4 : Réponses morphologiques

Souvent utilisées chez les vertébrés (STOUVENAKERS *et al.*, 1996 ; HUGLA *et al.*, 1999), les altérations ultrastructurales des organes de détoxification sont reconnues comme étant un indicateur relativement sensible de l'exposition à un polluant. Ainsi, BLOCKWELL *et al.* (1996b) ont observé, à l'aide d'un microscope électronique à balayage, des dégradations de la structure des muscles périphériques des caeca hépatopancréatiques de *G. pulex* consécutifs à une exposition au lindane, au cuivre, ou à la 3,4-dichloroaniline.

#### 5.5 : Réponses au niveau de la bioaccumulation

Le gammaré s'est révélé être un organisme intéressant dans le cadre d'études portant sur l'accumulation de toxiques à l'intérieur de l'organisme. Ainsi, MULLISS *et al.* (1996) ont montré qu'exposé à des métaux lourds (zinc, plomb, cuivre et cadmium), *Gammarus pulex* accumule ces composés de manière plus importante que d'autres espèces comme *Asellus aquaticus*. De plus, NEUPARTH *et al.* (2005) rapportent une bioaccumulation marquée du cuivre, du cadmium et du zinc dans le cas de l'espèce marine *Gammarus locusta*.

#### 5.6 : Réponses physiologiques et biochimiques

##### 1) Induction des glutathion-S-transferases

Des inductions de l'activité des GSTs ont été mesurées chez *G. pulex* suite à l'exposition à la perméthrine (insecticide pyréthroïde) et au lindane. Par contre, aucune induction significative n'a pu être mesurée chez des individus traités au zinc, au pirimiphos méthyl (insecticide organophosphoré) ou au LAS (détergent) (MCLOUGHLIN *et al.*, 2000 ; YIN *et al.*, 2001).

##### 2) Inhibition de l'acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est une enzyme dont le rôle est de dégrader l'acétylcholine, un neurotransmetteur, après qu'elle se soit liée à son récepteur et ait ainsi permis le transfert de l'influx nerveux. Il a été montré chez de nombreuses espèces que l'activité de cette enzyme est inhibée par les insecticides de type organophosphorés ou carbamates (WALKER *et al.*, 2001 ; HYNE & MAYER, 2003).

Chez *Gammarus pulex*, l'inhibition de l'acétylcholinestérase a été utilisée avec succès comme biomarqueur avec certains polluants organophosphorés, comme le pirimiphos methyl, le fenitrothion, le parathion-méthyl, le malathion ou le malaoxon (KUHN & STREIT, 1994 ; CRANE *et al.*, 1995 ; MCLOUGHLIN *et al.*, 2001 ; HEINEN, 2003).

### **3) Induction des heat-shock proteins (HSP)**

On regroupe sous le terme de "Heat-shock proteins" quatre classes de protéines (les HSP 90, 70, 60 et LMW) pouvant être induites par un grand nombre de facteurs protéotoxiques, comme la température ou certains polluants (notamment les métaux lourds et leurs sels, les HAP, les PCBs et certains détergents). Le rôle des HSP est d'empêcher la dénaturation des protéines, ainsi que de faciliter la dégradation des protéines anormales (BIERKENS, 2000).

Chez *Gammarus pulex*, une induction significative des HSP de la classe HSP 70 a été mesurée chez des individus exposés à des métaux lourds (cadmium) mais aussi à des rejets d'égouts et des mélanges complexes de polluants contenant notamment des pesticides, des PAH, et des PCBs (SCHILL *et al.*, 2000 ; TRIEBSKORN *et al.*, 2002 ; SCHILL *et al.*, 2003).

### **4) Induction des métallothionéines**

Les métallothionéines sont des protéines capables de se lier, avec une affinité élevée, aux métaux lourds, ce qui a pour effet de les séquestrer et d'empêcher ainsi leur toxicité (HYNE & MAHER, 2003).

L'induction des métallothionéines a été démontrée chez l'espèce marine *Gammarus locusta* après une exposition au cuivre ainsi qu'à des sédiments contaminés par différents métaux lourds (cuivre, cadmium et zinc) (CORREIA *et al.*, 2002a ; CORREIA *et al.*, 2002b ; NEUPARTH *et al.*, 2005).

De même, GAGNÉ *et al.* (2005) ont mesuré des taux de métallothionéines plus élevés chez des individus d'espèces marines du genre *Gammarus* exposés à des effluents complexes (provenant de ports, de marinas ou de ferrys) que chez les individus provenant de sites de référence non pollués.

### **5) Autres réponses**

A côté des biomarqueurs cités précédemment, un certain nombre de réponses moins répandues ont également été testées chez le gammare.

Ainsi, GAGNÉ *et al.* (2005) ont remarqué chez des espèces marines du genre *Gammarus* exposés à des effluents complexes une altération de la composition de l'exosquelette. Celui-ci est normalement constitué d'une fraction importante (jusqu'à 80 %) de chitine (polysaccharide), et d'une fraction protéique (10 à 15 %). Chez les gammares provenant de sites contaminés, on observe une diminution de la proportion de chitine (qui chute parfois jusqu'à moins de 60 %) contenue dans les exosquelettes au profit de la fraction protéique. De plus, ces gammares montrent également une induction de l'activité de certaines enzymes lipogéniques comme la glucose-6-déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et la malate.

Dans un autre registre, l'exposition d'individus de l'espèce *Gammarus locusta* au cuivre ou à sédiments naturellement contaminés (métaux lourds, PAH, organochlorés) semble provoquer une augmentation du taux de peroxydation des lipides, probablement due au stress oxydatif induit par ces polluants (CORREIA *et al.*, 2002a ; CORREIA *et al.*, 2002b ; NEUPARTH *et al.*, 2005).

Enfin, TAYLOR *et al.* (1998) ont montré que certains polluants comme le cuivre et le lindane inhibent la biosynthèse de l'hème chez *Gammarus pulex*, ce qui pourrait avoir une conséquence néfaste sur certaines hémoprotéines impliquées dans le métabolisme de l'animal, comme les P450.

## IV. Matériel & Méthodes

## **1. Mise en place d'un élevage de gammares**

L'intérêt de la mise en place d'un élevage au laboratoire est de pouvoir disposer rapidement et facilement de gammares maintenus dans des conditions standardisées de température, de pH et de luminosité.

Le protocole utilisé ici est une modification de celui mis au point par MC CAHON & PASCOE (1988b). Le Blanc Gravier à Colonster a été choisi comme site de référence, en raison des faibles niveaux de pollution qu'il présente. En effet, le Blanc Gravier est un ruisseau qui descend directement du Sart Tilman vers la vallée de l'Ourthe sous couvert forestier, et il est très peu exposé aux pollutions industrielles ou agricoles (HEINEN, 2003).

3 aquariums de 20 litres et un aquarium de 60 litres ont donc été remplis d'eau en provenance du Blanc Gravier, le fond ayant au préalable été recouvert d'une épaisse couche (environ 10 cm) de sédiment, d'une couche uniforme (1-3 cm) de feuilles ainsi que de quelques pierres plates, le tout provenant également du Blanc Gravier. Après avoir branché un système d'oxygénation adéquat, une période de stabilisation de 48 heures a été ménagée, au terme de laquelle les gammares, prélevés dans le Blanc Gravier à l'aide de haveneaux et de tamis, ont été ajoutés.

L'eau des aquariums a été remplacée par de l'eau en provenance du Blanc Gravier toutes les semaines. De plus, des feuilles mortes, également prélevées dans le Blanc Gravier, ont été ajoutées régulièrement. Durant toute la durée de l'élevage, la température était toujours comprise entre 16 et 20°C et le pH entre 7,5 et 8,2. La photopériode, quant à elle, suivait des cycles d'alternance de 16 heures de jour et 8 heures de nuit.

## **2. Choix des sites de prélèvement**

Les sites choisis sont la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont, l'Ourthe à Angleur et la Meuse à Wanze. Ces sites ont été choisis pour les degrés de contamination par les PCBs élevés que montrent les poissons (chevaines et anguilles) qui y ont été prélevés (THOMÉ *et al.*, 2005). De plus, les niveaux d'activité EROD des chevaines et/ou des goujons pêchés à ces sites sont également élevés (CARABIN, 2003 ; LEROY, 2004).

En outre, d'autres points réputés pour leur contamination par les PCBs ont également été visités. Il s'agit de la Vesdre à Chaudfontaine et à Chênée et de la Meuse à Lixhe. Toutefois, les densités de population de gammares au niveau de ces points étant faibles à nulles, aucun prélèvement n'y a été effectué. Les sites retenus sont présentés à la figure 4.

Aux points retenus, une cinquantaine de gammares ont été prélevés à l'aide de haveneaux et de tamis. Ils ont ensuite été déterminés (voir point IV.3) et congelés à -80°C.



**Figure 4 :** Carte partielle de la Région Wallonne, montrant les points de prélèvement envisagés dans le cadre de ce mémoire (d'après THOMÉ *et al.*, 2005, modifié). **1 :** Blanc Gravier à Colonster (point de référence), **2 :** Ourthe à Angleur, **3 :** Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont, **4 :** Mehaigne à Wanze.

### **3. Détermination des gammares**

La détermination des gammares a été effectuée au moyen de la publication de ROUX (1970b) ainsi que des clés de HOFFMANN (1963), PINKSTER & PLATVOET (1986) et GLEDHILL *et al.* (1993).

Dans le cas des gammares provenant de l'élevage, 10 échantillons de 10 individus ont été prélevés et déterminés afin de déterminer le rapport entre les espèces *Gammarus pulex* et *Gammarus fossarum*. Les résultats de ces déterminations seront présentés au point V. En outre, un échantillon de gammare provenant de l'élevage a été confié au systématicien M. DETHIER afin de vérifier l'exactitude de nos déte-minations.

Dans le cas des gammares provenant de l'environnement, chaque individu a été déterminé et seuls les individus appartenant à l'espèce *G. pulex* ont été sélectionnés.

### **4. Contaminations de gammares *in vitro***

#### 4.1 : Protocole de contamination

Les contaminations ont été réalisées en utilisant des boites de Petri comme dispositif d'élevage. Deux types de boites ont été testées : des boites en verre de marque Schott d'un diamètre de 100 mm pour une hauteur de 20 mm, ainsi que des boites en polystyrène de marque Nunc, modèle Nunclon  $\Delta$  100 x 20 (diamètre 92 mm, hauteur 21 mm).

Dans les deux cas, chaque boîte est remplie de 40 ml d'eau de Volvic contenant ou non des PCBs en solution. En outre, un filtre circulaire Whatman n°1 (diamètre 8,5 cm) tapisse le fond de chaque boîte. La fonction de ce filtre est double : d'une part, il offre un abri aux gammares, organismes lucifuges de nature, et d'autre part, il permet le développement d'un film bactérien pouvant servir de nourriture aux gammares.

Après une période de stabilisation de 24 heures, 10 gammares sont placés dans chaque boîte, où ils sont maintenus durant 144 heures à une température de 15°C, la luminosité suivant un cycle de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. L'eau (ou la solution aqueuse de PCBs) est renouvelée toutes les 24 heures.

#### 4.2 : Choix des toxiques

Parmi la grande variété de congénères seuls et de mélanges commerciaux de PCBs disponibles, nous en avons choisi 3.

D'abord, les congénères n°77 (3,3',4,4'-tétrachlorobiphényle) et n°169 (3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle) ont été choisis pour leurs capacités reconnues d'inducteurs enzymatiques et leurs propriétés "dioxin-like".

Ensuite, les congénères n° 28 (2,4,4'-trichlorobiphényle), n° 52 (2,2',5,5'-tétrachlorobiphényle), n° 101 (2,2',4,5,5'-pentachlorobiphényle), n° 118 (2,3',4,4',5-pentachlorobiphényle), n°138 (2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphényle), n°153 (2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphényle) et n°180 (2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorobiphényle), souvent regroupés sous l'appellation de congénères "traceurs", ont été choisis et utilisés en mélange car ce sont sur les concentrations de ces congénères que les normes alimentaires concernant les teneurs en PCBs maximales admissibles sont basées.

Ainsi, l'Arrêté Royal du 6/3/2002 stipule l'interdiction de commercialiser des poissons (en ce compris les coquillages et crustacés) dont la somme totale des teneurs en congénères traceurs excède 75 µg/kg de produit frais.

### 4.3 Concentrations et enrichissement des solutions aqueuses de PCBs

Dans le cas, en vigueur ici, de contamination des organismes via le milieu aqueux, nous sommes limités par la faible hydrosolubilité des PCBs.

Aussi, nous avons choisi des concentrations théoriques relativement basses en toxiques, à savoir 10 µg/L dans le cas du congénère 77, et 1 µg/L dans le cas du congénère 169 ou de chacun des 7 traceurs.

Toutefois, la vitesse de volatilisation des PCBs en solution aqueuse étant élevée, un protocole spécifique pour l'enrichissement des solutions aqueuses a été suivi.

Ainsi, dans un récipient *ad hoc*, on mélange la quantité d'eau adéquate avec une quantité de PCBs en solution dans l'acétone **deux fois supérieure** à la quantité nécessaire pour obtenir la concentration théorique voulue. De cette façon, la concentration des solutions est deux fois supérieure à la concentration théorique (20 µg/L dans le cas du congénère 77, 20 µg/L dans les autres cas)

Après le mélange, les solutions sont mises à reposer durant 24 heures à l'abri de la lumière et à la température de l'expérience (15°C). Durant cette période de stabilisation, il est attendu que la moitié des PCBs en solution dans l'eau passent en phase vapeur, et que la concentration de la solution après cette période soit proche de la concentration théorique souhaitée.

Toutefois, afin de vérifier ce postulat, des dosages de PCBs dans les solutions ayant reposé 24 heures ont été effectués. Les résultats de ces dosages seront présentés au point V.

## **5. Dosages de PCBs dans les tissus animaux**

Ces dosages ont été réalisés selon le mode opératoire MB/08/Poisson du LEAE, version 1.1 du 18/10/2000.

## 5.1 : Lyophilisation

10 à 15 gammares (0,1 - 0,3 g), préalablement décongelés, sont pesés et introduits dans un vial EPA dont le septum en téflon a été remplacé par un filtre GFC (Whatman 1,2 µm, Maidstone, Angleterre) afin d'éviter toute perte de matériel. Ces flacons sont ensuite plongés dans l'azote liquide durant 10 minutes, afin qu'ils atteignent une température de -50°C. Après cela, ils sont placés dans des fioles de lyophilisation VIRTIS et sont lyophilisés durant environ 16 heures, sous vide (pression inférieure à 50 millitorrs) et à une température proche de -50 °C. Après cette étape, le poids sec des échantillons est déterminé. En outre, un blanc est ajouté à la série d'échantillons durant cette étape. Pour ce faire, on introduit dans un vial de la graisse de type "blanc de bœuf" préalablement testée et certifiée exempte de PCBs.

## 5.2 : Extraction des lipides

L'extraction des lipides contenus dans l'échantillon lyophilisé se fait au moyen de l'extracteur ASE (Accelerated Solvent Extractor) DIONEX 200. Pour ce faire, on utilise des cellules ASE de 11 ml, préalablement munies d'un filtre.

Chaque cellule est tarée, puis remplie avec l'échantillon lyophilisé et broyé. On ajoute en outre 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhydre, dont le rôle est de capter l'humidité dans la cellule, ainsi qu'une quantité adéquate de surrogate de manière à obtenir dans l'extrait final une concentration de 50 pg/µl. Le surrogate permet de quantifier les éventuelles pertes qui se produiraient lors des différentes étapes de purification et d'extraction des PCBs. Le choix du surrogate est basé sur sa résistance aux différentes étapes d'extraction et de purification, son absence dans les échantillons à analyser et le fait qu'il n'interfère avec aucune autre molécule lors de l'injection. Dans le cas présent, le surrogate utilisé est le congénère n°143.

En outre, pour vérifier la bonne marche de l'extraction, des contrôles de qualité (QC) sont analysés parallèlement à chaque série d'échantillons. Ces QC sont composés de crème de lait enrichie par une concentration connue de PCBs. De plus, afin de vérifier que l'extraction n'induit aucune contamination des échantillons, un blanc est également introduit. Ainsi, en plus des échantillons, une cellule contenant 0,65 g de crème enrichie aux PCBs, 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et du surrogate 143 ainsi qu'une autre contenant uniquement 0,5 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et du surrogate 143 sont chargées sur l'extracteur.

L'extraction est ensuite lancée. Durant celle-ci, le temps de chauffage de chaque cellule est de 6 minutes, à une température de 125 °C et une pression de 1500 psi. La durée du cycle d'extraction est de 5 minutes, et le temps de purge à l'azote est de 100 secondes. Le solvant utilisé est l'hexane, et le volume de rinçage est équivalent à 60 % du volume total de la cellule. Enfin, le nombre de cycles est de 2.

Après l'extraction, les fractions lipidiques des échantillons, en solution hexanique, sont récoltées dans des tubes. Ces tubes sont ensuite transférés dans le Turbovap LV Zymarck. Dans cet appareil, l'hexane est éliminé par évaporation sous flux d'azote à une température de 50°C. La différence entre la tare du tube de récolte et le poids obtenu après évaporation permet de déterminer le poids de lipides.

Ensuite, on ajoute à chaque échantillon, ainsi qu'au blanc et au QC, une quantité adéquate d'un autre surrogate (le congénère n°112) pour que sa concentration dans l'extrait final soit de 50 pg/µl. Les contenus des tubes sont ensuite dissous dans 2 ml d'hexane et transférés dans des tubes à essai. Ils sont alors prêts pour les étapes de purification ("Clean-up" acide et florisil)

En outre, un dernier blanc, composé de 2 ml d'hexane et de PCB 112, est introduit à ce moment.

### 5.3 : Clean-up acide

Cette étape de purification est destinée à éliminer les matières organiques, dont les lipides, les lipoprotéines et les glucides, qui ont été extraits en même temps que les micropolluants.

2 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95 % sont ajoutés à l'extrait en solution hexanique obtenu au point IV.5.2. Le mélange est agité pendant 2 minutes à l'aide d'un agitateur mécanique (Vibramax 110 HEIDOLPH, Staufen, Germany) et ensuite centrifugé durant 3 minutes, à une vitesse de 1500 g et à une température de 10 °C, à l'aide de la centrifugeuse réfrigérée Jouan-Vel (St-Herblain, France). La phase organique (surnageant) est délicatement prélevée. 3 ml d'hexane sont à nouveau ajoutés à l'acide sulfurique décanté et les étapes d'agitation, de centrifugation et de récupération du surnageant sont répétées. Les surnageants sont ensuite rassemblés et concentrés sous flux d'azote à un volume de 1 ml environ.

### 5.4 : Clean-up Florisil

Cette étape de purification est destinée à éliminer la plupart des molécules polaires susceptibles d'être présentes dans l'extrait et qui pourraient interférer avec les molécules organochlorées lors de l'analyse en chromatographie gazeuse à haute résolution.

Le florisil est en fait du silicate de magnésium, substance dont la nature va permettre de retenir les molécules polaires présentes dans l'extrait. Celui-ci est placé dans une microcolonne de chromatographie. Les microcolonnes contenant 1 g de Florisil (Supelco Superclean<sup>TM</sup> Envi Florisil SPE Tubes 6 ml, Bellefonte, USA) sont placées sur le dispositif d'élution Supelco. Les microcolonnes sont conditionnées à l'aide de solvants de moins en moins polaires en plaçant successivement en tête de colonne 5 ml d'acétone, 5 ml de mélange hexane/acétone 1:1 (V/V) et 12 ml d'hexane. Les solvants ayant servi au conditionnement sont éliminés.

Après conditionnement, l'échantillon est déposé en tête de colonne. L'élution de l'extrait se réalise avec deux fois 3 ml d'un mélange d'hexane/diéthyléther 1/1. Les 3 premiers ml sont en outre utilisés pour rincer le tube à essai ayant contenu l'extrait. Lors du conditionnement et jusqu'à la fin de l'élution de l'échantillon, les colonnes ne doivent jamais aller à sec. Sous flux d'azote, à l'aide du dispositif d'évaporation, on évapore ensuite l'éluat juste à sec.

## 5.5 : Conditionnement de l'extrait à injecter en GC/ECD

Dès la disparition de la dernière goutte de solvant au point 5.3, 125 µl d'hexane et 125 µl d'une solution hexanique de Mirex (d'une concentration de 100 pg/µl) de sont ajoutés successivement. Le Mirex, utilisé comme standard interne, est un pesticide organochloré qui présente l'avantage de ne pas interférer avec d'autres molécules lors de l'analyse par GC/ECD. Il permet de vérifier la qualité de l'injection et de l'analyse chromatographique de l'échantillon. Le volume ajouté est calculé de manière à obtenir une concentration de 50 pg/µl dans l'extrait final. 125 µl de cet extrait final sont ensuite transférés dans l'insert d'une fiole pour injection de 2ml, laquelle est scellée à l'aide d'une pince et chargée sur le chromatographe.

## 5.6 : Analyse de l'échantillon

Les extraits purifiés sont analysés par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution à l'aide d'un chromatographe (Thermoquest, Trace 2000, Milan, Italie) équipé d'un détecteur à capture d'électrons au <sup>63</sup>Ni (ECD-<sup>63</sup>NI).

4 µl de chaque échantillon sont injectés en mode "*on column*". Les différents congénères de PCBs sont alors séparés en fonction de leur temps de rétention sur une colonne capillaire J-WDB-XLB de 30 mètres de long et de 0,25 mm de diamètre interne (épaisseur du film : 0,25 µm). L'évolution de la température se fait par paliers successifs : 2 minutes à 60°C, passage de 60 à 140°C à un taux de 20°C/min, 3 minutes à 140°C, réchauffement graduel de 140°C à 270°C au rythme de 2,5°C/min, palier final de 12 minutes à 270°C.

Le gaz utilisé est l'hydrogène, à un taux d'injection de 4 ml/min et une pression de 130 kPa, et le gaz de rinçage est un mélange argon/méthane (95:5) à un débit de 30 ml/min.

Dans le cas présent, 27 congénères sont recherchés, à savoir les congénères n° 28, 44, 52, 66, 95, 70, 87, 101, 105, 110, 77, 118, 126, 138, 149, 153, 156, 169, 170, 180, 183, 187, 194, 195, 206 et 209.

## 5.7 : Traitement des données

Les données sont analysées avec le logiciel Chrom-Card for Windows, v. 1.19. La surface des pics du chromatogramme est calculée par un intégrateur, et les différents pics sont identifiés grâce à leur temps de rétention.

Les concentrations des différents congénères sont calculées à partir des quantités de standard interne (Mirex) et de surrogate (congénère 112). Ces concentrations sont en fait calculées par le logiciel d'intégration, qui utilise à cet effet une calibration linéaire préalablement effectuée.

Cette calibration est basée sur la surface des pics détectés et établie sur base de cinq concentrations croissantes en mélanges de PCBs (5, 10, 25, 50 et 75 pg/µl) Le coefficient de corrélation de la droite doit être supérieur à 0,995.

Après que le logiciel ait converti les surfaces mesurées en concentrations dans l'extrait en pg/μl, ces concentrations peuvent être converties en ng/g de graisse ou de poids frais de l'échantillon. Pour ce faire, on utilise le facteur de multiplication,  $X_F$ , qui est égal au volume final de l'extrait (en ml) divisé par la quantité (en mg) de graisse ou de poids frais (selon que l'on veut exprimer la concentration par gramme de graisse ou de poids frais) utilisés pour obtenir cet extrait.

La concentration de PCBs dans l'échantillon en ng/g de poids frais ou en ng/g de lipides est donc obtenue en multipliant la concentration dans l'extrait (en pg/μl) par le facteur de multiplication  $X_F$  (en μl/mg).

## **6. Dosages des PCBs dans les solutions aqueuses**

Ces dosages ont été réalisés selon le mode opératoire MB/08/Liquide-Liquide du LEAE, version 1.1 du 22.04.2003.

### 6.1 : Extraction des PCBs co-planaires en solution aqueuse

Dans une fiole jaugée rodée, 5 ml d'hexane sont ajoutés à 40 ml de la solution aqueuse, ainsi qu'une quantité adéquate de surrogate de manière à obtenir dans l'extrait final une concentration de 50 pg/μl. Le surrogate utilisé ici, le PCB 143, est ajouté directement au matériel à analyser, avant l'extraction.

L'extraction est réalisée par agitation manuelle vigoureuse durant 2 minutes. La solution est ensuite stockée au réfrigérateur, à 4 °C.

Lorsque les deux phases sont bien séparées, l'extrait hexanique est prélevé au moyen d'une micropipette et déposé dans un tube à essai. A l'aide du dispositif d'évaporation Visidry Supelco (Bellefonte, USA), la solution hexanique est concentrée sous flux d'azote à un volume de 3 ml environ.

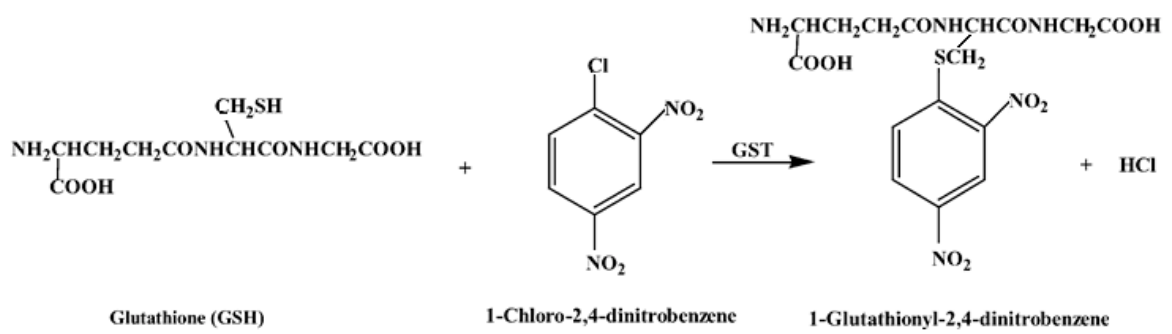
### 6.2 : Etapes suivantes

Les étapes de clean-up acide, de clean-up Florisil, de conditionnement de l'extrait, d'analyse de l'échantillon et de traitement des données sont identiques à celles décrites au point IV.5.

## **7. Dosage de l'activité des GSTs**

### 7.1 : Principe du dosage

Afin de mesurer l'activité des glutathion-S-transférases, on fournit aux enzymes, contenue dans les homogénats de gammarets, un substrat (le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène, ou CDNB)



**Figure 5** : Réaction entre le glutathion réduit et le CDNB, catalysée par les GSTs de la classe  $\mu$ . Le complexe formé montre un pic d'absorption dans l'UV à une longueur d'onde de 340 nm (d'après ADEWALE & AFOLAYAN, 2005).

ainsi que du glutathion réduit (GSH). Les enzymes vont alors coupler ces deux composés en un complexe, le S(2,4)-dinitrophénylglutathion (également appelé 1-glutathionyl-2,4-dinitrobenzène), qui absorbe à 340 nm (HABIG *et al.*, 1974 ; DANNAU *et al.*, 2001). Cette réaction est présentée à la figure 5.

La mesure de la variation d'absorbance à 340 nm au cours du temps permet, en déterminant la concentration en protéines des homogénats utilisés par une méthode adéquate, de déterminer l'activité de l'enzyme, en nanomoles par minute et par µg de protéines.

## 7.2 : Préparation des homogénats et mesure de l'activité enzymatique

Les gammars sont homogénéisés individuellement dans 150 µl tampon phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,05 M glacé. Les homogénats sont ensuite centrifugés, à 4°C, 10.000 g et durant 10 minutes, à l'aide d'une centrifugeuse Sepatech de modèle Biofuge 13 (Heraeus Sepatech, Osterode, Allemagne). Au terme de cette centrifugation, on récupère le surnageant qui va être utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique.

Dans une cuvette en plastique à usage unique de modèle Plastibrand PS 1,5 ml (Brand, Wertheim, Allemagne), on introduit 100 µl d'une solution 10 mM en GSH, 30 µl de surnageant, 845 µl de tampon phosphate et 25 µl d'une solution d'éthanol 40 mM en CDNB. Le contenu de la cuvette est homogénéisé par inversion, et la cuvette est introduite dans le spectrophotomètre Beckman DU 650 (Beckman, USA).

L'absorbance est ensuite mesurée à 340 nm durant une minute, à raison d'une mesure toutes les 0,1 secondes. On réalise 3 mesures indépendantes pour chaque échantillon. Le blanc de mesure est composé de 100 µl d'une solution 10 mM en GSH, 875 µl de tampon phosphate et 25 µl d'une solution d'éthanol 40 mM en CDNB. En outre, un nouveau blanc est préparé pour chaque échantillon.

Afin de déterminer les conditions optimales de dosage de l'activité des GSTs chez *G. pulex*, plusieurs essais ont été effectués. Ainsi, différentes solutions de tampon phosphate, respectivement de pH 6, 6,5, 7, 7,5 et 8 ont été testés. De même, plusieurs températures de réaction (25°C, 27°C et 30°C) ont été mises à l'épreuve. Enfin, des mesures ont été réalisées aussi bien sur des gammars entiers que sur des gammars décapités, afin d'évaluer l'importance de ce paramètre sur l'activité des GSTs. Les résultats de ces essais sont présentés au point V.

Le dosage de la concentration protéique des homogénats est réalisé en suivant la méthode de LOWRY *et al.* (1951), adaptée pour être mise en œuvre sur microplaques. Le lecteur intéressé trouvera le détail de ce protocole à l'annexe 1.

## 7.3 : Calcul de l'activité des GSTs

Après mesure de la variation d'absorbance et dosage de la concentration protéique, l'activité peut être calculée selon la formule suivante :

$$A = \frac{\Delta DO \cdot t \cdot V_t}{\varepsilon \cdot l \cdot V_s \cdot C_{\text{prot}}}$$

où :

- A représente l'activité (en nanomoles/min/μg protéines) ;
- Δ DO désigne la variation d'absorbance par minute, calculée en prenant la moyenne de 3 mesures indépendantes ;
- t représente le temps de mesure en minutes (1 dans le cas présent) ;
- V<sub>t</sub> représente le volume total introduit dans la cuvette en μl (ici, il est de 1000 μl) ;
- ε désigne le coefficient d'absorption molaire du complexe formé par le GSH et le CDNB à 340 nm, c'est-à-dire 10 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> ;
- l représente le trajet optique, c'est-à-dire la largeur de la cuvette en cm (à savoir 1 cm dans le cas qui nous occupe) ;
- V<sub>s</sub> représente le volume d'homogénat utilisé pour la mesure, en μl (dans le cas présent, il est de 30 μl) ;
- C<sub>prot</sub> désigne la concentration en protéines de l'homogénat en μg/μl, calculée sur base de la moyenne de 3 mesures indépendantes.

## **8. Dosage de l'activité EROD**

### 8.1 : Principe du dosage

L'éthoxyrésorufine est dééthylée en résorufine par une enzyme appartenant à la super-famille des monooxygénases à cytochrome P450. Cette activité monooxygénasique est assurée par une isoenzyme de la famille 1A1 du P450, l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD), et est inductible par de nombreux xénobiotiques comme les HAPs et les PCBs. La variation de la concentration en produit (résorufine) est déterminée par fluorimétrie. (BURKE & MAYER, 1974 ; PROUGH *et al.*, 1976).

Dans le cadre de ce mémoire, 2 protocoles ont été testés afin de tenter de mesurer l'activité EROD chez *G. pulex*. Le premier est inspiré de celui mis au point par FISHER *et al.* (2003) sur le diptère *Chironomus riparius*, et le second de celui KUTLU & SUSUZ (2004) sur *G. pulex*.

### 8.2 : Protocole basé sur celui de FISHER *et al.*, 2003

Les gammares sont homogénéisés individuellement dans 150 μl de tampon d'homogénéisation glacé. Le tampon d'homogénéisation est composé de tampon phosphate (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,13 M à pH 7,5, et contient également 1 mM d'EDTA (acide éthylène-diamine-tétra-acétique), 0,25 mM de PMSF (phénylméthylsulfonyl fluoride), 0,025 mM de DTT (dithiothérite) et 10 % de glycérol. Le rôle de l'EDTA est de complexer les métaux présents dans le milieu afin de les empêcher d'inhiber l'activité de l'enzyme. Le PMSF, quant à lui est un inhibiteur de protéases. Le DTT empêche l'oxydation des groupes sulfhydryles

libres, ce qui empêche la dénaturation de l'enzyme. Le glycérol a également pour but d'empêcher la dénaturation de l'enzyme.

Les homogénats sont ensuite centrifugés à 4°C et 10.000 g et durant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse Sepatech Biofuge 13. Le surnageant est ensuite récupéré et utilisé pour la mesure de l'activité enzymatique. FISHER *et al.* (1993) préconisent de diluer ce surnageant 3 fois avec du tampon phosphate 0,13 M à pH 7,8. Dans le cas présent, des essais ont été effectués en suivant leurs recommandations, mais aussi sans diluer le surnageant.

3 réplicats de 100 µl de surnageant (dilué ou non) sont alors chargés sur une microplaque à 96 puits en polystyrène (Black Microstrip 8, Labsystems, Vantaa, Finlande). Après une pré-incubation de 3 minutes à 30°C, 150 µl de mélange substrat sont ajoutés à chaque puits.

Le mélange substrat est composé de tampon phosphate 0,13 M à pH 7,8 contenant 7,45 mM de MgCl<sub>2</sub>, 6,8 µM d'éthoxyrésorufine (le substrat proprement dit) et 338 µM de NADPH (cofacteur nécessaire à l'activité des P450).

Après 1 minute d'incubation à 30°C, la variation de fluorescence est mesurée, à 30°C également, par le fluorimètre Fluoroskan Ascent FL type 374 de Labsystems (Vantaa, Finlande), piloté par le logiciel Ascent Software v. 2.6. La variation de fluorescence est mesurée sur un intervalle de 10 minutes, à raison d'une mesure toutes les 30 secondes. Le filtre d'émission est réglé sur 590 nm, et celui d'excitation sur 530 nm.

Après dosage des protéines par la méthode de LOWRY *et al.* (1951) (voir point IV.7.3), on peut calculer l'activité EROD en utilisant la formule suivante :

$$A = \frac{\Delta \text{Fluorescence} \cdot 4 \cdot X}{\alpha \cdot t \cdot C_{\text{Prot}}}$$

où :

- A est l'activité de l'enzyme (en picomoles par minute et par mg de protéines) ;
- Δ Fluorescence désigne la variation de fluorescence durant la période de mesure ;
- 4 est un facteur correctif, qui permet de ramener le volume final contenu dans chaque puits (250 µl) à 1 ml ;
- X est le facteur qui tient compte de la dilution des surnageants ;
- α est le coefficient angulaire de la droite d'étalonnage. Cette droite est obtenue en mesurant la fluorescence émises par 6 solutions de concentrations connue de résorufine, et permet de ramener la quantité de fluorescence mesurée dans l'échantillon à une concentration de résorufine obtenue grâce à l'action de l'EROD.
- t est le temps de mesure ;
- C<sub>prot</sub> est la concentration en protéines, en mg/ml

### 8.3 : Protocole basé sur celui de KUTLU & SUSUZ, 2004.

Les gammars sont homogénéisés individuellement dans 150 µl de tampon Tris/HCl 0,1 M à pH 7,8. Les homogénats sont ensuite centrifugés à 13.000 g et 0°C durant 15 minutes à l'aide de la centrifugeuse Sepatech Biofuge 13. 50 µl de surnageant sont ensuite prélevés, chargés sur une microplaque à 96 puits en polystyrène (Black Microstrip 8, Labsystems) et

mélangés avec 150 µl de tampon Tris/HCl 0,1M à pH 7,8, 10 µl d'une solution de NADPH et 40 µl d'une solution d'éthoxyrésorufine.

L'article de KUTLU & SUSUZ (2004) ne précisant pas les concentrations des solutions de NADPH ou d'éthoxyrésorufine utilisées, plusieurs valeurs ont été testées. Ces valeurs sont respectivement de 10, 20 et 100 µM dans le cas de l'éthoxyrésorufine, et de 5, 10 et 100 mM pour le NADPH.

La mesure de fluorescence, le dosage des protéines et le calcul de l'activité sont identiques à ceux envisagés au point 8.2.

## **9. La protéomique**

### 9.1 : Concepts généraux et principes de la méthode

La protéomique vise l'étude du protéome, défini comme "l'ensemble des protéines présentes dans une culture, un tissu ou un organisme en un temps donné et sous des conditions environnementales précises" (WILKINS *et al.*, 1996 in CELLIER, 2004). Ainsi, la protéomique constitue un nouvel outil technologique permettant une mesure sensible des changements cellulaires dus, par exemple, à l'action des xénobiotiques (BANDARA & KENNEDY, 2002).

Les techniques de protéomique comprennent deux étapes fondamentales, la première consistant en la séparation et l'isolement des protéines contenues dans l'échantillon, et la seconde en l'identification de ces protéines.

La séparation des protéines se fait par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide. L'identification des protéines, quant à elle, nécessite l'excision des protéines d'intérêt depuis le gel de polyacrylamide, la digestion de ces protéines par des enzymes protéolytiques et l'analyse des différents peptides issus de cette digestion par spectrométrie de masse.

### 9.2 : Extraction et purification des protéines

Une dizaine de gammars (~ 0,1 g) sont broyés dans 1 ml de tampon phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 20 mM à pH 6,8, contenant un cocktail d'inhibiteur de protéases Complete Protease Inhibitor de marque Roche (Basel, Suisse). Lors de la préparation du tampon, une tablette d'inhibiteur de protéases est utilisée pour 50 ml de tampon.

Le broyat est ensuite centrifugé 15 minutes à 4°C et 15.000 g à l'aide de la centrifugeuse réfrigérée Sigma 2K15 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Le surnageant est alors récupéré, et sa concentration en protéines est déterminée par la méthode de BRADFORD (1976). Pour ce faire, le kit "Quick Start Bradford Protein Assay Kit" (Bio-Rad, Hercules, USA) est utilisé. Le standard est la sérumalbumine bovine (BSA), et les mesures d'absorbance sont effectuées à 595 nm grâce au spectrophotomètre Shimadzu UV-160A (Shimadzu, Kyoto, Japon).

Une quantité de surnageant équivalente à 100 µg de protéines a ensuite été prélevée et soumise à une purification visant à éliminer les substances interférentes comme les détergents, les sels, les lipides ou les acides nucléiques. Cette purification a été mise en œuvre à l'aide d'un kit "2-D Clean-Up Kit" (Amersham, Royaume-Uni). Pour ce faire, les indications du fabricant ont été suivies. Le lecteur intéressé trouvera le détail de ces indications à l'annexe 2.

Les protéines sont ensuite complètement redissoutes dans un tampon de réhydratation, qui va permettre non seulement la dissolution des protéines, mais aussi leur dénaturation. Ce tampon contient 7 M d'urée, 2 M de thiourée, 2 % d'aminosulfobetaine-14 (ASB-14), 0,8 % d'ampholyte Bio-Lyte 3-10 (Bio-Rad, Hercules, USA) et 25 mM de dithiothreitol (DTT). L'urée et la thiourée sont des agents dénaturants. L'ASB-14 est un détergent zwitterionique permettant une solubilisation totale en évitant la formation d'agrégats dus aux interactions hydrophobes. Les ampholytes contribuent également à la solubilisation des protéines en empêchant les interactions ioniques. Enfin, le DTT dénature les protéines en brisant les ponts disulfures.

### 9.3 : Première dimension : focalisation isoélectrique

La focalisation isoélectrique est une méthode électrophorétique qui va permettre la séparation des protéines selon leur point isoélectrique (pI). Pour ce faire, les protéines sont déposées sur une languette de polyacrylamide présentant un gradient de pH, et une différence de potentiel est appliquée pour permettre aux protéines de migrer à l'endroit du gradient où le pH correspond à leur pI.

Dans le cas présent, 100 µg de protéines sont chargés sur une languette Immobiline DryStrip pH 3-11 NL, 18 cm (Amersham, Royaume-Uni), et du bleu de bromophénol est ajouté afin de pouvoir visualiser le front de migration. La différence de potentiel est appliquée par la cuve Protean IEF Cell (Bio-Rad, Hercules, USA), à une température de 20°C. Les conditions électriques sont d'abord de 50 Volts durant 9 heures, étape suivie par un passage de 50 à 200 V d'une durée de 2 heures, un passage de 200 à 1000 V d'une durée de 3 heures, et un passage de 1000 à 10000 V d'une durée d'1 heure. L'isofocalisation se termine ensuite par une période de 3h30 à un voltage constant de 10000.

### 9.4 : Seconde dimension : SDS-PAGE

La technique de SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est une méthode permettant de séparer les protéines selon leur masse moléculaire. En effet, les protéines étant dénaturées (par traitement au DTT, qui casse les ponts disulfures, et à l'iodoacétamide, qui alkyle les protéines au niveau des groupements –SH et empêche ainsi la reformation des ponts disulfures) et leurs charges étant masquées par la présence de SDS (détergent anionique formant avec les protéines un complexe dont la charge nette, négative, ne dépend que de la masse de la protéine), l'application d'une différence de potentiel va leur permettre de migrer dans le gel de polyacrylamide d'une manière qui dépendra uniquement de leur masse. Cette migration se fait dans une direction perpendiculaire à celle de la première dimension.

Après la première dimension, les strips sont rincés traités durant 15 minutes avec un tampon de réduction, contenant 6 M d'urée, 2 % de SDS, 0,375 M de Tris/HCl à pH 8,8, 20 %

de glycérol et 130 mM de DTT. Suite à cela, ils sont traités pendant 15 minutes avec un tampon d'alkylation, dont la composition est identique au tampon de réduction, à ceci près qu'il ne contient pas de DTT mais 135 mM d'iodoacétamide (IAA). Ils sont alors prêts pour la deuxième dimension.

Les gels de polyacrylamide, d'une épaisseur de 1 mm, sont préparés de manière à contenir 12,5 % d'acrylamide/bisacrylamide, 20 % de SDS et 1,5 M de Tris/HCl pH 8,8. Juste avant de les couler, on ajoute 0,033 % de N,N,N,N-tétraméthylethylènediamine (TEMED) et 0,5 mM de persulfate d'ammonium (APS). Le TEMED joue le rôle d'initiateur de la polymérisation, tandis que l'APS catalyse cette polymérisation. Les gels sont ensuite coulés dans des cassettes de moulage, lesquelles sont placées dans la Protean + Multi-Casting Chamber (Bio-Rad, Hercules, USA), où les sont laissés à polymériser durant 30 minutes à 1 heure.

Les strips ayant subi une réduction au DTT et une alkylation à l'IAA sont alors placés à la surface des gels de polyacrylamide, et les gels sont placés dans la cuve Protean + Dodeca Cell (Bio-Rad, Hercules, USA). On ajoute en outre du bleu de bromophénol, qui va permettre de visualiser le front de migration, et un marqueur de poids moléculaire (Amersham LMW-SDS). Le marqueur de poids moléculaire est un mélange de protéines, qui va rendre possible l'estimation du poids moléculaire des protéines présentes sur le gel au terme de la migration. Cette opération s'effectue par comparaison entre l'emplacement des protéines d'intérêt et celui des protéines constituant le marqueur, dont le poids moléculaire est connu.

La cuve est ensuite remplie avec 23 litre de tampon de cuve (10 % SDS, 0,2 M de glycine, 0,025 M de Tris), et une différence de potentiel est appliquée d'abord durant 30 minutes avec une puissance de 2 Watts par gel, puis durant environ 4 heures à une puissance de 100 W. Lorsque le front de migration se situe à environ 0,5 cm du bord du gel, l'électrophorèse est arrêtée et les gels sont démoulés..

## 9.5 : Coloration de gels

Afin de pouvoir observer les spots correspondant aux différentes protéines, les gels sont colorés à l'aide d'une solution de nitrate d'argent.

Après avoir été démoulés, les gels sont d'abord fixés durant 3 heures à l'aide une solution contenant 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique. Ils sont ensuite lavés 10 minutes dans une solution contenant 50 % d'éthanol, puis 10 minutes à l'eau milli-Q. Par la suite, ils sont sensibilisés durant 1 minute à l'aide d'une solution 20 % en méthanol, 0,02 % en thiosulfate de sodium et 6,8 % en acétate de sodium. Après avoir été rincés à l'eau, ils sont plongés dans une solution contenant 1 % de nitrate d'argent et 0,04 % de formalin, et laissés à incuber durant 20 minutes à 4°C. Après cela, les gels sont rincés, puis traités avec une solution de développement contenant 0,04 % de formalin et 2 % de carbonate de sodium. Quand l'intensité de coloration souhaitée est atteinte, les gels sont plongés dans une solution permettant d'arrêter la coloration (5% d'acide acétique), puis stockés à 4°C dans une solution contenant 12 % de méthanol et 5 % d'acide acétique.

## 9.6 : Traitement des données

Après coloration, les gels sont scannés à l'aide d'un scanner de type Amersham Imager (Amersham, Royaume-Uni). Les images résultantes de cette opération peuvent

ensuite être traitées grâce au logiciel ImageMaster 2D Platinum, v. 5.0 (Amersham, Royaume-Uni). Ce logiciel permet de détecter des différences entre les images provenant de gels réalisés avec des gammes témoins et ceux réalisés avec des gammes contaminés.

## **10. Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica, v. 6.0 (Statsoft, Tulsa, USA).

## V. Résultats & Discussion

## 1. Déterminations des gammares de l'élevage

Ces résultats sont présentés dans le tableau 2.

Nombre d'individus	<i>G. pulex</i>	<i>G. fossarum</i>	<i>G. wauttieri</i>	Indéterminés	Pourcentage de <i>G. pulex</i>
10	9	1	0	0	90
10	10	0	0	0	100
10	10	0	0	0	100
10	9	0	1	0	90
10	10	0	0	0	100
10	10	0	0	0	100
10	9	0	0	1	90
10	10	0	0	0	100
10	9	1	0	0	90
10	10	0	0	0	100

**Tableau 2 :** Distribution des espèces du genre *Gammarus* dans l'élevage de masse mis en place à partir de gammares provenant du Blanc Gravier à Colchester.

Comme le montre le tableau 2, seules 3 espèces de gammares ont été recensées. De plus, l'espèce *Gammarus pulex* montre une dominance extrêmement marquée. En effet, 96 % des individus déterminés appartiennent à cette espèce.

Etant donné la proportion très élevée d'individus appartenant à l'espèce *Gammarus pulex* présente dans l'élevage, il a été considéré pour la totalité des expériences utilisant ces animaux que tous les individus appartenaient à cette espèce. En effet, dans la mesure où plus de 95 % des animaux sont dans ce cas, cette généralisation nous a paru acceptable.

## 2. Survie des gammares durant les contaminations

Pour chaque congénère ou mélange de congénères, un total de 10 boîtes, réparti sur deux expériences indépendantes, a été contaminé. Les résultats concernant la survie des gammares durant ces contaminations sont présentés au tableau 3.

Réplicat n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne
Témoins	100	70	80	80	60	60	70	100	90	90	80 ± 0,15
PCB n° 77	70	80	70	70	70	70	60	70	80	90	73 ± 0,08
PCB n° 169	80	80	80	90	60	70	80	70	60	70	74 ± 0,10
7 traceurs	80	70	80	60	60	70	80	70	70	80	72 ± 0,08

**Tableau 3 :** Taux de survie (exprimés en pourcentage de l'effectif de départ) des gammares exposés à différents contaminants pendant 144 heures. Pour chaque contaminant, le taux de survie moyen est exprimé sous la forme moyenne ± écart-type.

L'analyse du tableau 4 permet de constater que le taux de survie moyen est légèrement plus élevée dans le cas des témoins que dans le cas des gammars contaminés. Toutefois, cette différence n'est pas significative (ANOVA unifactorielle à 3 degrés de liberté,  $p = 0,339$ ).

Le fait que la mortalité entre témoins et contaminés ne soit pas différente confirme bien que, pour chacun des contaminants, les concentrations sont du domaine de la toxicité chronique. Ce constat étant prévisible, les seuils de toxicité aiguë des PCBs étant, comme cela a été évoqué plus haut, très élevés.

### **3. Concentrations des solutions aqueuses de PCBs**

Comme cela a été mentionné au point IV.4.3, les concentrations des solutions aqueuses de PCBs ont été contrôlées avant de les utiliser pour les contaminations. De plus, les concentrations de ces solutions au moment de les changer (soit après 24 heures) ont également été mesurées en boîtes en plastique et en boîtes en verre, afin de déceler d'éventuelles différences entre ces 2 types de dispositifs. Les résultats de ces mesures, qui ont bien sûr été réalisés préalablement aux contaminations et en l'absence d'animaux dans les boîtes, sont présentés dans le tableau 4.

<b>Concentrations (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>			
<b>Congénère</b>	<b>T<sub>0</sub></b>	<b>T<sub>24</sub></b>	
		<b>Verre</b>	<b>Plastique</b>
<b>28</b>	1,10 ± 0,05	0,76 ± 0,03	0,04 ± 0,01
<b>52</b>	0,91 ± 0,04	0,57 ± 0,13	0,05 ± 0,01
<b>101</b>	1,20 ± 0,15	0,53 ± 0,14	0,02 ± 0,01
<b>118</b>	1,21 ± 0,08	0,62 ± 0,12	0,14 ± 0,02
<b>138</b>	1,14 ± 0,07	0,48 ± 0,12	0,12 ± 0,01
<b>153</b>	1,20 ± 0,07	0,54 ± 0,04	0,15 ± 0,01
<b>180</b>	1,04 ± 0,08	0,58 ± 0,13	0,30 ± 0,03
<b>77</b>	3,66 ± 0,70	1,04 ± 0,04	0,41 ± 0,04
<b>169</b>	0,74 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,24 ± 0,01

**Tableau 4 :** Concentrations (en  $\mu\text{g/L}$ ) des solutions aqueuses de PCBs. T<sub>0</sub> désigne le moment où les solutions aqueuses sont versées dans les boîtes (soit après 24 heures de stabilisation à 15°C), et T<sub>24</sub> représente le moment où les solutions sont prélevées hors des boîtes afin d'être remplacées par des solutions fraîches. Les valeurs sont données sous la forme moyenne ± écart-type.

Les concentrations théoriques souhaitées sont, rappelons-le, de 1  $\mu\text{g/L}$  (ou 1 ppb) dans le cas de chacun des 7 traceurs et du congénère 169, et de 10  $\mu\text{g/L}$  (10 ppb) dans le cas du congénère 77. L'analyse du tableau 4 montre que, si les concentrations réelles des solutions aqueuses sont proches des concentrations théoriques dans les cas des 7 traceurs, elles le sont

Congénère	Concentration dans l'échantillon (ng/g de <u>poids frais</u> )							
	Témoins		7 traceurs		PCB n°77		PCB n°169	
	Verre	Plastique	Verre	Plastique	Verre	Plastique	Verre	Plastique
28	n.d.	n.d.	<b>164,20</b>	<b>78,01</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
52	n.d.	n.d.	<b>152,04</b>	<b>91,60</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
70	5,74	8,66	6,41	7,19	5,44	6,89	8,68	6,07
101	3,22	3,51	<b>273,53</b>	<b>173,79</b>	4,91	3,89	4,04	4,82
87	3,30	4,60	4,5	2,10	2,51	3,18	4,79	3,35
77	2,93	1,03	2,03	1,12	<b>638,55</b>	<b>409,37</b>	1,72	1,13
149	8,58	7,46	8,65	8,73	7,10	6,62	6,37	6,37
118	4,90	5,63	<b>253,84</b>	<b>183,49</b>	5,97	5,22	6,02	5,74
153	7,60	6,98	<b>201,63</b>	<b>145,27</b>	5,46	7,45	5,39	6,20
138	6,00	6,17	<b>214,57</b>	<b>158,00</b>	5,51	6,07	5,79	5,31
187	1,33	0,11	1,31	1,22	1,95	2,40	2,21	2,44
180	0,59	0,48	<b>138,49</b>	<b>116,75</b>	0,76	0,86	1,85	1,19
169	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<b>384,90</b>	<b>311,15</b>
Σ totale	44,19	47,63	1426,20	973,27	678,16	551,95	438,74	363,78

**Tableau 5 :** Teneurs en PCBs, exprimées en ng/g (ppb) de poids frais, mesurées dans les gammes témoins ou exposés pendant 144 heures aux 7 congénères traceurs, au congénère 77 ou au congénère 169. Les chiffres en gras désignent le(s) congénère(s) utilisé(s) comme contaminant(s) dans l'expérience envisagée. L'abréviation "n.d." signifie que le congénère n'a pas été détecté dans l'échantillon.

moins dans le cas du congénère 77, et dans une moindre mesure dans le cas du congénère 169. Ceci s'explique par la faible hydrosolubilité des PCBs. En effet, HUANG & HONG (2002) rapportent des valeurs de solubilité dans l'eau à 15 °C de 1,77 µg/L dans le cas du congénère n° 77, et de 0,083 µg/L dans le cas du congénère n° 169. Ainsi, si les concentrations réelles sont, pour ces congénères, inférieures aux concentrations attendues, elles sont déjà largement supérieures aux limites de solubilité généralement admises.

Nous remarquons également qu'au terme de la période d'utilisation, les concentrations des solutions aqueuses de PCBs contenues dans les boîtes en plastique sont plus faibles que celles des solutions contenues dans les boîtes en verre. Ces différences sont significatives dans le cas des congénères 28, 52, 101, 118, 153 et 77 (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé,  $p < 0,05$ ), mais pas dans le cas des congénères 138, 180 ou 169 (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé,  $p > 0,05$ ).

Etant donné que les deux types de boîtes ont des dimensions très proches, la surface d'échange avec la phase gazeuse est sensiblement égale dans les deux cas. Le passage des PCBs en phase gazeuse ne peut donc pas expliquer ces différences. Il est plus probable que ces variations proviennent d'une adsorption des PCBs à la surface des matériaux plus grande dans le cas du plastique que dans le cas du verre.

Le fait que les concentrations en PCBs des solutions aqueuses soient plus stables dans le cas des boîtes en verre constitue un premier argument en faveur de celles-ci.

## **4. Dosages des PCBs dans les gammars**

### 4.1 : Dosages des PCBs dans les gammars contaminés en laboratoire

Le tableau 5 reprend les niveaux de contamination des gammars exposés aux différents contaminants, aussi bien en boîtes en verre qu'en boîtes en plastique.

A la lecture du tableau 5, plusieurs observations peuvent être formulées.

D'abord, un certain nombre de congénères n'ayant pas été utilisés dans le cadre de cette contamination sont présents dans les gammars. Il s'agit des congénères n° 70, 87, 149, et 187. Il est donc vraisemblable que ces congénères soient présents dans les gammars prélevés dans le Blanc Gravier. Toutefois, les concentrations de ces congénères sont faibles (toujours inférieures à 10 ng/g) et comparables dans tous les traitements. En outre, les faibles taux de contaminations des individus témoins, représentatifs de la contamination des gammars du Blanc Gravier à Colchester, justifient le choix de cette rivière comme point de référence.

Ensuite, les concentrations en congénères utilisés comme contaminants (congénères n° 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180 dans le cas de la contamination aux 7 traceurs, congénère n° 77 ou n° 169 dans le cas des autres contaminations), si l'on exclut les traitements où ils ont été utilisés, sont également faibles et comparables dans tous les traitements. Cela montre bien que le dispositif de contamination ne permet les contaminations croisées inter-traitements.

On remarque également que les teneurs en congénères utilisés comme contaminants, dans le cas des traitements où ils ont été utilisés, sont nettement plus élevées que dans le cas des autres traitements (jusqu'à 600 fois supérieures, dans le cas du PCB n° 77). Ceci démontre l'efficacité du système de contamination.

En outre, nous avons calculé les facteurs de bioconcentration, ou "bioconcentration factor" (BCF) pour les différents congénères de PCBs utilisés. Le BCF, exprimé sous la forme du rapport entre la concentration de toxique décelée dans l'organisme et la concentration en toxique du milieu de contamination, est considéré comme un bon moyen d'évaluer le taux de pénétration d'un toxique à travers les surfaces d'échange de l'organisme (BATURO & LAGADIC, 1996). Les BCF des différents congénères de PCBs sont présentés au tableau 6.

PCB n°	28	52	101	118	138	153	180	77	169
BCF	149,28	167,08	227,94	209,78	176,87	178,81	133,16	174,47	520,13

**Tableau 6 :** Facteur de bioconcentration (BCF) des différents congénères de PCBs utilisés pour contaminer *Gammarus pulex* en boîtes de verre. Le temps de contamination est de 144 heures.

Comme le montre le tableau 5, la bioconcentration est très marquée dans le cadre de tous les congénères utilisés comme contaminants. Le système de contamination par l'eau du milieu, utilisé lors de ces expérimentations, est donc adéquat.

Enfin, les teneurs en congénères contaminants, dans les traitements où ils ont été utilisés, sont plus élevées dans le cas des gammars contaminés en boîte en verre que dans celui des gammars contaminés en boîtes en plastique. Ce phénomène peut être mis en évidence pour tous les contaminants envisagés.

Il est vraisemblable que ce phénomène découle directement du fait que les concentrations des solutions aqueuses de PCBs sont plus faibles dans le cas des boîtes en plastique.

Etant donné que les concentrations en PCBs sont plus élevées dans le cas des boîtes de verre, aussi bien sur le plan des solutions aqueuses que des teneurs dans les animaux contaminés, ce type de boîte a été retenu et les boîtes en plastique, bien qu'elles présentent d'autres avantages (notamment le fait qu'elles soient à usage unique, ce qui épargne des séquences de lavage fastidieuses, et leur moindre coût) ont été abandonnées. Tous les gammars qui ont été contaminés par la suite, et qui ont été utilisés pour des analyses d'activité enzymatique ou pour des analyses protéomiques, ont été contaminés à l'aide de boîtes en verre.

#### 4.2 : Dosages des PCBs dans les gammars prélevés dans l'environnement

Les teneurs globales en PCBs des gammars prélevés dans les 3 rivières échantillonnées, à savoir la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont, l'Ourthe à Angleur et la Mehaigne à Wanze sont présentées au tableau 7. Les PCBs étant des composés de nature lipophile, il nous a paru intéressant d'exprimer ces teneurs aussi bien par rapport au poids frais des animaux que par rapport au poids de lipides qu'ils contiennent.

Concentrations en ng/g de poids frais			
Station	Mehaigne	Ourthe	Vesdre
$\Sigma$ 7 traceurs	58,01 $\pm$ 4,62	80,55 $\pm$ 6,81	101,23 $\pm$ 4,99
$\Sigma$ totale	108,82 $\pm$ 13,53	134,94 $\pm$ 12,87	177,23 $\pm$ 6,44
Concentrations en ng/g de poids de lipides			
Station	Mehaigne	Ourthe	Vesdre
$\Sigma$ 7 traceurs	3147,49 $\pm$ 219,02	3509,99 $\pm$ 436,05	4281,60 $\pm$ 212,32
$\Sigma$ totale	5402,48 $\pm$ 674,43	5873,08 $\pm$ 665,88	7496,05 $\pm$ 273,84

**Tableau 7 :** Concentrations globales des différents congénères de PCBs, exprimées en ng/g de poids frais ou de poids de lipides pour la somme des 7 congénères traceurs et la somme totale des 27 congénères recherchés. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type.

Après analyse du tableau 7, on remarque que la station la plus contaminée est la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Ce phénomène se marque aussi bien en termes de concentration totale qu'en termes de concentrations en 7 traceurs, et ce de la même façon si l'on raisonne en fonction du poids frais des gammars ou de leur poids de lipides. De plus, les différences entre les concentrations en PCBs à cette station et celles des autres stations sont significatives pour les quatre paramètres envisagés (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé,  $p < 0,05$ ).

De plus, les concentrations en PCBs des individus provenant de l'Ourthe à Angleur sont plus élevées que celles des individus provenant de la Mehaigne à Wanze. Toutefois, ces différences ne sont significatives pour aucune des 4 concentrations présentées au tableau 6 (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé,  $p > 0,05$ ).

D'une manière générale, les taux de PCBs présents dans les gammars prélevés à ces 3 stations sont assez élevés. Ainsi, seuls les gammars prélevés dans la Mehaigne à Wanze satisfont à la norme fixée par l'Arrêté du 6/3/2002, qui prévoit des concentrations maximales de 75 ng/g de poids frais pour la somme des 7 traceurs. Ce constat confirme l'intérêt de ces stations comme sites pollués.

Une comparaison de ces résultats avec ceux d'autres études concernant le gammare s'avère difficile dans la mesure où aucune étude concernant les taux de contamination des gammars (ou d'autres macroinvertébrés benthiques) par les PCBs n'a, à notre connaissance, été publiée.

Par contre, les études de ce type concernant les poissons sont nombreuses. Parmi celles-ci, celles de CARABIN (2003), LEROY (2004) et THOMÉ *et al.* (2005) sont particulièrement intéressantes, dans la mesure où elles mentionnent les taux de contaminations de différentes espèces de poissons aux stations envisagées dans le cadre de ce mémoire. Les résultats de ces études sont présentés au tableau 8, en regard des résultats obtenus chez les gammars.

La lecture du tableau 8 inspire plusieurs commentaires. D'abord, on remarque que la variabilité des concentrations en PCBs dans les gammars est plus faible que celle des concentrations en PCBs dans les poissons, quelles que soient les espèces ou les stations. Ceci est vraisemblablement imputable au fait que les dosages sont individuels dans le cas des

<b>Station</b>	<b>Espèce</b>	Somme des 7 traceurs (ng/g de poids frais)	Somme totale (ng/g de poids frais)	Somme des 7 traceurs (ng/g de poids de lipides)	Somme totale (ng/g de poids de lipides)
<b>Mehaigne</b>	<b>Chevaines (mâles)</b>	23 ± 14	40 ± 25	2230 ± 1310	3882 ± 2881
	<b>Chevaines (femelles)</b>	24 ± 13	42 ± 22	2805 ± 2246	4997 ± 4973
	<b>Gammarès</b>	58,01 ± 4,62	108,82 ± 13,53	3147,49 ± 219,02	5402,48 ± 674,43
<b>Ourthe</b>	<b>Chevaines (mâles)</b>	176 ± 133	323 ± 49	9843 ± 5610	17983 ± 9957
	<b>Anguilles</b>	447 ± 328	849 ± 602	6212 ± 3966	12493 ± 8344
	<b>Gammarès</b>	80,55 ± 6,81	134,94 ± 12,87	3509,99 ± 436,05	5873,08 ± 665,88
<b>Vesdre</b>	<b>Chevaines (femelles)</b>	635 ± 202	1161 ± 378	20793 ± 6049	37905 ± 11221
	<b>Anguilles</b>	1501 ± 543	2777 ± 975	6779 ± 4282	12518 ± 7744
	<b>Goujons (mâles)</b>	33 ± 20	48 ± 28	4942 ± 2320	7139 ± 3174
	<b>Goujons (femelles)</b>	23 ± 12	35 ± 17	4452 ± 2596	6743 ± 3703
	<b>Gammarès</b>	101,23 ± 4,99	177,23 ± 6,44	4281,60 ± 212,32	7496,05 ± 273,84

**Tableau 8 :** Niveaux de contamination des chevaines (*Leuciscus cephalus*), des anguilles (*Anguilla anguilla*), des goujons (*Gobio gobio*) et des gammarès (*Gammarus pulex*) dans la Mehaigne à Wanze, l'Ourthe à Angleur et la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont (d'après CARABIN, 2003 ; LEROY, 2004 et THOME *et al.*, 2005, modifié). Les valeurs sont reprises sous la forme moyenne ± écart-type.

NB : Dans le cadre de ces études, seuls 24 congénères de PCBs ont été recherchés. Les congénères n° 77, 87 et 169 n'ont pas fait l'objet de mesures de concentration.

poissons (et reflètent donc une variabilité interindividuelle) tandis qu'ils sont réalisés sur des pools de 10 à 15 individus dans le cas des gammars, la quantité de matériel d'un gammare seul étant beaucoup trop faible pour l'analyse.

Ensuite, on observe que, dans la plupart des cas, les concentrations en PCBs dans les poissons sont nettement supérieures à celles enregistrées dans les gammars. C'est le cas des chevaines mâles et des anguilles dans l'Ourthe à Angleur, ainsi que des chevaines femelles et des anguilles dans la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Ceci s'explique assez simplement par la différence des régimes alimentaires des organismes considérés. En effet, les phénomènes de bioamplification jouent, comme cela a été exposé dans l'introduction, un rôle important dans la bioaccumulation des polluants organiques. Ainsi, un animal sera d'autant plus contaminé que son niveau trophique est élevé. Le niveau trophique des poissons considérés étant plus élevé que celui des gammars, il est aisément compréhensible que les niveaux de contamination de ces derniers soient moindres.

Toutefois, comme le montre le tableau 8, cette règle n'est pas absolue. Les goujons (mâles et femelles) prélevés dans la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont ainsi que les chevaines (mâles et femelles) prélevés dans la Meuse à Wanze montrent ainsi des niveaux de contamination sensiblement égaux, voire nettement plus faibles que les gammars capturés aux sites correspondants. Plusieurs raisons peuvent expliquer cet étonnant constat.

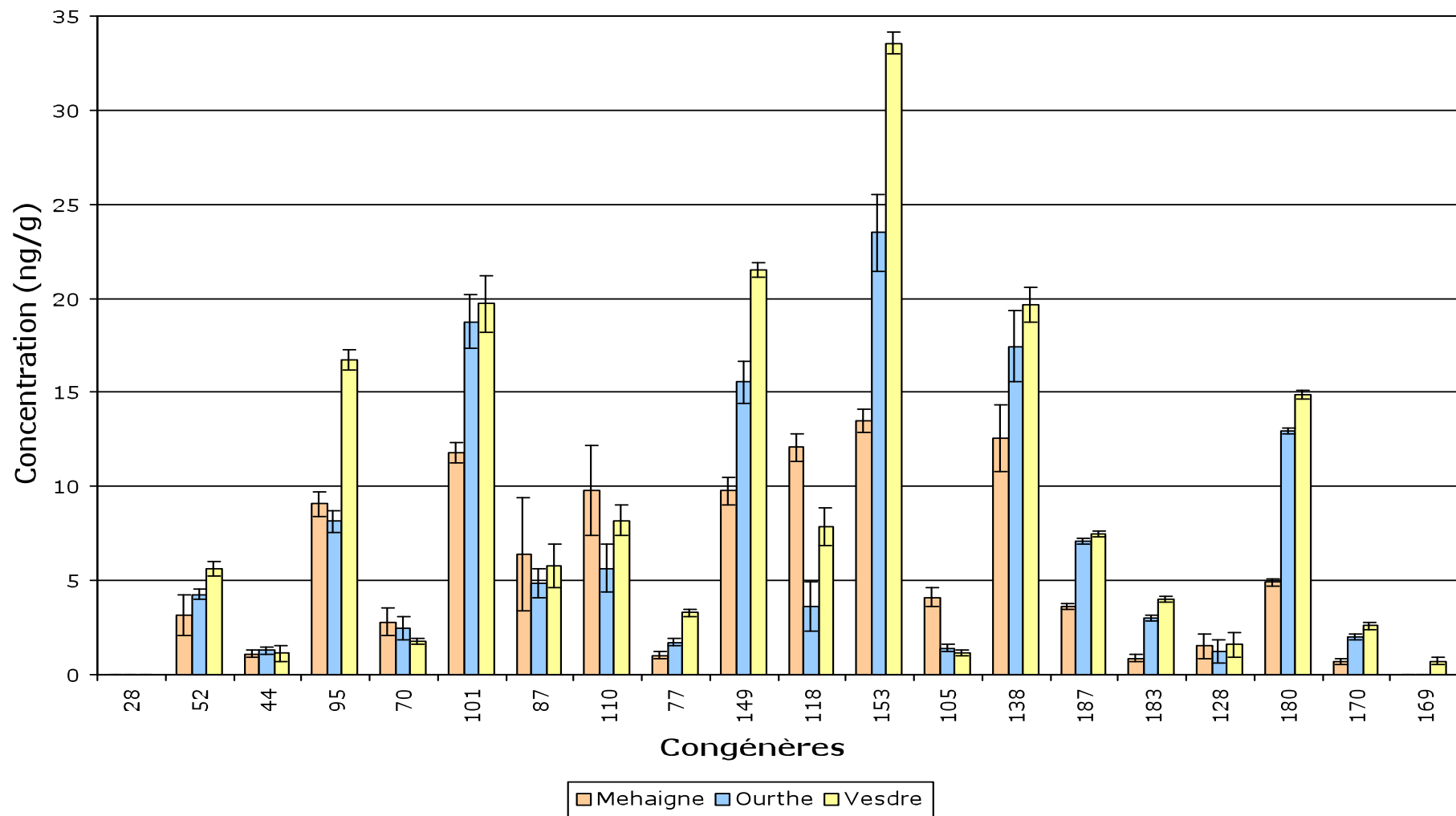
Tout d'abord, dans le cas des études de CARABIN (2003), LEROY (2004) et THOMÉ *et al.* (2005), seuls 24 congénères ont été recherchés. Les congénères n° 77, 87 et 169 ont ainsi été laissés de côté. Or, dans le cas de cette étude, leurs concentrations de ces congénères ont été mesurées et contribuent, même si cette contribution est relativement faible (voir plus bas) à la somme totale. Il est probable que si ces congénères avaient également été échantillonnés, les concentrations en PCBs des poissons seraient plus élevées.

De plus, si des différences nettes sont observables lorsque l'on raisonne en termes de poids frais, ces différences sont fortement atténuées lorsque l'on raisonne en terme de poids de lipides. En effet, les proportions de lipides dans ces organismes sont différentes. Ainsi, les proportions de lipides dans les muscles des chevaines ou des goujons varient de 0,4 à 4,5 % du poids frais (THOMÉ *et al.*, 2005). Par contre, les proportions de lipides dans les gammars utilisés dans le cas de cette étude varient de 0,7 à 2 % du poids frais des animaux.

Ensuite, il faut signaler que les mesures ont été effectuées sur le corps entier dans le cas des gammars, mais sur le muscle uniquement dans le cas des poissons. Or, le muscle, s'il comporte un certain nombre d'avantages dans le cas de ce type d'étude (notamment de par son abondance dans l'organisme par rapport à d'autres organes), n'est généralement pas considéré comme l'organe montrant les taux de bioaccumulation les plus marqués. D'autres organes, comme le tissu adipeux, le foie ou les gonades, peuvent montrer des taux de contamination largement supérieurs au muscle (THOMÉ *et al.*, 1992 ; DEBIER, 2001). Il est donc possible que la concentration en PCBs dans ces organes chez les poissons considérés soient supérieures à celles observables chez les gammars.

Enfin, il est possible que, dans le cas des rivières envisagées, le niveau trophique des poissons soit plus bas que celui qu'on leur attribue généralement. En effet, la chevaine est un poisson typiquement omnivore, tandis que le goujon, s'il se nourrit principalement d'invertébrés, n'est pas un carnivore strict (FLAMMARION, 2000 *in* LEROY, 2004 ; THOMÉ *et al.*, 2005). Il est donc possible que la fraction végétale du régime alimentaire de ces deux

**Figure 6** : Niveaux de contamination (en ng/g de **poids frais**) des gammars prélevés dans la Mehaigne à Wanze, dans l'Ourthe à Angleur et dans la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Les valeurs sont présentées sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type.



espèces soit plus importante dans le cas des rivières échantillonnées ici que dans la plupart des autres cas. Le régime alimentaire du gammare comprenant, lui aussi, une fraction animale, les différences de niveau trophique entre les deux types d'animaux s'en trouveraient atténuées, ce qui pourrait expliquer la proximité des concentrations en PCBs.

Laissons maintenant de côté les concentrations globales pour nous intéresser aux concentrations de chacun des congénères en particulier.

La figure 6 illustre les concentrations de chacun des 27 congénères recherchés. On remarque ainsi que seuls 19 de ces 27 congénères sont présents, les congénères n° 8, 18, 28, 66, 194, 195, 206 et 209 étant absents.

Les congénères les plus présents sont les congénères n° 95, 101, 110, 149, 118, 153, 138, 187 et 180, soit essentiellement des congénères comportant 5 atomes de chlore ou plus. Ces congénères représentent 86 % de la concentration totale en PCBs dans le cas de la Mehaigne, 88 % dans le cas de l'Ourthe, et 87 % dans le cas de la Vesdre.

Par contre, les congénères plus faiblement chlorés, comme les tri- ou tétrachloro-biphényles, sont présents en concentrations nettement plus faibles. C'est notamment le cas des congénères n° 44 et 77, mais aussi de certains des 7 traceurs, comme le PCB n° 52. Par ailleurs, il est intéressant de noter que l'un des 7 traceurs (le PCB n° 28) n'a été détecté dans aucun des échantillons dosés.

Le congénère n° 153 est toujours celui dont la concentration moyenne est la plus élevée.

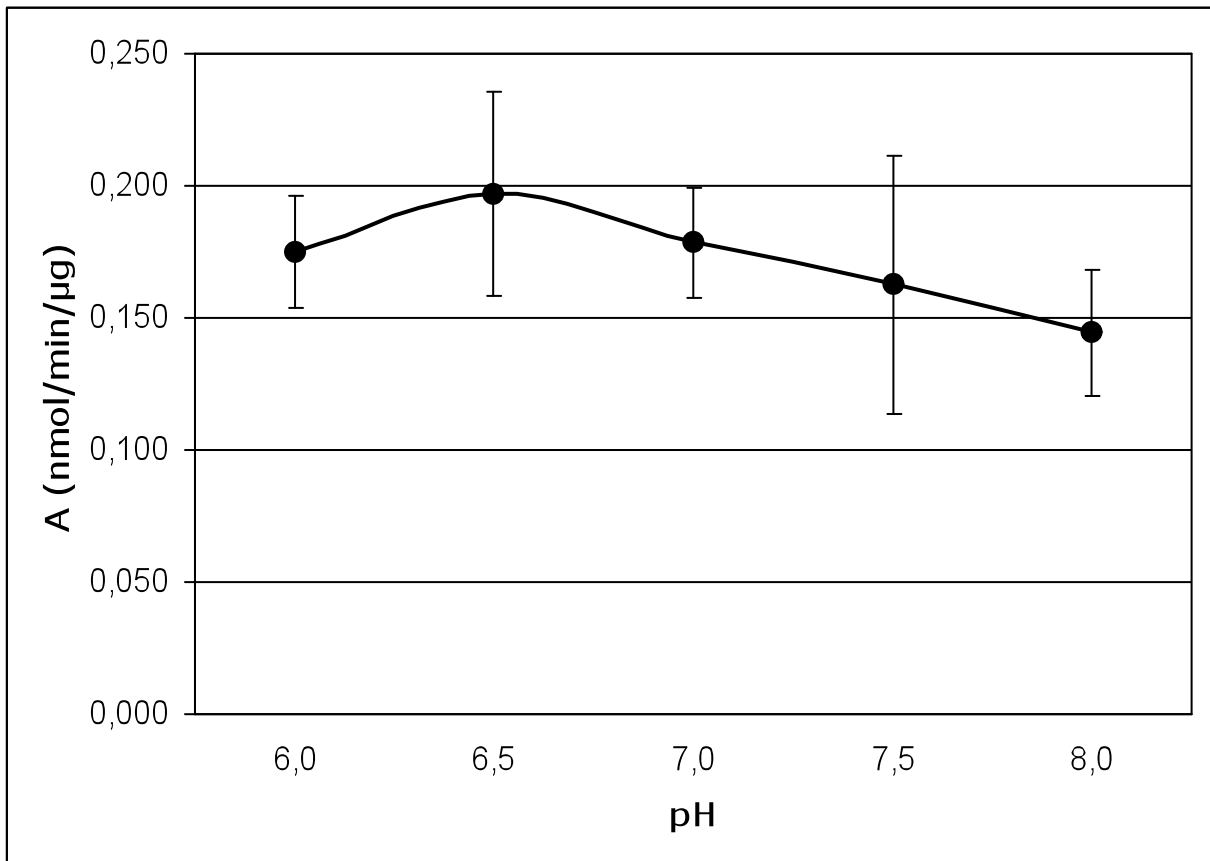
Enfin, bien que la Mehaigne à Wanze montre des niveaux de contamination relative en PCB 110, 105 et 118 plus élevés que les deux autres stations, le spectre de contamination par les PCBs est relativement comparable dans les 3 rivières échantillonnées. Ceci montre que les animaux ne sont pas en phase d'intoxication aiguë, mais bien qu'ils subissent une contamination chronique à partir des PCBs présents dans leur milieu, vraisemblablement suite à une désorption des toxiques à partir du sédiment (THOME *et al.*, 2005).

## **5. Mise au point de la mesure de l'activité des GSTs**

Afin de déterminer les conditions optimales pour le dosage de l'activité des GSTs chez *Gammarus pulex*, différents paramètres de pH et de température de réaction ont été testés. De plus, une comparaison des valeurs d'activité entre individus entiers et individus décapités a été réalisée.

### 5.1 : Influence du pH

Dans le but d'établir le pH optimal de réaction pour le dosage de l'activité des GSTs, plusieurs solutions de tampon phosphate, dont les pH étaient respectivement de 6, 6,5, 7, 7,5 et 8 ont été testées. Les dosages ont été réalisés à 25°C, et sur des gammars entiers. Dans chacun des cas, l'échantillonnage était constitué de 20 individus provenant de l'élevage de gammars. Les résultats concernant l'influence du pH sur l'activité des GSTs sont présentés à la figure 7.



**Figure 7 :** Effet du pH sur l'activité des glutathion-S-transférases, exprimée en nanomoles/min/µg de protéines. Les données sont présentées sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. La totalité des valeurs est visible à l'annexe 3.

Ainsi, on peut constater que l'activité des GSTs varie bien selon le pH auquel la mesure est effectuée (ANOVA unifactorielle à 4 degrés de liberté,  $p = 0,000051$ ). Le tableau 9 donne les valeurs de  $p$  pour les comparaisons 2 à 2.

pH	6	6,5	7	7,5	8
6	-	0,366	0,999	0,836	0,074
6,5	0,366	-	0,545	<b>0,035</b>	<b>0,001</b>
7	0,999	0,545	-	0,675	<b>0,034</b>
7,5	0,836	<b>0,035</b>	0,675	-	0,537
8	0,074	<b>0,001</b>	<b>0,034</b>	0,537	-

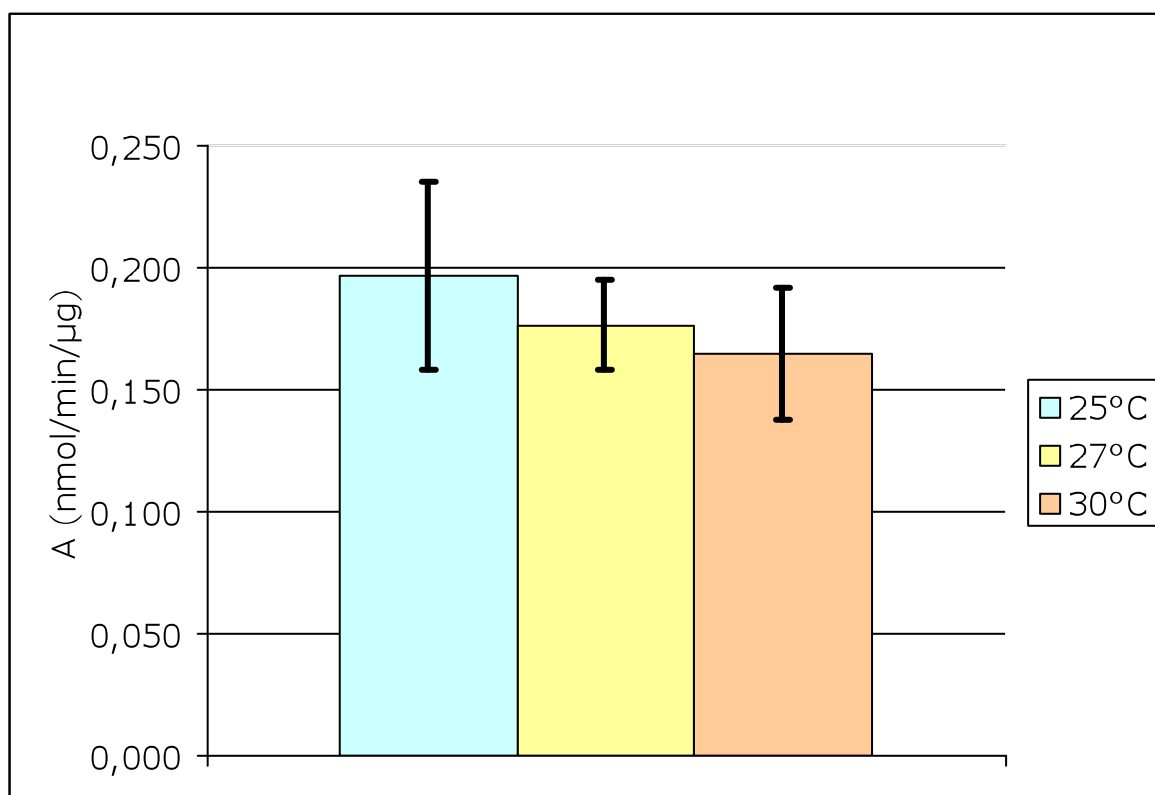
**Tableau 9 :** Valeurs de  $p$  pour les comparaisons 2 à 2 des différents pH, réalisées à l'aide du test Post-Hoc de Scheffé. Les valeurs en gras sont les valeurs significatives ( $p < 0,05$ ).

A l'analyse du tableau 9, on remarque que seules certaines différences sont significatives. Ainsi, l'activité est significativement plus élevée à pH 6,5 qu'à pH 7,5 ou 8. De plus, elle est moindre à pH 8 qu'à pH 7.

D'une manière générale, les valeurs d'activité des GSTs le plus élevées ont été obtenues à pH 6,5, avec une activité moyenne de  $0,197 \pm 0,039$  nmol/min/ $\mu$ g, contre  $0,175 \pm 0,021$  nmol/min/ $\mu$ g à pH 6,  $0,179 \pm 0,021$  nmol/min/ $\mu$ g à pH 7,  $0,163 \pm 0,049$  nmol/min/ $\mu$ g à pH 7,5 et  $0,144 \pm 0,024$  nmol/min/ $\mu$ g à pH 8.

## 5.2 : Influence de la température

Différentes températures de réaction, à savoir 25°C, 27°C et 30°C, ont été testées. Durant ces essais, le pH de réaction était de 6,5 et les mesures ont été effectuées sur des gammars entiers. Pour chaque température, l'activité des GSTs de 20 gammars provenant de l'élevage a été mesurée. Les résultats de ces dosages sont présentés à la figure 8.



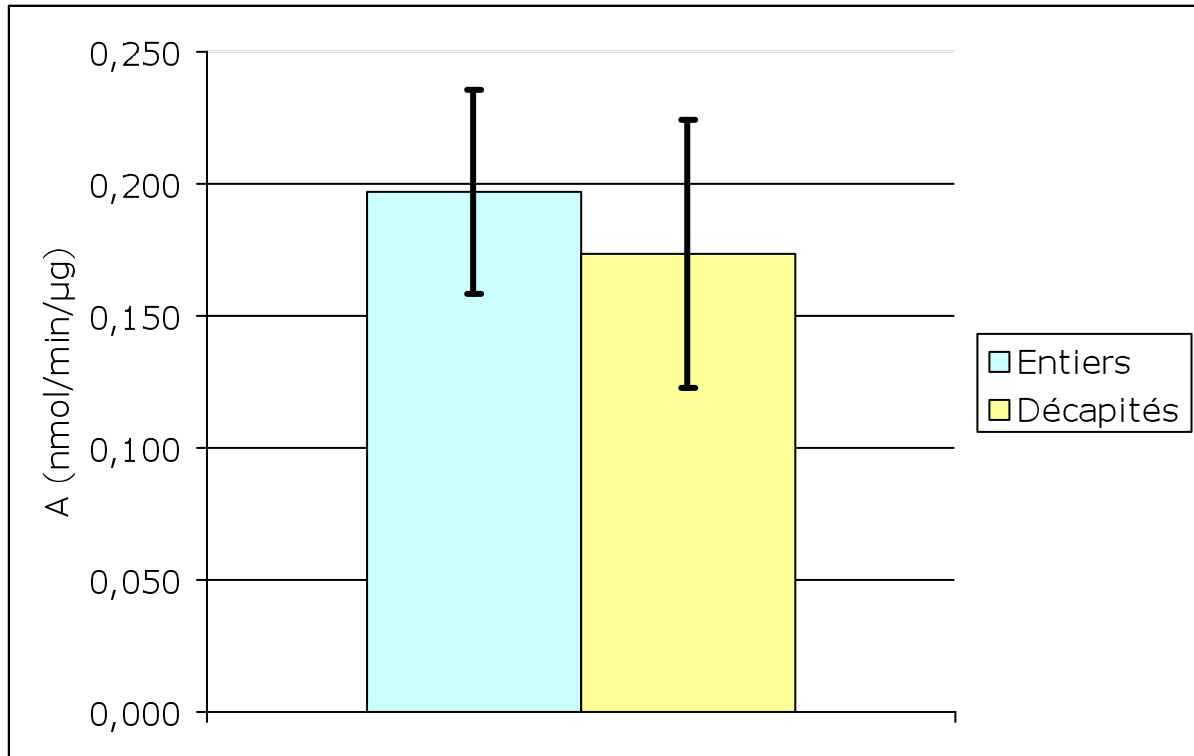
**Figure 8 :** Influence de la température sur l'activité des glutathion-S-transférases. Les valeurs, exprimées en nmol/min/ $\mu$ g, sont présentées sous la forme moyenne  $\pm$  écart-type. L'ensemble des mesures effectuées dans le cas de ces essais est présenté à l'annexe 3.

L'observation de la figure 6 permet de constater que l'activité des GSTs varie selon la température de réaction. De plus, cette variation est statistiquement significative (ANOVA unifactorielle à 2 degrés de liberté,  $p = 0,004$ ).

Ainsi, les valeurs d'activité les plus élevées sont celles mesurées à 25°C, avec une activité moyenne de  $0,197 \pm 0,039$  nmol/min/ $\mu$ g protéines. Cette élévation est significative par rapport aux valeurs mesurées à 30°C (activité moyenne de  $0,165 \pm 0,027$  nmol/min/ $\mu$ g protéines), mais pas par rapport à celles mesurées à 27°C, caractérisées par une activité moyenne de  $0,176 \pm 0,018$  nmol/min/ $\mu$ g protéines (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé, respectivement  $p = 0,004$  pour 30°C et  $p = 0,095$  pour 27°C).

### 5.3 : Influence du type d'échantillon

Des mesures ont également été effectuées aussi bien sur des gammares entiers que sur des gammares décapités *post mortem*, afin d'évaluer l'impact de ce facteur sur l'activité des GSTs. Pour chacune des conditions, l'expérimentation portait sur 20 individus. Durant ces essais, le pH était de 6,5 et la température de 25 °C. Les résultats de ces essais sont illustrés à la figure 9.



**Figure 9 :** Influence de la condition entier/décapité sur l'activité des glutathion-S-transférases. Les valeurs sont exprimées en nmoles/min/μg protéines , et présentées sous la forme moyenne ± écart-type. La totalité des valeurs est consignée à l'annexe 3.

Ainsi, on peut observer que l'activité des GSTs est plus élevée chez les gammares entiers que chez les gammares décapités avant l'expérimentation, avec une activité moyenne de  $0,197 \pm 0,039$  nmol/min/μg dans le cas des individus entiers contre  $0,173 \pm 0,051$  chez les individus décapités. Toutefois, cette différence n'est pas significative (Test T de Student pour échantillons indépendants,  $p = 0,249$ ).

### 5.4 : Conclusion

D'après les essais menés, les conditions optimales du dosage de l'activité des GSTs chez *Gammarus pulex* semblent être 6,5 en ce qui concerne le pH et 25°C en ce qui concerne la température. De plus, il semble plus profitable d'effectuer les mesures sur des gammares entiers.

Ces résultats sont en légère contradiction avec la méthode MC LOUGHLIN *et al.* (2000) qui préconisent pour *Gammarus pulex* un pH de réaction de 6,5 et une température de 30°C, et qui travaillent sur des gammares décapités.

Toutefois, en raison des résultats obtenus lors des essais et afin d'obtenir une réponse aussi importante que possible, tous les dosages sur des gammares contaminés ou directement prélevés dans l'environnement ont été réalisés à 25°C, pH 6,5 et sur les corps entiers des gammares.

## **6. Dosages de l'activité des GSTs sur des individus exposés aux PCBs**

Afin de détecter une éventuelle induction de l'activité des glutathion-S-transférases, des mesures d'activité ont été effectués d'une part sur des gammares contaminés en laboratoire à l'aide du congénère n° 77, du congénère n° 169 et d'un mélange contenant les 7 congénères traceurs, et d'autre part sur des gammares prélevés dans plusieurs rivières wallonnes, à savoir la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont, l'Ourthe à Angleur et la Mehaigne à Wanze.

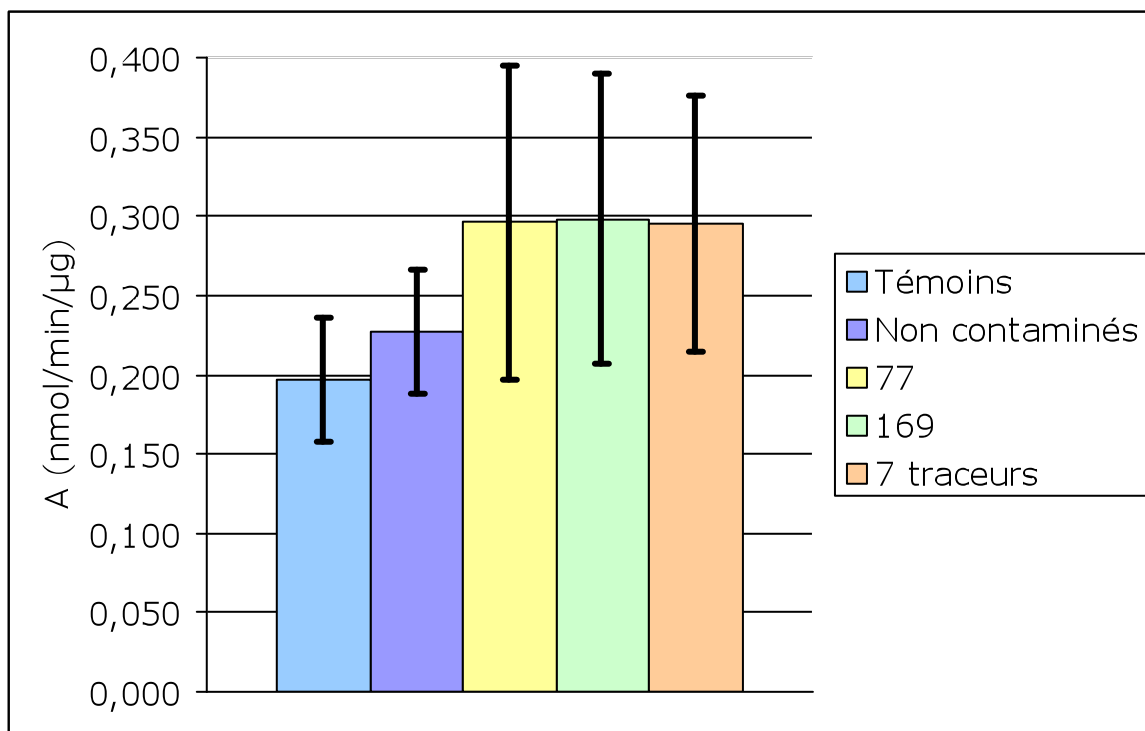
6.1 : Dosages de l'activité des GSTs sur des individus contaminés en laboratoire.

*Remarque préliminaire* : Il est important de différencier, dans la suite du présent travail, les gammares "témoins" et les gammares "non contaminés". Les gammares témoins sont des gammares provenant directement de l'élevage, et donc normalement représentatifs des conditions du Blanc Gravier à Colonster. Les gammares non contaminés, par contre, sont des gammares qui ont été, comme les gammares contaminés, maintenus en boîtes de Petri durant 144 heures, mais qui n'ont été exposés à aucun des contaminants utilisés dans le cadre de cette étude.

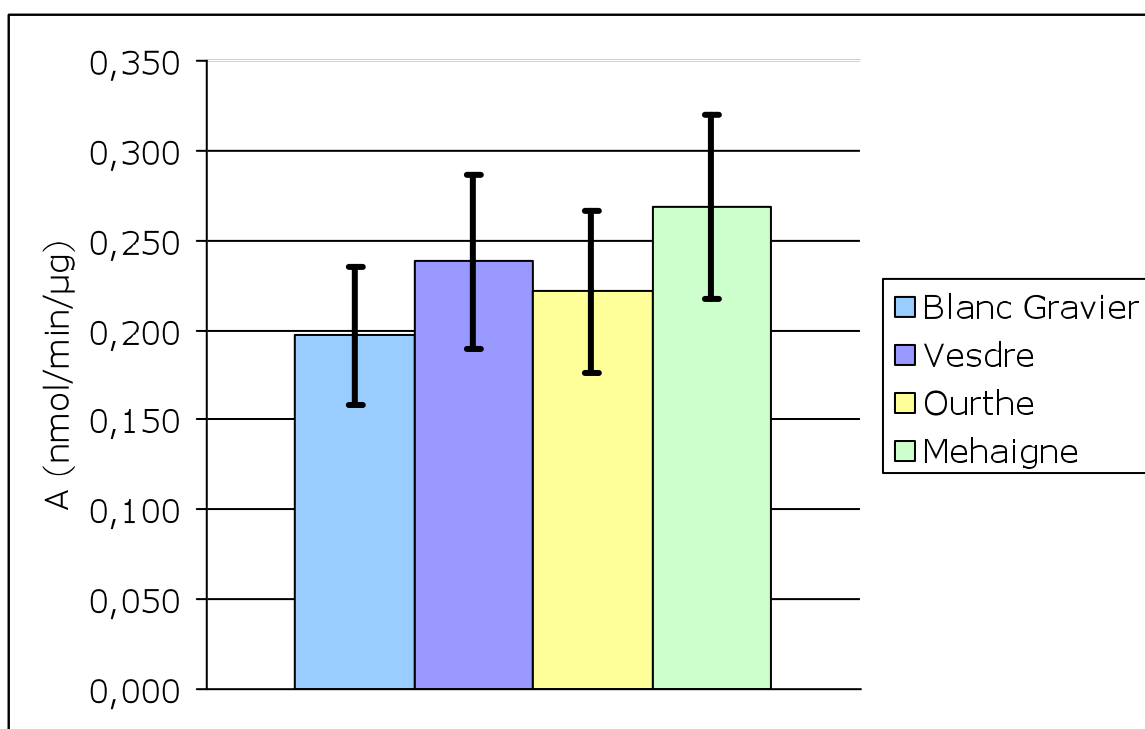
Au terme de la période de contamination, 20 gammares ont été prélevés pour chaque traitement, et l'activité des GSTs a été mesurée chez ces gammares suivant les conditions mentionnées au point 5.4. Les résultats de ces dosages sont illustrés à la figure 10, et l'ensemble des valeurs peut être consulté à l'annexe 3.

Les valeurs moyennes d'activité des GSTs sont respectivement de  $0,197 \pm 0,039$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas des témoins, de  $0,227 \pm 0,040$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas des individus non contaminés, de  $0,296 \pm 0,099$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas des individus exposés au congénère n° 77, de  $0,298 \pm 0,091$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas des individus exposés au congénère n° 169 et de  $0,295 \pm 0,0081$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas des individus exposés au mélange des 7 congénères traceurs.

Une analyse statistique basée sur les données présentées à la figure 10 nous apprend que l'activité des GSTs diffère significativement entre les différents traitements (ANOVA unifactorielle à 4 degrés de liberté,  $p = 0,000011$ ). Ainsi, une induction significative (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé,  $p < 0,05$ ) de l'activité des GSTs peut être mise en évidence dans le cas de chacun des contaminants, et ce aussi bien par rapport aux individus témoins qu'aux individus maintenus en boîtes de Petri, mais non contaminés.



**Figure 10 :** Activités des glutathion-S-transférases, exprimées en nmoles/min/μg protéines, chez des individus de l'espèce *G. pulex* exposés à plusieurs contaminants. Les valeurs sont données sous la forme moyenne ± écart-type



**Figure 11 :** Activités des glutathion-S-transferases, exprimées en nmoles/min/μg protéines, chez des individus de l'espèce *G. pulex* prélevés dans différentes rivières de Wallonie. Les valeurs sont données sous la forme moyenne ± écart-type.

Ces derniers montrent également une légère induction par rapport aux témoins, mais cette induction n'est toutefois pas significative (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé,  $p = 0,798$ ).

Enfin, aucune différence significative entre les différents traitements de contamination n'a pu être mise en évidence (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé,  $p > 0,05$ ).

Chez plusieurs espèces d'invertébrés aquatiques, l'activité des GSTs peut être induite non seulement par divers polluants, mais aussi par des variations des conditions du milieu comme la température ou la pression en oxygène dissous (POWER & SHEEHAN, 1996 ; OLSEN *et al.*, 2001 ; CALLAGHAN *et al.*, 2002). Dès lors, il est possible que la légère induction (de l'ordre de 15 %) mesurée chez les individus non contaminés soit le fait des conditions de contamination, et soit causée par le confinement, la promiscuité, la possible diminution de la quantité d'oxygène disponible ou la température, légèrement (de 1 à 5 °C) plus basse que celle de l'élevage.

Cette induction n'est pas particulièrement élevée par rapport à d'autres espèces d'invertébrés d'eau douce. Ainsi, OLSEN *et al.* (2001) rapportent pour *Chironomus riparius* des variations d'activité moyennes de 80 % entre différents sites de référence. CALLAGHAN *et al.* (2002) rapportent, quant à eux, des inductions pouvant aller de 35 à 50 % pour une diminution de la température de 10°C, et de 50 à 70 % pour une diminution de 20 °C.

Pour chacun des contaminants, les valeurs moyennes d'activité sont 30 % plus élevées que chez les individus non contaminés, et 50 % plus élevées que chez les témoins.

MC LOUGHLIN *et al.* (2000) et YIN *et al.* (2001) ont mesuré une induction significative de l'activité des GSTs chez *Gammarus pulex* suite à l'exposition à la perméthrine (insecticide pyréthroïde) et au lindane (pesticide organochloré). Ces inductions sont de l'ordre de 70 % suite à 48 heures d'exposition à une solution aqueuse d'une concentration de 50 µg/L de lindane, et de 30 % suite à 48 heures d'exposition à une solution aqueuse d'une concentration de 0,5 µg/L. À l'inverse, aucune induction n'a pu être mise en évidence suite à l'exposition au LAS (détergent), au pirimiphos methyl (insecticide organophosphoré) ou au zinc.

Chez le diptère *Chironomus riparius*, aucune induction des GSTs n'a pu être mise en évidence que ce soit consécutivement à une exposition au lindane ou au pirimiphos methyl (HIRTHE *et al.*, 2001 ; CALLAGHAN *et al.*, 2002 ; CRANE *et al.*, 2002). Dans la mesure où l'activité des GSTs montre une inductibilité assez marquée en fonction des conditions environnementales, mais semble insensible aux toxiques, ces auteurs émettent de sérieuses réserves sur l'applicabilité de ce biomarqueur chez *Chironomus riparius*.

Chez le bivalve d'eau douce *Sphaerium corneum*, l'exposition au PCB n° 118, au lindane, à la dieldrine ou au benzo[a]pyrène, même sur longues périodes (10-12 jours), n'induit que très faiblement (de l'ordre de 10 à 15 %), voire pas du tout, l'activité des GSTs (BORYSLAWSKYJ *et al.*, 1988 ; MICHEL *et al.*, 1993 ; LOOISE *et al.*, 1996).

Par contre, des inductions de 40 à 50 % ont été mesurées chez le bivalve *Ruditapes decussatus* exposé au 4,4'-DDE ou au methoxychlor (pesticides organochlorés) (HOARAU *et al.*, 2004).

Chez le mollusque dulcaquicole *Lymnaea palustris*, ni l'exposition à l'hexachlorobenzène (fongicide organochloré), ni à l'atrazine (pesticide organochloré) n'ont abouti à des induction

des GSTs. L'atrazine entraîne même une légère inhibition (10-15 %) de l'activité de ces enzymes (BATURO & LAGADIC, 1996).

Chez les crustacés, une induction d'environ 40 % de l'activité des GSTs a été mise en évidence chez le crabe *Carcinus maenas* exposé à la cyperméthrine (insecticide pyréthroïde) (GOWLAND *et al.*, 2002). Une induction des GSTs d'une intensité comparable a été mise en évidence chez l'écrevisse *Procambarus clarkii* exposée au fenitrothion (BIRMELIN *et al.*, 1998). Enfin, chez le cladocère dulcaquicole *Daphnia magna*, une induction pouvant aller jusqu'à 100 à 130 % a été mise en évidence suite à l'exposition à certains phénols polychlorés (PCPs) (LEBLANC *et al.*, 1988).

Ainsi, un certain nombre d'espèces d'invertébrés ne semble pas montrer d'induction des GSTs suite à l'exposition aux xénobiotiques. Toutefois, cette étude montre que les PCBs sont capables d'induire cette activité chez *Gammarus pulex*.

L'induction de l'activité des GSTs pourrait donc constituer un biomarqueur d'exposition aux biphényles polychlorés potentiel, et, qui plus est, relativement sensible pour cette espèce. Cette conclusion va dans le sens de celle de MCLOUGHLIN *et al.* (2000), qui remarquent que l'induction des GSTs est bien plus sensible que, entre autres, l'inhibition de l'acétylcholinestérase ou de l'activité d'alimentation.

Toutefois, un certain nombre de réserves doivent être apportées à cette affirmation. Ainsi, l'induction des GSTs n'est pas spécifique des PCBs uniquement. Elle peut également être induite par d'autres xénobiotiques, comme cela a été évoqué dans les exemples cités plus haut.

De plus, l'induction de l'activité ne dépend pas que de l'exposition aux toxiques. Les conditions environnementales sont susceptibles de jouer un rôle dans cette induction, ce qui peut sérieusement compliquer l'utilisation de cette réponse comme biomarqueur.

Nous allons maintenant nous intéresser aux mesures réalisées sur des individus prélevés dans l'environnement.

## 6.2 : Dosages de l'activité des GSTs sur des individus prélevés dans l'environnement.

Comme cela a déjà été mentionné auparavant, 3 rivières ont été échantillonnées. Il s'agit de la Meuse à Wanze, de l'Ourthe à Angleur et de la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Dans chacun des cas, l'activité des GSTs a été mesurée sur 20 individus. Les résultats de ces dosages sont présentés à la figure 11, et la totalité des valeurs se trouve à l'annexe 3.

Les valeurs moyennes d'activité sont respectivement de  $0,238 \pm 0,048$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas de la Meuse, de  $0,221 \pm 0,045$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas de l'Ourthe et  $0,269 \pm 0,0051$  nmol/min/ $\mu$ g dans le cas de la Vesdre. Les valeurs du Blanc Gravier à Colonster sont celles obtenues lors des dosages précédents sur les gammarus de l'élevage.

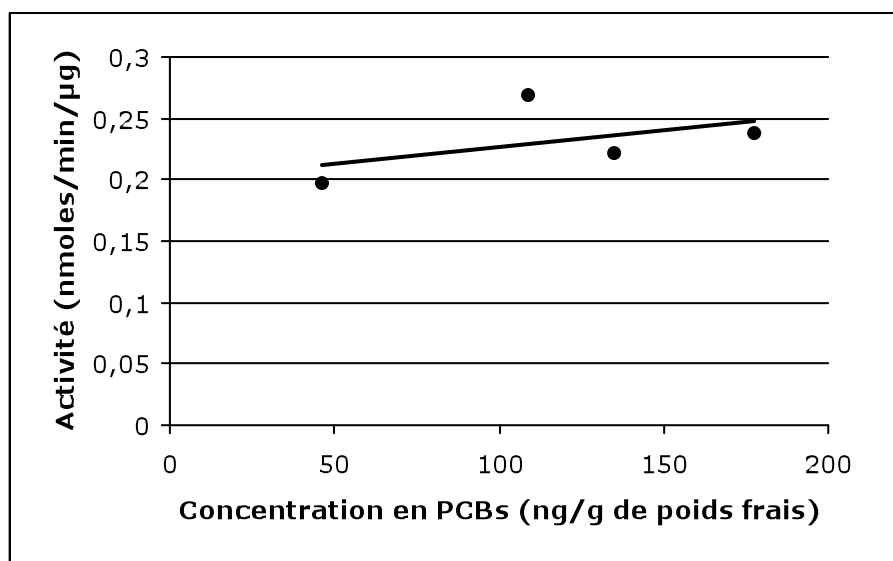
Comme le montre la figure 11, l'activité des GSTs diffère selon la station envisagée. De plus, cette différence est significative (ANOVA unifactorielle à 3 degrés de liberté,  $p = 0,000057$ ).

Une induction de l'activité par rapport aux valeurs du Blanc Gravier, utilisées comme témoin, a pu être mise en évidence dans chacune des 3 autres stations. Cette induction s'élève à 21 % dans le cas de la Vesdre, 12 % dans le cas de l'Ourthe et 36 % dans le cas de la Meuse. L'induction est significative dans le cas de la Vesdre et de la Meuse, mais pas dans le cas de l'Ourthe (ANOVA, Test Post-Hoc de Scheffé, respectivement  $p = 0,044$  pour la Vesdre,  $p = 0,00009$  pour la Meuse et  $p = 0,420$  pour l'Ourthe).

L'utilisation de l'induction des GSTs comme biomarqueur d'exposition dans le cadre d'études *in situ* est rare. Ainsi, aucune étude de ce type n'a, à notre connaissance, été menée chez des invertébrés d'eau douce. Par contre, chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla*, VAN DER OOST *et al.* (1996) sont parvenus à mesurer des inductions de l'ordre de 40 à 60 % chez des individus collectés à des sites fortement pollués (Somme totale des congénères de PCBs de l'ordre de 15000 ng/g de lipides, et contamination importante par des pesticides organochlorés et des HAPs).

Plus récemment, MAYON (2003) a mesuré l'activité des GSTs chez différents individus appartenant à l'espèce *Leuciscus cephalus* (le cheveine) prélevés dans diverses stations de Wallonie, dont la Meuse à Wanze, l'Ourthe à Comblain-la-Tour (station présentant des niveaux de contamination comparables à Angleur dans le cas des poissons) et la Vesdre à Vaux-sous-Chèvremont. Il n'a mesuré aucune différence significative entre ces différentes stations. Le fait que des variations significatives aient pu être mises en évidence entre certaines de ces stations dans le cadre de cette étude suggère que l'induction de l'activité des GSTs pourrait se révéler comme étant un biomarqueur plus sensible dans le cas du gammare que des poissons.

Dans la mesure où un biomarqueur doit répondre d'une manière dose-dépendante au toxique envisagé pour être considéré comme utilisable dans le cas de programmes de biomonitoring (HYNE & MAYER, 2003), nous avons jugé intéressant de tenter d'établir une corrélation entre le taux de contamination des individus prélevés et leur activité GST. Ainsi, la figure 12 illustre les résultats concernant la corrélation entre la teneur en PCBs (somme totale des 27 congénères, exprimée en fonction du poids frais) et l'activité des GSTs.



**Figure 12 :** Relation entre l'activité des GSTs et le niveau de contamination des gammars prélevés dans 4 sites environnementaux.

Comme le montre la figure 12, il existe une corrélation entre l'activité des GSTs et le niveau de contamination par les PCBs ( $r^2 = 0,23$ ). Toutefois, cette corrélation n'est pas significative ( $p = 0,52$ ). Des corrélations non significativement positives ont également été mises en évidence entre l'activité des GSTs et les teneurs en PCBs exprimées sous la forme des sommes de 27 congénères par ng/g de lipides et sous la forme des sommes des 7 congénères traceurs par ng/g de poids frais ou de lipides.

En outre, on remarque que c'est les individus de la Mehaigne à Wanze qui montrent les activités GST les plus élevées, alors qu'ils sont, en dehors des individus provenant du site de référence, les moins contaminés par les PCBs. Toutefois, cette rivière est soumise à une pollution agricole intensive, ainsi qu'à des pollutions accidentelles relativement fréquentes (PHILIPPART & VRANKEN, 1983 ; MAYON, 2003). De plus, des stations situées en amont sur ce cours d'eau sont marquées par des taux de contamination par les dioxines importants (LEROY, 2004 ; THOMÉ *et al.*, 2005). Il est donc vraisemblable que cette rivière présente une contamination par d'autres polluants susceptibles d'induire l'activité des GSTs, ce qui expliquerait les valeurs élevées mesurées à cette station. Un phénomène similaire a en outre été observé en ce qui concerne les activités de l'EROD mesurées chez la chevaine *Leuciscus cephalus* et le goujon *Gobio gobio* (CARABIN, 2003, LEROY, 2004).

Ainsi, si une réponse dose-dépendante de l'induction des GSTs n'a pas pu être mise en évidence dans le cadre de ce mémoire, il serait hâtif de conclure que cette réponse ne peut être utilisée en tant que biomarqueur dans le cadre d'études *in situ*. En effet, il est possible qu'un échantillonnage comprenant un nombre plus importants de stations puisse mettre en évidence un tel type de réponse.

En guise de conclusion, nous pouvons constater donc que l'activité des GSTs chez *Gammarus pulex* constitue un biomarqueur d'exposition aux PCBs potentiel intéressant, qui comporte aussi bien des avantages (inductibilité, sensibilité élevée) que des inconvénients (manque de sélectivité, dépendance de facteurs autre que le toxique, absence de courbe dose-réponse).

## **7. Mise au point de la mesure de l'activité de l'EROD**

Aucun des différents essais de mesure de l'activité EROD chez *Gammarus pulex* n'a abouti à des valeurs utilisables.

Etant donné les variations de fluorescence très faibles, voire nulles, nous n'avons pas jugé utile de présenter les activités associées à ces variations. Le lecteur intéressé trouvera toutefois les valeurs obtenues à l'annexe 4.

Ainsi, aucun des deux protocoles testés ne semble valide pour la mesure de l'activité EROD chez *Gammarus pulex*.

La mesure de l'activité des P450 chez les crustacés est réputée pour être peu aisée, notamment en raison de la présence d'inhibiteurs dans les fractions protéiques réalisées à partir des animaux (JAMES & LITTLE, 1984 ; JAMES & BOYLE, 1998). En effet, l'hépatopancréas des crustacés comporte plusieurs types de cellules, dont certaines sont riches en protéases (PAQUET *et al.*, 1993 ; CORREIA *et al.*, 2002c). Lors de la préparation des fractions protéiques pour la mesure de l'activité des P450, ces protéases pourraient être

libérées et dénaturer sélectivement certaines protéines indispensables à l'activité des monooxygénases, comme la NADPH cytochrome P450 réductase (JAMES & BOYLE, 1998 ; SNYDER, 2000). Le PMSF, utilisé comme inhibiteur de protéases dans le cas présent, n'est actif que vis-à-vis des protéases à sérine active, comme la trypsine ou la chymotrypsine. Il est envisageable que d'autres types de protéases soient présents dans les extraits, et que l'adjonction de PMSF ne soit donc pas suffisante.

Des inhibiteurs non protéasiques de l'activité des P450 existe également. En effet, il a été rapporté, chez *Drosophila melanogaster*, que certains pigments oculaires, dont la xanthommatine, interfèrent de façon négative avec l'activité des P450 (DANIELSON *et al.*, 1995). Il n'est pas impossible que les pigments contenus dans l'œil de *Gammarus pulex* aient une action semblable. Dans la mesure où les expériences ont, dans le cas présent, été menées sur des individus entiers, ce phénomène pourrait constituer une source d'erreur éventuelle.

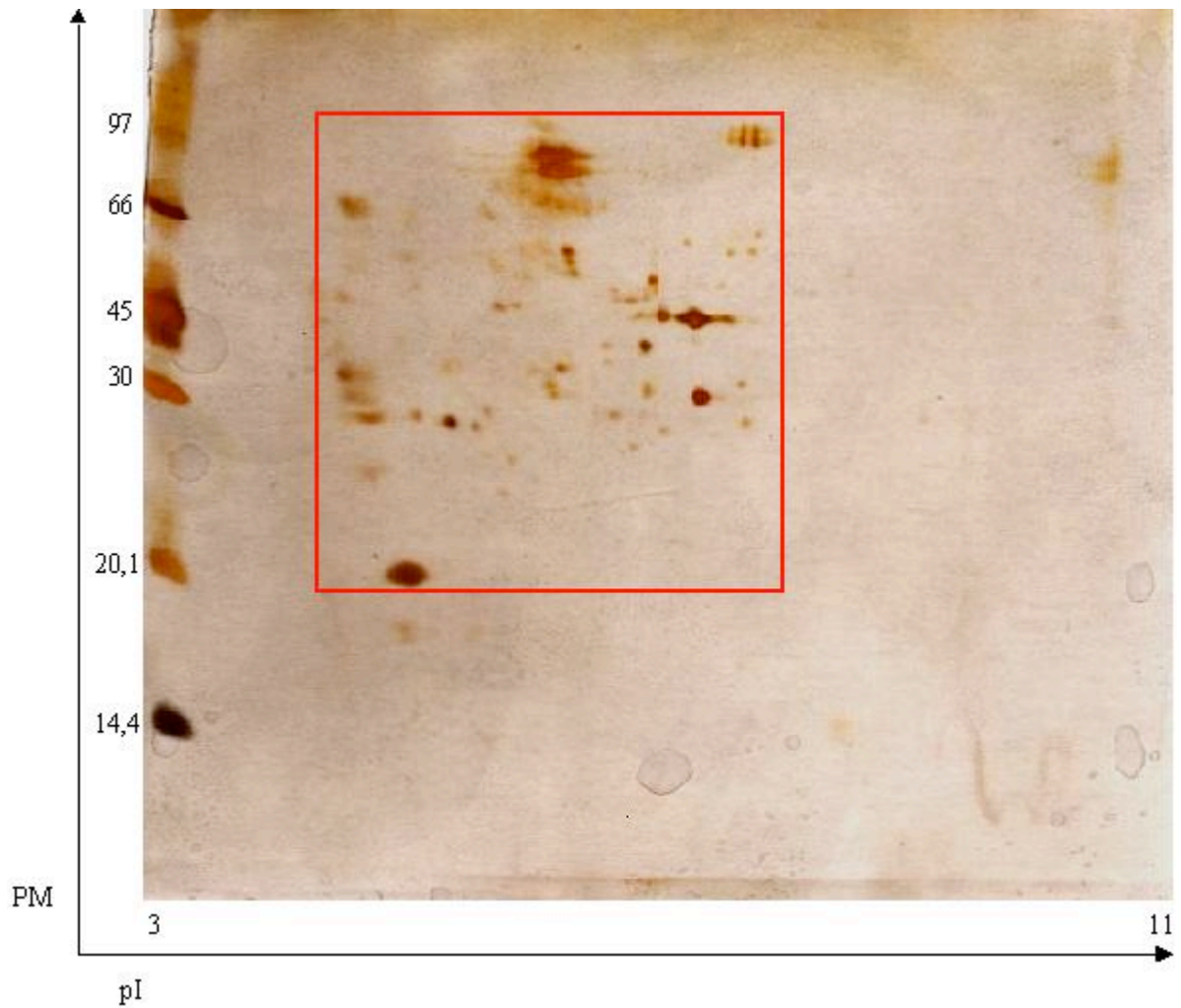
Le protocole de FISHER *et al.* (2003) a été mis au point sur le diptère *Chironomus riparius*. Il a été appliqué avec succès sur cette espèce, et des activités EROD comprises entre 15 et 30 pmoles/min/mg protéines ont été mesurées. De plus, une induction de cette activité a pu être mesurée, aussi après une exposition au phénobarbital (induction d'environ 50 %) qu'à la perméthrine (induction d'environ 150 %) (FISHER *et al.*, 2003). A la lumière des résultats obtenus, il est cependant vraisemblable qu'il ne soit pas adapté à la mesure de l'activité EROD chez *Gammarus pulex*.

Le protocole de KUTLU & SUSUZ (2004), par contre, a été mis au point sur *Gammarus pulex* et a été utilisé avec succès pour mesurer une activité de l'EROD d'environ 60 pmoles/min/mg protéines, ainsi qu'une inhibition de 30 % de l'activité de l'enzyme suite à l'exposition à l'acétate de plomb. Cette inhibition était prévisible, les métaux lourds étant réputés pour inhiber l'action des enzymes (KUTLU & SUSUZ, 2004). Il est surprenant qu'en utilisant ce protocole, aucune activité supérieure n'ait pu être mesurée.

Toutefois, la publication de KUTLU & SUSUZ (2004) reste vague, et ne mentionne notamment pas la concentration en NADPH utilisée ou la concentration en substrat utilisée (ni même la nature de ce substrat). Elle ne contient rien non plus concernant un éventuel inhibiteur de protéases ou sa concentration. De plus, aucun élément ne permet de savoir si ils ont travaillé sur des individus entiers ou non, ou même si les mesures sont fait sur un individu seul, ou sur des fractions réalisées à partir de plusieurs animaux. Aucun élément de réponse supplémentaire n'ayant pu être récolté en tentant de contacter ces auteurs, il est possible que nous ayons mal interprété ce protocole.

HEINEN (2003) a également tenté de mettre au point le dosage de l'activité EROD chez *Gammarus pulex*, aussi bien sur fraction S9 que sur fraction microsomale. Dans le cas des essais sur fraction S9, il a obtenu des valeurs d'activité très faibles (de l'ordre de 0,2 à 0,6 pmoles/min/mg protéines). Toutefois, dans la mesure où ces valeurs sont inférieures aux valeurs fixées comme limites de détection et de quantification par la norme AFNOR NF T90-385 (2001), à savoir 1 pmole/min/mg protéines, et que les essais sur fraction microsomale n'ont pu aboutir à aucune mesure d'activité, il conclut que les activités mesurées sur fraction S9 sont probablement dues à des interférences, et qu'elles ne permettent pas de valider le dosage de l'activité EROD sur *Gammarus pulex* par cette méthode.

Enfin, différentes méthodes permettent d'améliorer les mesures *in vitro* d'activité des monooxygénases chez les crustacés. Ainsi, la présence d'agents oxydants comme



**Figure 13 :** Gel d'électrophorèse bidimensionnelle, coloré au nitrate d'argent, réalisé à partir de gammes témoins. Les différentes bandes verticales accolées au bord gauche du gel correspondent aux protéines du marqueur de poids moléculaire. Les chiffres qui y sont associés représentent, quant à eux, le poids moléculaire (en kDa) de chaque bande. Les limites de l'intervalle de pI sont également indiquées. Il est important de noter que le gradient de pH dans cet intervalle n'est pas linéaire

l'hydroperoxyde de cumène, capable d'oxyder directement les substrats liés au cytochrome P450, en lieu et place du NADPH permet d'obtenir des réponses plus élevées dans certains cas (JAMES, 1989 ; BRICK, 1999). Toutefois, il a été rapporté qu'aucune amélioration notable de l'activité de l'EROD n'est mesurée chez *Gammarus pulex* suite à l'addition de cette substance (HEINEN, 2003).

De plus, dans le cas de l'écrevisse *Procambarus clarkii* le NADH est plus efficace en tant que donneur d'électrons que le NADPH, et son utilisation permet d'obtenir des valeurs d'activité plus élevées (SNYDER, 2000). Il n'est pas exclu que la situation soit similaire chez *G. pulex*, et des essais avec ce cofacteur pourraient s'avérer profitables.

En conclusion, cette étude ne peut être considérée, au même titre que celle de HEINEN (2003), que comme une approche préliminaire. Dans la mesure où nous n'avons pas pu mettre au point le dosage de l'activité EROD chez le gammare, il ne nous est pas possible de conclure quoi que ce soit en ce qui concerne l'intérêt de l'induction de l'activité de cette enzyme en tant que biomarqueur.

## **8. Analyse du protéome par électrophorèse 2D**

*Remarque préliminaire : Comme dans le cas des mesures d'activité des GSTs, il est important de différencier ici, les gammars "témoins", qui proviennent directement de l'élevage, et les gammars "non contaminés" qui ont été maintenus en boîtes de Petri durant 144 heures..*

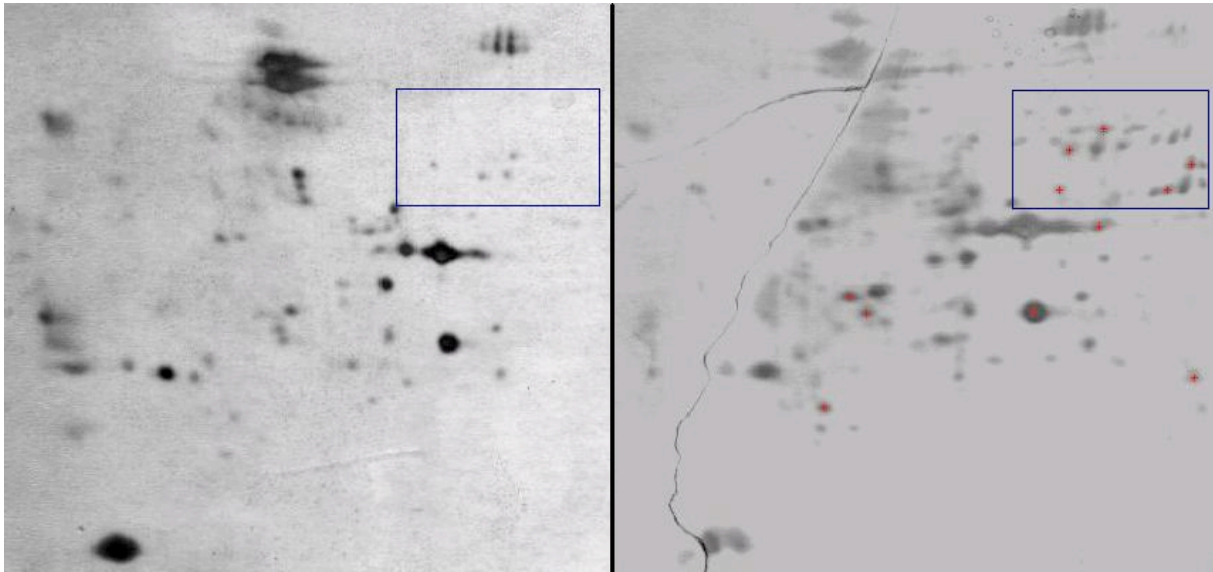
Des gels d'électrophorèse bidimensionnelle ont été réalisés à partir de gammars témoins (provenant de l'élevage), de gammars non contaminés (mais ayant été maintenus durant 144 heures en boîtes de Petri) et de gammars contaminés à l'aide du congénère n° 77, du congénère n° 160 ou d'un mélange des 7 congénères traceurs. Un exemple de gel obtenu grâce à cette technique est présenté à la figure 13.

Comme on peut le voir sur la figure 13, les gels comportent un certain nombre de spots, correspondant chacun à une protéine. La majorité de ces spots sont situés dans la zone encadrée en rouge sur la figure 13, zone à laquelle il sera fait référence par la suite sous le terme "zone d'intérêt". En outre, certains endroits du gel montrent des "taches" qui correspondent à des zones où les protéines ne sont pas complètement séparées, ce qui provoque des densités plus importantes de protéines.

Dans un premier temps, nous allons examiner les différences entre les protéomes des gammars témoins et des gammars non contaminés. Ensuite, nous analyserons les différences entre les individus ayant subi une contamination et ceux qui n'en ont pas subi. Enfin, la valeur et l'intérêt de ces différences seront discutées au point 8.3.

### **8.1 : Comparaison des gammars témoins et des gammars non contaminés**

Les zones d'intérêt des gels réalisés à partir de ces 2 types de gammars sont présentés à la figure 14.



**Figure 14 :** Comparaison des zones d'intérêt des gels réalisés en utilisant des gammars témoins (à gauche) et des gammars non contaminés. Les spots marqués en rouge sur la figure correspondant aux gammars non contaminés sont ceux qui sont surexprimés par rapport aux gammars témoins. Les lignes obliques présentes sur la partie gauche de la figure résultent de cassures accidentelles du gel lors de la coloration

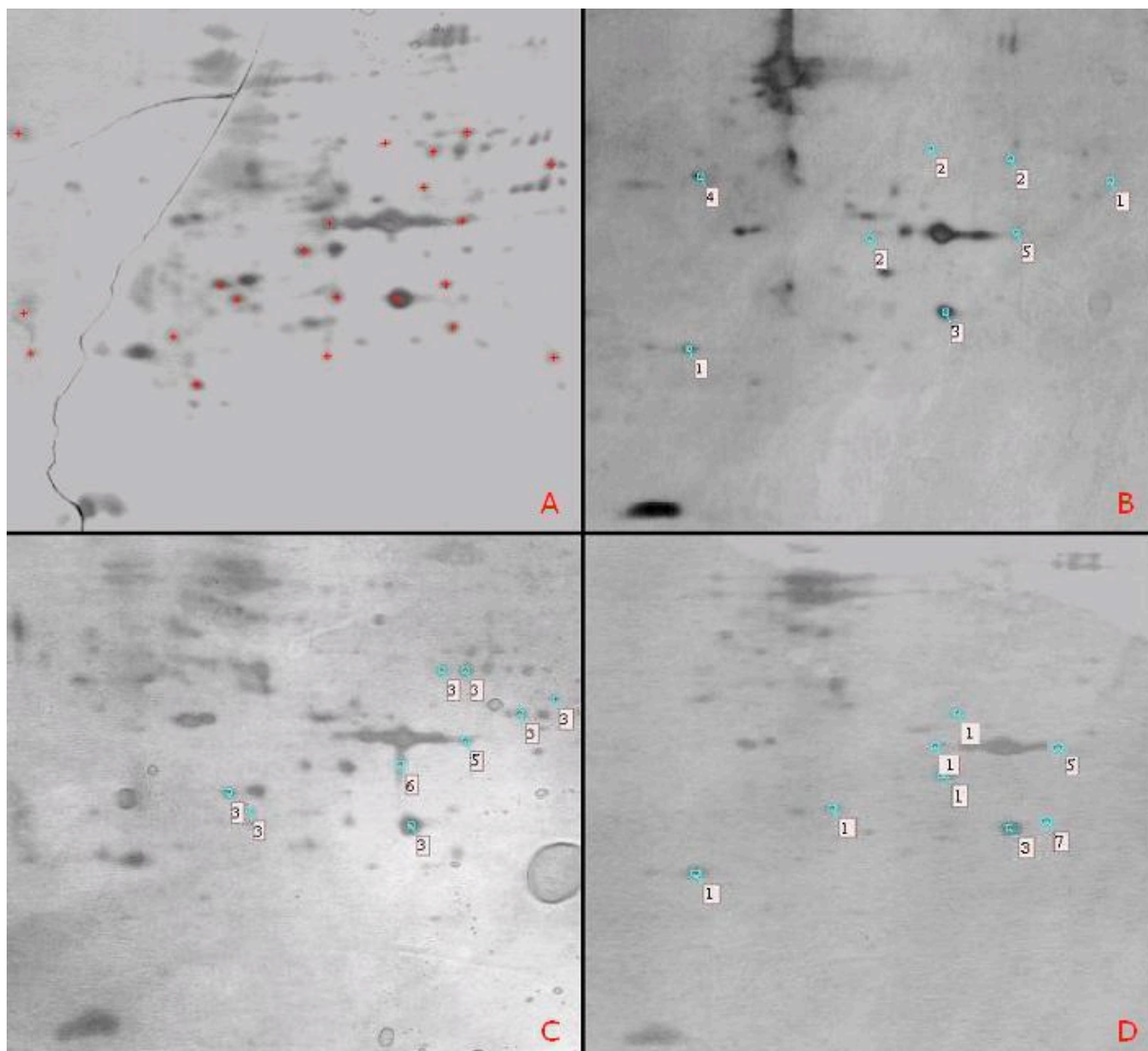
Comme le montre la figure 14, un certain nombre de spots montrent une expression plus intense sur les gels réalisés à partir des gammars non contaminés, mais maintenus en boîte de Petri durant 144 heures.

De plus, un certain nombre de spots sont présents chez les gammars non contaminés mais absents chez les gammars témoins. Ce phénomène est particulièrement marqué dans le cas de la zone encadrée en bleu sur la figure 14, qui comporte un nombre nettement plus faible de spots sur le gel réalisé à partir des individus témoins.

## 8.2 : Comparaison des gammars contaminés et des gammars non contaminés

Les gels d'électrophorèse réalisés à partir de l'extrait protéique des gammars contaminés à l'aide de différents congénères de PCBs, dont les zones d'intérêt sont présentées à la figure 15, ont été comparés à ceux réalisés à partir des individus témoins et des individus non contaminés. Ces comparaisons ont mis en évidence un certain nombre de différences. Dans ce cas, la situation est nettement plus compliquée qu'au point 8.2.

Ainsi, comme on peut l'observer sur la figure 15, un grand nombre de spots (annotés "1" sur la figure) sont sous-exprimés chez les individus contaminés par rapport aux individus non contaminés. Parmi ceux-ci, un spot (annoté "5" sur la figure 15) est absent du gel réalisé sur les individus témoins, mais présent chez tous les contaminés, chez qui il montre toutefois une sous-expression par rapport aux non contaminés.



**Figure 15 :** Zones d'intérêt des gels réalisés à partir de gammare non contaminés (A) et contaminés au PCB n° 77 (B), au PCB n° 169 (C) et aux 7 congénères traceurs (D).

Les spots présentant des différences d'expression entre les différents traitements sont ceux marqués d'une croix rouge sur le gel correspondant aux gammare non contaminés.

Les annotations des spots sur les gels correspondants aux gammare contaminés signifient respectivement : **1** : Spot sous-exprimé par rapport aux gammare non contaminés ; **2** : Spot absent de tous les gels réalisés à partir de gammare contaminés et témoins, mais présent chez les gammare non contaminés ; **3** : Spot sur-exprimé par rapport aux gammare témoins, mais pas par rapport aux gammare non contaminés ; **4** : Spot sur-exprimé dans le gel considéré par rapport à tous les autres traitements ; **5** : Spot sous-exprimé par rapport aux gammare non contaminés, et absent chez les gammare témoins ; **6** : Spot présent dans le gel considéré uniquement ; **7** : Spot absent dans le gel considéré uniquement.

Certains spots ("3" sur la figure 15) sont surexprimés par rapport aux gammares témoins dans tous les traitements de contamination. Toutefois, aucun de ces spots ne montre de différence d'expression entre contaminés et non contaminés.

De plus, certains spots ("2" sur la figure 15) sont absents de tous les traitements de contamination et du témoin, mais sont présents sur les gels réalisés à partir de gammares non contaminés.

Un seul spot est présent dans tous les gels sauf celui réalisé à partir de gammares contaminés aux 7 traceurs ("7" sur la figure 15). De même, un seul spot est absent de tous les traitements sauf la contamination au congénère n° 169 ("6" sur la figure 15). Enfin, un spot ("4" sur la figure 15) est surexprimé chez les individus contaminés au congénère n° 77 par rapport à tous les autres traitements.

### 8.3 : Discussion

D'une manière générale, on constate que, si les différences entre témoins et individus maintenus en boîte de Petri sont relativement marquées, les variations entre individus contaminés et non contaminés le sont moins. Ainsi, aucune sur- ou sous-expression protéique vraiment marquée n'a pu être mise en évidence entre les traitements de contamination et celui où les individus n'ont pas été exposés aux PCBs.

Il est primordial de signaler ici que, lors de l'utilisation de techniques telles que l'électrophorèse bidimensionnelle, la variabilité entre les gels obtenus à partir d'extraits du même type est parfois importante.

Dans la mesure où, dans le cadre de ce mémoire, un seul gel a pu être réalisé pour chaque condition envisagée, il peut dès lors s'avérer hasardeux d'avancer des conclusions catégoriques.

Ainsi, si on peut envisager l'hypothèse que les différences entre individus témoins et non contaminés sont imputables aux conditions du séjour en boîte de Petri (promiscuité accrue, confinement, intensité lumineuse plus importante, possible anoxie,...) et aux différents stress associés à ces conditions, ou encore que les différences entre individus contaminés et non contaminés sont le fait de l'exposition aux PCBs, on ne peut en aucun cas l'affirmer.

En fait, le point le plus intéressant de ces analyses protéomiques, dans la mesure où ce travail constitue une étude préliminaire, est sans doute le fait que nous ayons réussi à obtenir à partir de gammares des gels de qualité relativement bonne et potentiellement utilisables pour les étapes ultérieures du processus (excision et identification des protéines). Il est probable qu'en affinant la technique utilisée et en multipliant les répétitions, des résultats plus intéressants puissent être mis en évidence.

## VI. Conclusions & Perspectives

Le but de ce travail était de mettre en évidence des biomarqueurs d'exposition aux PCBs potentiels chez le crustacé dulcaquicole *Gammarus pulex*.

Dans cette optique, nous avons mis au point un dispositif de contamination. Celui-ci s'est révélé relativement facile à mettre en place, et il allie une mortalité acceptable à une accumulation importante des toxiques chez les animaux. Il semble donc adéquat pour le type d'expériences envisagées dans le cadre de ce mémoire.

Les dosages de PCBs dans les gammars provenant des différents sites envisagés ont confirmé l'intérêt de ces stations comme site de référence dans le cas du Blanc Gravier ou comme sites pollués dans le cas de la Vesdre, de l'Ourthe ou de la Mehaigne.

L'induction de l'activité des GSTs semble en outre être un biomarqueur d'exposition intéressant. En effet, cette induction a pu être mise en évidence aussi bien chez des individus contaminés en laboratoire que chez des individus prélevés dans différents sites pollués, après que les conditions optimales de la mesure de cette activité chez *Gammarus pulex* aient été déterminées.

Ainsi, si MAYON (2003) a conclu que, chez la chevaine *Leuciscus cephalus*, l'activité des GSTs ne constitue pas un biomarqueur suffisamment sensible pour être intéressant, notre étude tend à montrer que, dans le cas de *Gammarus pulex*, cette réponse montre un intérêt certain dans le cadre d'études écotoxicologiques.

Toutefois, ce biomarqueur potentiel a aussi certains défauts, comme son manque de spécificité et sa variabilité en fonction des conditions environnementales. Avant de pouvoir affirmer que l'induction des GSTs peut servir de biomarqueur d'exposition aux PCBs chez *Gammarus pulex*, d'autres études sont nécessaires, notamment pour évaluer le taux de variabilité non imputable aux toxiques de cette réponse, ainsi que pour tenter d'établir une courbe dose-réponse.

Il est difficile d'arriver à une conclusion en ce qui concerne la valeur de l'activité EROD comme biomarqueur d'exposition aux PCBs chez *Gammarus pulex*.

En effet, il semble, dans la mesure où aucune activité n'a pu être mesurée, que les techniques utilisées dans le cadre de ce mémoire ne soient pas applicables. Néanmoins, dans la mesure où l'activité EROD constitue un des biomarqueurs d'expositions aux PCBs les plus sensibles, certains essais mériteraient d'être effectués, notamment en ce qui concerne les mesures d'activité en utilisant le NADH comme cofacteur, ou en utilisant un cocktail d'inhibiteurs de protéases lors de la préparation des extraits..

Il est néanmoins possible que l'enzyme choisie ne soit pas appropriée. En effet, si le système des P450 existe bel et bien chez les crustacés, rien ne prouve, à l'heure actuelle, que les activités monooxygénasiques supportées par ce système le soient par les mêmes isoenzymes dans le cas des crustacés que dans le cas des vertébrés aquatiques, ou même de certains autres invertébrés (JAMES & BOYLE, 1998 ; LIVINGSTONE, 1998).

Ainsi, peut-être l'activité du CYP1A1 pourrait-elle, dans le cas de *Gammarus pulex*, être caractérisée par l'activité d'une isoenzyme autre que l'EROD. Toutefois, la connaissance actuelle du système des P450 chez cette espèce (et même chez les crustacés en général) est limitée, et il serait peut-être plus profitable de se consacrer à d'autres moyens de mettre en

évidence l'induction de ces enzymes. Des mesures directes de la concentration protéines de type P450 chez des individus traités et non traités, par exemple, pourraient être mises en œuvre.

De même, il a été montré chez *Daphnia magna* que l'induction des P450 peut être mise en évidence par l'évaluation de l'impact de ces enzymes sur les voies métaboliques des hormones stéroïdes. Ainsi, en administrant de la 2 $\alpha$ -[<sup>14</sup>C]hydroxytestostérone à des daphnies et en mesurant l'apparition dans le milieu des différents métabolites de ce composé, des différences significatives ont pu être mises en évidence entre des individus témoins et des individus traités au phénobarbital et au malathion, composés inducteurs des P450 (BALDWIN & LEBLANC, 1994a). Il n'est pas impossible que cette technique soit transposable chez *Gammarus pulex* dans le cas des PCBs.

L'analyse du protéome de gammares témoins et contaminés par électrophorèse bidimensionnelles sur gel de polyacrylamide n'a pas permis, dans le cadre de cette étude, de mettre en évidence des biomarqueurs d'exposition potentiels. Ceci est principalement dû au fait qu'un seul gel a pu être réalisé pour chaque traitement. La variabilité des résultats obtenus par ces méthodes étant parfois élevée, il ne nous a pas été possible de conclure que les changements observés sont le fait de l'action des toxiques.

Toutefois, les techniques utilisées ont permis d'obtenir des gels d'une qualité acceptable, et utilisables pour l'identification des protéines. Il est donc possible qu'en affinant ces techniques et en réalisant un nombre plus élevés de répétitions, des différences d'expression plus marquées puissent être remarquées, et qu'elles puissent être reliées à l'action des toxiques.

Enfin, l'utilisation de techniques protéomiques quantitatives comme la 2D DIGE (Two Dimension Differential In-Gel Electrophoresis), qui permettent de faire migrer simultanément sur un même gel deux échantillons couplés à des marqueurs fluorescents différents, et d'éliminer ainsi la variabilité inter-gels, pourrait également se révéler intéressante dans le cas de l'identification de biomarqueurs potentiels chez *Gammarus pulex*.

## VII. Bibliographie

ACETO A., DI ILIO C., BUCCIARELLI T., PANTANI C., DELL'AGATA M., PANNUNZIO G. & FEDERICI G., 1991 : Characterization of glutathione transferase from *Gammarus italicus*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 99 (3) : 523-552.

ADEWALE I.O. & AFOLAYAN A., 2005 : Organ distribution and kinetics of Glutathione transferase from African river prawn, *Macrobrachium vollehovenii* (Herklots). *Aquatic toxicology*, 71 : 193-202.

ACHAZI R.K., FLENNER C., LIVINGSTONE D., PETERS L.D., SCHAUB K. & SCHEIWE E., 1998 : Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 121 : 339-350.

AKCHA F., IZUEL C., VENIER P., BUDZINSKI H., BURGEOT T. & NARBONNE J.-F., 2000 : Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49: 269-287.

ANDERSON T.D. & YAN ZHU K., 2004 : Synergistic and antagonistic effects of atrazine on the toxicity of organophosphorodithioate and organophosphorothioate insecticides to *Chironomus tentans* (Diptera : Chironomidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 80 (1) : 54-64.

ANDERSON T.D. & LYDY M.J., 2002 : Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (7) : 1507-1514.

BALABASKARAN S., CHEW S. & SEGARAN M., 1986 : Studies on glutathione-S-transferase in molluscs. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 85 (1) : 183-192.

BALDWIN W.S. & LEBLANC G.A., 1994a : Identification of multiple steroid hydroxylases in *Daphnia magna* and their modulation by xenobiotics. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (7) : 1013-1021.

BALDWIN W.S. & LEBLANC G.A., 1994b : In vivo biotransformation of testosterone by phase I and II detoxication enzymes and their modulation by 20-hydroxyecdysone in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 29 : 103-117.

BALLSCHMITTER K. & ZELL M., 1980 : Analysis of PCB by glass capillary gas chromatography : composition of technical Aroclor- and Clophen-PCB mixtures. *Fres. Z. Anal. Chem.*, 302 : 20-31.

BANDARA L.R., KENNEDY S., 2002 : Toxicoproteomics – A new preclinical tool. *Drug Discovery Today*, 7 (7) : 411-418.

BARATA C., PORTE C. & BAIRD D.J., 2004 : Experimental Designs to Assess Endocrine Disrupting Effects in Invertebrates : A Review. *Ecotoxicology*, 13 : 511-517.

BARNES R.D., 1974 : Invertebrate zoology – 3<sup>rd</sup> edition. Saunders, Philadelphie, USA, 870 pp.

BATURO W. & LAGADIC L., 1996 : Benzo[a]pyrene hydroxylase and glutathione-S-transferase activities as biomarkers in *Lymnaea palustris* (mollusca, gastropoda) exposed to atrazine and

BORLAKOGLU J.-T. & KICKUTH R., 1990 : Behavioural changes in *Gammarus pulex* and its significance in toxicity assessment of very low levels of environmental pollutants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 45 : 258-265.

BORYSLAWSKYJ M., GARROOD A.C., PEARSON J.T. & WOODHEAD D., 1988 : Elevation of glutathione-S-transferase activity as a stress response to organochlorine compounds, in the freshwater mussel *Sphaerium corneum*. *Mar. Environ. Res.*, 24 : 101-108.

BOSCH V., 2003 : Impact d'une contamination par des xénobiotiques (PCBs et atrazine) sur le comportement locomoteur et sur l'activité d'un biomarqueur d'exposition (EROD) chez *Carassius auratus*, Linnaeus, 1758. Mémoire de fin d'études en biologie animale, Université de Liège, 60 pp.

BRADFORD M., 1976 : A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248-254.

BRICK D., 1999 : Effet d'insecticides organophosphorés et des PCBs sur l'activité de l'acétylcholinesterase musculaire, les monooxygénases à cytochrome P450 et l'ultrastructure de la glande digestive de *Pacifastacus leniusculus*. Mémoire de fin d'études en biologie animale. Université de Liège. 53 p.

BURKE M.D. & MAYER R. T., 1974 : Ethoxyresorufin: Direct fluorimetric assay of a microsomal o-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug metabolism and disposition*, 2 (6) : 583-588.

CALLAGHAN A., FISHER T.C., GROSSO A., HOLLOWAY G.J. & CRANE M., 2002 : Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical markers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52 (2) : 128-133.

CALLAGHAN A., HIRTHE G., FISHER T. & CRANE M., 2001 : Effect of short-term exposure to Chlorpyrifos on developmental parameters and biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50 (1) : 19-24.

CARABIN O., 2003 : Niveaux de contamination par les PCBs du chevaie (*Leuciscus cephalus* Linné, 1758) dans les rivières wallonnes : validation de la monooxygénase hépatique EROD (éthoxyrésorufine-O-dééthylase) comme biomarqueur d'exposition. Mémoire de fin d'études en biologie animale, Université de Liège, 56 pp.

CELLIER N., 2004 : Etude comparative de la cytotoxicité de composés polychlorés et polybromés sur le système immunitaire humain. Mémoire de fin d'études en sciences biomédicales, Université de Liège, 57 pp.

CHEAH D.M.Y., WRIGHT P.F.A., HOLDWAY D.A. & AHOKAS J.T., 1995 : *Octopus pallidus* cytochrome P-450: characterisation and induction studies with  $\beta$ -naphthoflavone and Aroclor 1254. *Aquatic Toxicology*, 33 : 201-214.

CHOI J., ROCHE H. & CAQUET T., 1999 : Characterization of superoxide dismutase activity in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera, Chironomidae) larvae – a potential biomarker. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 124 (1) : 73-81.

CHOI J., ROCHE H. & CAQUET T., 2001 : Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera : Chironomidae) larvae. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 130 :11-17.

CHUNG Y.W., NUNEZ A.A & CLEMENS L.G., 2001 : Effects of neonatal PCB exposure on female sexual behavior. *Physiology & Behavior*, 74 : 363-370.

COLD A. & FORBES V.E., 2004 : Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic toxicology*, 67 (3) : 287-299.

COLES G.C., 1969 : Isoenzymes of snail livers – 1. Hydrolysing enzymes and peroxidase. *Comp. Bioch. Physiol.*, 29 (1) : 403-411.

CONNOR R., DEWHURST R.E., CRANE M. & CALLAGHAN A., 2003 : Haem peroxidase activity in *Daphnia magna*: A biomarker for sub-lethal toxicity assessments of kerosene-contaminated groundwater. *Ecotoxicology*, 12 (5) : 387-395.

CORREIA A.D., COSTA M.H., LUIS O.J., LIVINGSTONE D.R., 2003 : Age-Related Changes in Antioxidant Enzyme Activities, Fatty Acid Composition and Lipid Peroxidation in whole body *Gammarus locusta* (Crustacea : Amphipoda). *Journ. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 289 : 83-101.

CORREIA A.D., LIMA G., COSTA M.H., LIVINGSTONE D.R., 2002a : Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod *Gammarus locusta* (Crustacea): I. Induction of metallothionein and lipid peroxidation. *Biomarkers*, 7 (5) : 422-437.

CORREIA A.D., LIVINGSTONE D.R. & COSTA M.H., 2002b : Effects of Water-Borne Copper on Metallothionein and Lipid Peroxidation in the Marine Amphipod *Gammarus locusta*. *Marine Environmental Research*, 54 : 357-360.

CORREIA A.D., PEREIRA A.L., COSTA M.H. & CARRAPIÇO F., 2002c : Functional anatomy of the midgut gland of *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 82 : 201-204.

COSTA F.O., NEUPARTH T., CORREIA A.D. & COSTA M.H., 2005 : Multi-Level Assessment of Chronic Toxicity of Estuarine Sediments with the Amphipod *Gammarus locusta* : II. Organism and Population-level Endpoints. *Marine Environmental Research*, 60 : 93-110.

CRANE M., DELANEY P., WATSON S., PARKER C. & WALKER C., 1995 : The effect of Malathion 60 on *Gammarus Pulex* (L.) below watercress beds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (7) : 1181-1188.

CRANE M., ATTWOOD C., SHEAHAN D. & MORRIS S.,1999 : Toxicity and bioavailability of the organophosphorus insecticide pirimiphos methyl to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* L. in laboratory and mesocosm systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 (7) : 1456-1461.

CRANE M., HIGMAN M., OLSEN T., SIMPSON P, CALLAGHAN A., FISHER T. & KHEIR R., 2000 : An *in situ* system for exposing aquatic invertebrates to contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (11) : 2715-2719.

CRANE M., SILDANCHANDRA W., KHEIR R. & CALLAGHAN A., 2002 : Relationship between biomarker activity and development endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53 (3) : 361-369.

CUARTERO-DIAZ G., 2003 : Etude des potentialités d'utilisation de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacé Amphipode) comme biomarqueur moléculaire. Mémoire de fin d'études en agronomie des eaux et forêts, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, 72 pp.

CZECH P., WEBER K. & DIETRICH D.R., 2001 : Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquatic Toxicology*, 53 (2) : 103-114.

DANIELSON P.B., LETMAN J.A. & FOGLEMAN J.C., 1995 : Alkaloïd metabolism by cytochrome P-450 enzymes in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Bioch. Physiol. B*, 110 (4) : 683-688.

DANNAU, M., LEENEARS, L., GASPAR, C. & HAUBRUGE, E. (2001). Première évaluation de la présence de substances polluantes dans l'air sur le territoire wallon par la méthode des biomarqueurs d'exposition dans le cadre du suivi de l'Etat de l'Environnement Wallon. Convention de recherche, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux. 45 pp.

DARBY P.C., GALLAGHER E.P. & DI GIULIO R.T., 1993 : Glutathione enzymes, glutathione content and *t*-butyl hydroperoxyde induced lipid peroxidation in the gill and digestive gland of the estuarine clam, *Rangia cuneata*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 106 (3) : 809-814.

DEBIER C., 2001 : A study of the dynamics of Vitamin A, vitamin E and PCBs in seals during lactation. Thèse de doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique, Université Catholique de Louvain, 311 pp.

DEN BESTEN P.J., 1990 : Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens*. *Aquatic Toxicology*, 20 : 95-110.

DEN BESTEN P.J. & GERRITSEN A.A.M., 2002 : Endocrine disruption in Invertebrates : examples of masculinisation ? *Comp. Bioch. Physiol. A*, 132 : S4, abstract n° A.1-11.

DIERICKX P.J., 1987 : Soluble glutathione transferases in *Daphnia magna* Strauss and their interaction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1,4-benzoquinone. *Insect biochemistry*, 17 (1) : 1-6.

DONATO M.T., GOMEZ-LECHON M.J. & CASTELL J.V. :1993 : A microassay for measuring cytochrome P450 1A1 and P450 2B1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plate. *Analytical Biochemistry*, 213 : 29-33.

ECKWERT H. & KÖHLER H.-R., 1997 : The indicative value of the HSP70 stress response as a marker for metal effects in *Oniscus asellus* (Isopoda) field populations : variability between populations from metal-polluted and uncontaminated sites. *Applied Soil Ecology*, 6 (3) : 275-282.

ESCARTIN E. & PORTE C., 1996b : Bioaccumulation, metabolism and biochemical effects of the organophosphorus pesticide fenitrothion in *Procambarus clarkii*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (6) : 915-920.

FISHER T. & CALLAGHAN A., 1998 : Standard operating procedures of enzyme activity assays and protein assays for use with III and IV instar larvae of *Chironomus riparius*. NERC/EA, 45 pp.

FISHER T., CRANE M. & CALLAGHAN A., 2003 : Induction of cytochrome P-450 activity in individual *Chironomus riparius* Meigen larvae exposed to xenobiotics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54 (1) : pp 1-6. TC papier

FLAMMARION P. (2000). Mesure d'un biomarqueur de pollution chez des poissons d'eau douce : Validation et optimisation. Cemagref, Lyon, France, 126p.

FORCELLA M., BERRA E., GIACCHINI R., HANOZET G.M. & PARENTI P., 2004 : Changes in leucine transport activity in *Chironomus riparius* larvae after short-term exposure to potassium dichromate and fenitrothion. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 55 (2) : 90-101.

FORD A.T., FERNANDES T.F., RIDER S.A., READ P.A., ROBINSON C.D. & DAVIES I.M., 2004 : Endocrine Disruption in a Marine Amphipod ? Field Observations of Intersexuality and Demasculinisation. *Marine Environmental Research*, 58 : 169-173.

GAGNÉ F., BLAISE C. & PELLERIN J., 2005 : Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus* sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research*, 98 (1) : 89-99.

GEORGE S., CHIPMAN K., FEY S., MOSE-LARSON P. & TOM M., 2003 : A genomic and proteomic approach to develop toxicologically predictive gene sets for assessment of fish health in polluted environments. Plenary Lecture, 22<sup>nd</sup> ESCPB meeting : Biological effects of pollutants : The role of environmental proteomics and genomics, Alessandria, Italy, Dec. 14-18, 2003.

GLEDHILL D., SUTCLIFFE D.N. & WILLIAMS W.D., 1993 : British freshwater crustacea malacostraca: A key with ecological notes. Freshwater Biological Association, 176 pp.

GRAÇA M.A.S., MALTBY L. & CALOW P., 1994a : Comparative ecology of *Gammarus Pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.). I : population dynamics and microdistribution. *Hydrobiologia*, 281 : 155-162.

GRAÇA M.A.S., MALTBY L. & CALOW, P., 1994b : Comparative ecology of *Gammarus Pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.). II : fungal preferences. *Hydrobiologia*, 281 : 163-170.

GRAYMORE M., STAGNITTI F. & ALLINSON G., 2001 : Impact of atrazine on aquatic ecosystems. *Environment International*, 26 : 483-495.

GREEN D.W.J., WILLIAMS K.A., HUGHES D.R.L., SHAIK G.A.R. & PASCOE D., 1988 : Toxicity of phenol to *Asellus aquaticus* (L.) – Effects of temperature and episodic exposure. *Water Research*, 22 (2) : 225-231.

GREENLEE W.F. & POLAND A., 1978 : An improved assay of 7-ethoxycoumarin-O-deethylase activity: induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Exp Ther.*, 205 : 596-605.

GRIGOR'EVA G.M., 1973 : Propionylcholinesterase in the nervous ganglia of the fresh-water pulmonate mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Comp. Bioch. Physiol. A*, 44 (4) : 1341-1352.

Gowland B.T.G., Moffat C.F., Stagg R.M., Houlihan D.F. & DAVIES I.M., 2002 : Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar. Environ. Res.*, 54 : 169-177.

HABIG W.H., PABST M.J. & JAKOBY W., 1974 : Glutathione-S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249 : 7130-7139.

HAHN T., SCHENK K. & SCHULZ R., 2002 : Environmental chemicals with known endocrine potential affect yolk protein content in the aquatic insect *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*, 120 : 525-528.

HAHN M.E., 2002 : Aryl hydrocarbone receptors: diversity and evolution. *Chemico-Biological Interactions*, 141 : 131-160.

HEINEN O., 2003 : Evaluation de la qualité écologique des eaux de la Berwinne par des indicateurs biologiques et des biomarqueurs moléculaires d'exposition chez *Gammarus pulex* (Linné) et *Gammarus fossarum* (Koch) (crustacés amphipodes). Mémoire de fin d'études en biologie animale, Université de Liège, 53 pp.

HIRTHER G., FISHER T.C., CRANE M. & CALLAGHAN A., 2001 : Short-term exposure to sub-lethal doses of lindane affects developmental parameters in *Chironomus riparius* Meigen, but has no effect on larval glutathione-S-transferase activity. *Chemosphere*, 44 (4) : 583-589.

HOARAU P., GARELLO G., GNASSIA-BARELLI M., ROMÉO M. & GIRARD J.-P., 2004 : Effect of three xenobiotic compounds on Glutathione-S-Transferase in the clam *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Toxicology*, 68 : 87-94.

HOFFMANN J., 1963 : Faune des amphipodes du Grand-Duché du Luxembourg. *Archives Inst. Grand-Ducal Luxembourg.*, 29, 78-128.

HOGSTRAND C., BALESARIA S. & GLOVER C.N., 2002 : Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comp. Bioch. Physiol. B*, 133 (4) : 523-535.

HONG J.Y. & YANG C.S., 1997 : Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 105: 759-762.

HUANG Q. & HONG C., 2002 : Aqueous solubilities of non-ortho and mono-ortho PCBs at four temperatures. *Water research*, 36 : 3543-3552.

HUGLA J.-L., 1994 : Dynamique de transfert des biphenyles polychlorés (PCB) chez le barbeau (*Barbus barbus*) et analyse des risques écotoxicologiques pour les populations

naturelles : influence sur la reproduction et les fonctions hépatiques. Thèse de doctorat en sciences zoologiques, Université de Liège, 197 pp.

HUGLA J.-L., PHILIPPART J.-C., KREMERS P., GOFFINET G. & THOMÉ J.-P., 1995 : PCB contamination of the common barbel, *Barbus barbus* (Pisces, Cyprinidae), in the river Meuse in relation to hepatic monooxygenase activity and ultrastructural liver change. *Netherlands Journal of Aquatic Ecology*, 29 (1), 135-145.

HUGLA J.-L. & THOMÉ J.-P., 1999 : Effects of PCBs on liver ultrastructure, hepatic monooxygenases, and reproductive success in the barbel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42 : 265-273.

HUTZINGER O., SAFE S. & ZITKO V., 1974 : The chemistry of PCB's. CRC Press, Boca Raton, USA, 269 pp.

HUUSKONEN S.E., RISTOLA T.E., TUVIKENE A., HAHN M.E., KUKKONEN J.V.K. & LINDSTRÖM-SEPPÄ P., 1998 : Comparison of two bioassays, a fish liver cell line (PLHC-1) and a midge (*Chironomus riparius*), in monitoring freshwater sediments. *Aquatic Toxicology*, 44 (2) : 47-67.

HWANG H., FISHER S.W. & LANDRUM P.F., 2001 : Identifying body residues of HCBP associated with 10-day mortality and partial life cycle effects in the midge, *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology*, 52 (4) : 251-267.

HYNE R.V. & MAHER W.A., 2003 : Invertebrate Biomarkers : Links to Toxicosis that Predict Population Decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54 : 366-374.

JAMES M.O. & BOYLE S.M., 1998 : Cytochromes P450 in crustacea. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 121 : 157-172.

JAMES M.O. & LITTLE P.J., 1984 : 3-Methylcholanthrene does not induce *in vitro* xenobiotic metabolism in spiny lobster Hepatopancreas, or affect *in vivo* disposition of Benzo(a)Pyrene. *Com. Biochem. Physiol. C*, 78 (1), 241-245.

JAMES M.O., 1989 : Cytochrome P450 monooxygenases in crustaceans. *Xenobiotica*, 19 (10) : 1063-1076.

JAMES M.O., 1990 : Isolation of cytochrome P450 from Hepatopancreas microsomes of spiny lobster, *Panulirus argus*, and determination of catalytic activity with NADPH cytochrome P450 reductase from vertebrate liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 282 (1) : 8-17.

JENSEN S., 1966 : Report of a new chemical hazard. *New Scientist* 32 : 162.

JENSEN, S., RENBERG, L. & OLSSON, M., 1972 : PCB contamination from boat bottom paint and levels of PCB in plankton outside a polluted area. *Nature (London)*, 240 : 358-360.

JEWELL C.S.E. & WINSTON G.W., 1989 : Characterization of the microsomal mixed-function oxygenase system of the hepatopancreas and green gland of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Com. Biochem. Physiol. B*, 92 (20) : 329-339.

JHA A.N., 2004 : Genotoxicological studies in aquatic organisms : an overview. *Mut. Res. – Fund. Mol. Mech. Mutag.*, 552 (1) : 1-17.

JOHNSON W.W. & FINLEY M.T., 1980 : Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Summaries of toxicity tests conducted at Columbia National Fisheries Research Laboratory, 1965-78. *U.S. Fisheries & Wildlife Service Resources Publ.*, 137 : 98 pp.

JOKANOVIĆ M., 2001 : Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*, 166 : 139-160.

JUMEL A. & LAGADIC L. : Cholinesterase activity as a biomarker of exposure to temephos in *Chironomus* sp. and *Nereis* (Hediste) *diversicolor* in Morbihan (Brittany, France) coastal wetlands. X<sup>th</sup> International Symposium on Cholinergic Mechanisms, Abstract n°46.

JURCHENKO O.P., VULFIUS C.A. & ZEIMAL E.V., 1973 : Cholinesterase activity of ganglia of gastropoda, *Lymnaea stagnalis* and *Planorbis corneus* – 1. Effect of anti-cholinesterase agents on giant neurone depolarization by acetylcholine and its analogues. *Comp. Bioch. Physiol. A*, 45 (1) : 45-60.

KAPLAN D.L. & HARTENSTEIN R., 1978 : Studies on monooxygenases and dioxygenases in soil macroinvertebrates and bacterial isolates from the gut of the terrestrial isopod, *Oniscus asellus* (L.). *Comp. Bioch. Physiol. B*, 60 (1) : 47-50.

KAROUANA-RENIER N.K. & ZEHR J.P., 2003 : Short-term exposures to chronically toxic copper concentrations induce HSP70 proteins in midge larvae (*Chironomus tentans*). *The Science of the Total Environment*, 312 (3) : 267-272.

KOHLER H., KNODLER C. & ZANGER H., 1999 : Divergent kinetics of hsp70 induction in *Oniscus asellus* (Isopoda) in response to four environmentally relevant organic chemicals (B[a]P, PCB52, gamma-HCH, PCP): suitability and limits of a biomarker. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 36 (2): 179-85.

KORHONEN L.A. & LAGERSPETZ K.Y.H., 1996 : Heat Shock response and Thermal acclimation in *Asellus aquaticus*. *Journal of Thermal Biology*, 21 (1) : 49-56.

KOSKINEN H., PEHKONEN P., VEHNÄIEN E., KRASNOV A., REXROAD C., AFANASYEV S., MÖLSA H. & OIKARI A., 2004 : Response of rainbow trout transcriptome to model chemical contaminants. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 320 : 745-753.

KUHN K. & STREIT B., 1994 : Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53 (3) : 398-404.

KUTLU M., DÜZEN A., BAYÇU C. & ÖZATA A., 2002 : Investigation of the effect of lead acetate on the hepatopancreatic ceca of *Gammarus Pulex*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 12 : 181-187.

KUTLU M. & SUSUZ F., 2004 : Effects of lead as an environmental pollutant on EROD enzyme in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea : Amphipoda). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 72 : 750-755.

- LAGADIC L., CAQUET T. & RAMADE F., 1994 : The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology*, 3 : 193-208.
- LEBLANC G.A., HILGENBERG B. & COCHRANE B.J., 1988 : Relationship between the structures of chlorinated phenols, their toxicity, and their ability to induce glutathione-S-transferase activity in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 12 : 147-155.
- LEBLANC G.A. & COCHRANE B.J., 1985 : Modulation of substrate-specific glutathione-S-transferase activity in *Daphnia Magna* with concomitant effects on toxicity tolerance. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 82 (1) : 37-42.
- LEBLANC G.A. & COCHRANE B.J., 1987 : Identification of multiple glutathione-s-transferases from *Daphnia magna*. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 88 (1) : 39-45.
- LEROY D., 2004 : Etude comparée du niveau de contamination par les PCBs de différentes espèces de poissons dans les rivières de la région wallonne : Incidence sur l'induction de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD). Mémoire de fin d'études en biologie animale, Université de Liège, 53 pp.
- LEWIS D.F.V., 2001 : Guide to cytochromes P450 - Structure and function. Taylor and Francis, Londres, Royaume-Uni, 215 pp.
- LINDSTRÖM-SEPPÄ P., KOIVUSAARI U. & HÄNNINEN O., 1983 : Metabolism of foreign compounds in freshwater crayfish (*Astacus astacus* L.) tissues. *Aquatic Toxicology*, 3 : 35-46.
- LIVINGSTONE D.R., 1990 : Cytochrome P450 and oxidative metabolism in invertebrates. *Biochemical Society Transactions*, 18 : 15-19.
- LIVINGSTONE D.R., 1998 : The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems : quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Bioch. Physiol. A*, 120 : 43-49.
- LIVINGSTONE D.R., NASCI C., SOLÉ M., DA ROS L., O'HARA S.C.M., PETERS L.D., FOSSATO V., WOOTTON A.N. & GOLDFARB P.S., 1997 : Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2,2',3,4,4',5'-hexachlorobiphenyl and Arochlor 1254. *Aquatic Toxicology*, 38 : 205-224.
- LONDOÑO D.K., SIEGFRIED B.D. & LYDY M.J., 2004 : Atrazine induction of a family 4 cytochrome P450 gene in *Chironomus tentans* (Diptera : Chironomidae). *Chemosphere*, 56 (7) : 701-706.
- LOOISE B.A.S., HOLWERDA D.A. & FOEKEMA E.M., 1996 : Induction of glutathione-S-transferase in the freshwater bivalve *Sphaerium corneum* as a biomarker for short-term toxicity tests ? *Comp. Biochem. Physiol. C*, 113 (1) : 103-107.
- LOWRY O.H., RISEBROUGH N.J., FARR A.L. & RANDALL R.J., 1951 : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.

MALBOUISSON J.F.C., YOUNG W.K. & BARK A.W., 1994 : Disruption of precopula in *Gammarus pulex* as a result of brief exposure to  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane (Lindane). *Chemosphere*, 28 (11) : 2011-2020.

MALTBY L., 1995 : Sensitivity of the crustaceans *Gammarus Pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia : Observations and possible mechanisms. *Water Research*, 29 (3) : 781-787.

MALTBY L., NAYLOR C. & CALOW P., 1990 : Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19 : 292-300.

MARNEFFE Y., 2003 : Etude d'un hydrosystème perturbé en Haute-Ardenne : Impact des activités anthropiques et des retenus artificielles sur les flux de nutriments et sur les peuplements zoobenthiques et zooplanctoniques dans le bassin de la Warche. Thèse de doctorat en sciences zoologiques, Université de Liège, 253 pp.

MATTHIESSEN P., SHEAHAN D., HARRISON R., KIRBY M., RYCROFT R., TURNBULL A., VOLKNER C. & WILLIAMS R., 1995 : Use of a *Gammarus pulex* Bioassay to Measure the Effects of Transient Carbofuran Runoff from Farmland. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30 (2) : 111-119.

MAYCOCK D.S., PRENNER M.M., KHEIR R., MORRIS S., CALLAGHAN A., WHITEHOUSE P., MORRITT D. & CRANE M., 2003 : Incorporation of in situ and biomarker assays in higher-tier assessment of the aquatic toxicity of insecticides. *Water Research*, 37 (17) : 4180-4190.

MAYER F.L., MEHRLE P.M. & SANDERS H.O., 1977 : Residue dynamics and biological effects of polychlorinated biphenyls in aquatic organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 5 : 501-511.

MAYON N., 2003 : Réponses à plusieurs niveaux d'organisation biologique de poissons exposés à différentes contaminations environnementales. Mémoire de fin d'études en sciences biologiques, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, Namur, 52 pp.

MCCAHON C.P. & PASCOE D., 1988a : Culture techniques for three freshwater macro-invertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere*, 17 (12) : 2471-2480.

MCCAHON C.P. & PASCOE D., 1988b : Use of *Gammarus pulex* (L.) in safety evaluation test : Culture and selection of a sensitive life stage. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 15 : 245-252.

McFARLAND V.A. & CLARKE J.V., 1989 : Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of PCB congeners : considerations for a congener specific analysis. *Env. Hlth. Perspect.*, 81 : 225-239.

MCKAY D., SHIU W.Y & SUTHERLAND R.P., 1979 : Determination of air-water Henry's law constants for hydrophobic pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, 13 : 333-337.

- MCNEIL C., ELWOOD R.W. & DICK J.T.A., 2000 : Factors influencing the importance of *Gammarus* spp. (Crustacea : Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv. Hydrobiol.* 149 (1) : 87-107.
- MCLOUGHLIN N., YIN D., MALTBY L., WOOD R.M. & YU H., 2000 : Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19 (8) : 2085-2092.
- MEGLITSCH P.A., SCHRAM F.R., 1991 : Invertebrate zoology – 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press, New York, USA, 623 pp.
- MEIJERING M.P.D., 1991 : Lack of oxygen and low pH as limiting factors for *Gammarus* in Hessian brooks and rivers. *Hydrobiologia*, 223 : 159-169.
- MERGEALLI G., PLUYMERS L. & OLLEVIER F., 2001 : Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-N-nonylphenol. *Environmental Pollution*, 111 (2) : 241-246.
- MEYRAN J.-C., MONNEROT M. & TABERLET P., 1997 : Taxonomic status and phylogenetic relationships of some species of the genus *Gammarus* (crustacea, amphipoda) deduced from mitochondrial DNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8 (1) : 1-10.
- MICHEL X.R., SUTEAU P., ROBERTSON L.W., NARBONNE J.-F., 1993 : Effect of benzo(a)pyrene, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on the xenobiotic-metabolizing enzymes in the mussel *Sphaerium corneum*. *Aquatic Toxicology*, 27 : 335-344
- MIOTA F., SIEGFRIED B.D., SCHARF M.E. & LYDY M.J., 2000 : Atrazine induction of Cytochrome P450 in *Chironomus tentans* larvae. *Chemosphere*, 40 : 285-291.
- MIRACLE A.L. & ANKLEY G.T., 2004 : Ecotoxicogenomics : linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reproductive toxicology*, 19 (3) : 321-326.
- MULISS R.M., REVITT D.M. & SHUTES R.B.E., 1996 : A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. *Water Research*, 30 (5) : 1237-1243.
- NAYLOR C., MALTBY L. & CALOW P., 1989 : Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia*, 189 : 517-523.
- NEBEKER A.V. & PUGLISI F.A., 1974 : Effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) on survival and reproduction of *Daphnia*, *Gammarus*, and *Tanytarsus*. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 103: 722-728.
- NEUPARTH T., CORREIA A.D., COSTA F.O., LIMA G. & COSTA M.H., 2005 : Multi-Level Assessment of Chronic Toxicity of Estuarine Sediments with the Amphipod *Gammarus locusta* : I. Biochemical Endpoints. *Marine Environmental Research*, 60 : 69-91.

OBERDÖRSTER E., RITTSCHOF D. & MCCLELLAN-GREEN P., 1998 : Induction of cytochrome P450 3A and heat shock protein by tributyltin in blue crab, *Callinectes sapidus*. *Aquatic Toxicology*, 41 : 83-100.

OLSEN T., ELLERBECK L., FISHER T., CALLAGHAN A. & CRANE M., 2001 : Variability in acetylcholinesterase and glutathione-S-transferase activities in *Chironomus riparius* Meigen deployed *in situ* at uncontaminated field sites. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 (8) : 1725-1732.

OMURA T. & SATO R., 1964 : The Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239 : 2370-2385.

PAQUET F., DURAND J.P., GOUDARD F., GERMAIN P., MILCENT M.C. & PIERI J., 1993 : Distribution of [241Am] in hepato-pancreatic nuclear of the lobster (*Homarus gammarus*). *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 29 (4) : 635-644.

PARRINGTON J. & COWARD K., 2002 : Use of emerging genomic and proteomic technologies in fish physiology. *Aquatic Living Resources*, 15 (3) : 193-196.

PASCOE D., KIDWARDS T.J., MAUND S.J., MUTHI E. & TAYLOR E.J., 1994 : Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay - The *Gammarus pulex* (L.) precopula separation (GaPPS) test. *Water Research*, 28 (2) : 369-372.

PASCOE D., WENZEL A., JANSSEN C., GIRLING A.E., JÜTTNER I., FLIEDNER A., BLOCKWELL S.J., MAUND S.J., TAYLOR E.J., DIEDRICH M., PERSOONE G., VERHELST P., STEPHENSO R.R., CROSSLAND N.O., MITCHELL G.C., PEARSON N., TATTERSFIELD L., LAY J.-P., PEITHER A., NEUMEIER B. & VELLETTI A.-R., 2000 : The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms. *Water Research*, 34 (8) : 2323-2329.

PAYNE J.F., FANCEY L.L., RAHIMTULA A.D. & PORTER E.L., 1987 : Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 86 (2) : 233-245.

PEAKALL D., 1992 : Ecotoxicology, series 1 - Animal biomarkers as pollution indicators. Chapman & Hall, Londres, Royaume-Uni, 291 pp.

PEAKALL, D., 1994 : Biomarkers. The way forward in environmental assessment. *Toxicol. Ecotox. News*, 1 (2) : 55-60.

PINKSTER S. & PLATVOET D., 1986 : De vlokreeften van het Nederlandse oppervlaktewater. *Wetenschappelijke Mededelingen K.N.N.V.*, 172 : 1-45.

PHILIPPART J.-C. & VRANKEN M., 1983 : Atlas des poissons de Wallonie. Distribution, écologie, éthologie, pêche, conservation. *Cahiers d'Ethologie Appliquée*, 3 (sup. 1-2), 395 pp.

PORTE C. & ESCARTIN E., 1998 : Cytochrome P450 system in the hepatopancreas of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii*: a field study. *Comp. Bioch. Physiol. C*, 121 : 333-338.

- POWER A. & SHEEHAN D., 1996 : Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 114 (2) : 99-103.
- PROUGH R.A., BURKE M.D. & MAYER R.T., 1976 : Direct fluorometric methods for measuring mixed-function oxidase activity. *Meth. Enzymol.*, 39 : 372-377.
- QUABIUS E.S., NOLAN D.T., BALM P.H.M., WENDELAAR-BONGA S.E., 1998 : The influence of PCB 126 on tilapia (*Oreochromis mossambicus*) liver. *Comp. Bioch. Physiol. A*, 120 : 57-63.
- RAMADE F., 1992 : Précis d'écotoxicologie. Masson, Paris, France, 300 pp.
- RINDERHAGEN M. RITTERHOFF J. & ZAUKE G.P., 2000 : Crustaceans as bioindicators. *Environmental Research Forum*, 9 : 161-194.
- ROTCHELL J.M. & OSTRANDER G.K., 2003 : Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B : Critical reviews*, 6 (5) : 453-495.
- ROUX A.L., 1970a : Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de crustacés amphipodes : *Gammarus pulex* et *G. fossarum*. *Annales de Limnologie* 6 (1) : 27-49.
- ROUX, A.L., 1970b : Les Gammares du groupe *pulex*. Essai de systématique biologique. *Arch. Zool. exp. gén.*, tome III, 313-356.
- ROUX A.L., 1971 : Les Gammares du groupe *pulex*. Essai d'hybridation et examen caryologique. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, 112 : 819-868.
- RUSSO J. & LAGADIC L., 2004 : Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). *Environmental Pollution*, 127 (2) : 303-311.
- SAFE, 1994 : Aryl Hydrocarbon (Ah) receptor-mediated toxicity and mechanism of action. *Toxicology Letters*, 74 (suppl. 1) : 72.
- SALINAS A.E. & WONG M.G., 1999 : Glutathione-S-transferase : a review. *Curr. Med. Chem.*, 6 (4) : 279-309.
- SÁNCHEZ P. & TARAZONA J.V., 2002 : Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates - Experience with *Daphnia Magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. *Aquatic Toxicology*, 60 (4) : 249-256.
- SCHILL R.O., GORLITZ H. & KOHLER H.R., 2003 : Laboratory simulation of a mining accident: acute toxicity, hsc/hsp70 response, and recovery from stress in *Gammarus fossarum* (Crustacea : Amphipoda) exposed to a pulse of cadmium. *Biometals*, 16 (3) : 391-401.
- SCHILL R.O., WOITSHELLA A., TRIEBSKORN R. & KOHLER H.-R., 2000 : Stress Protein Reaction as a Biomarker for Exposure to Pollutants to Distinguish Different Populations of Freshwater Invertebrates (*Dugesia gonocephala* and *Gammarus fossarum*). *Comp. Bioch. Physiol. A*, 126 : S132.

## VIII. Annexes

# 1. Dosage de la concentration protéique des homogénats de gammarets selon la méthode de LOWRY *et al.*, 1951

## 1. Principe

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de LOWRY *et al.*, 1951, basée sur l'emploi du réactif de Folin. Ce réactif, sel cuivrique, conduit en milieu alcalin à une réaction de complexation faisant intervenir certaines fonctions amines de la chaîne polypeptidique des protéines.

Le complexe formé avec les protéines montrant un pic d'absorption à une longueur d'onde de 660 nm, la mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde permet de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon.

## 2. Solutions de travail

**Moni-Trol :** La solution de Moni-trol, qui est utilisé ici comme standard protéique, est obtenue en diluant ce réactif 500 fois dans de l'eau Milli-Q.

**Mélange cuivrique :** Dans un jaugé de 50 ml, on mélange 500 µl de CuSO<sub>4</sub> 2% et 500 µl d'acide tartrique 4%. Après une homogénéisation rapide, on porte au trait de jauge avec une solution 0,3 M en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et 0,1 M en NaOH

**Réactif de Folin-Ciocalteu** dilué 4 fois dans de l'eau Milli-Q.

## 3. Mode opératoire

- Les homogénats de gammarets sont dilués 50 fois dans de l'eau Milli-Q.
- Pour chaque échantillon dosé, on ajoute 160 µl d'homogénat dilué à 3 puits d'une microplaque transparente de 96 puits. Les 36 premiers puits (3 premières colonnes) de la microplaque sont laissés vides, et vont servir à la réalisation de la droite d'étalonnage.
- La microplaque est placée dans le fluorimètre Ascent Fluoroskan FL (Labsystems, Finlande), qui va, piloté par le logiciel Ascent Software v 2.6, réaliser la droite d'étalonnage (voir point 4), et va également ajouter le mélange cuivrique dans chacun des puits. Après l'ajout de ce réactif, une période d'incubation de 30 minutes à température ambiante est ménagée.
- Au terme de la première période d'incubation, le réactif de Folin est ajouté à chacun des puits, et une période d'incubation de 30 minutes à température ambiante est à nouveau observée.
- Après ces 30 minutes d'incubation, la microplaque est placée dans le spectrophotomètre Ascent Multiskan EX, qui va, toujours sous la direction du logiciel Ascent Software v 2.6, réaliser les mesures d'absorbance.

#### 4. Lecture d'absorbance et traitement des résultats

L'absorbance associée à chacun des échantillons est mesurée à une longueur d'onde à 660 nm, ce qui permet au logiciel de calculer la concentration protéique de chacun des échantillons.

Une droite d'étalonnage est réalisée automatiquement par le fluorimètre, qui effectue différentes dilutions du standard protéique (le Moni-Trol). Ces dilutions sont détaillées dans le tableau suivant :

Monitrol μl/puits	Eau Milli-Q μl/puits	Moni-Trol (mg prot/ml)
0	160	0
20	140	0.019
50	110	0.047
75	85	0.07
100	60	0.094
125	35	0.118
145	15	0.136
160	0	0.150

La droite d'étalonnage est déterminée par régression linéaire à partir des valeurs d'absorbance obtenues pour les différentes dilutions du standard.

Le logiciel peut alors transformer les absorbances mesurées en concentrations en protéines (en mg/ml) en utilisant les paramètres de la droite d'étalonnage, selon la formule suivante :

$$x = (y - a) / b$$

- où
- a = ordonnée à l'origine de la droite d'étalonnage
  - b = coefficient angulaire de la droite d'étalonnage
  - y = absorbance de l'échantillon
  - x = concentration en protéines de l'échantillon, en mg/ml.

Les données sont ensuite archivées afin d'être à nouveau utilisables en cas de besoin.

## 2. Procédure de Clean-Up pour l'électrophorèse bidimensionnelle

La procédure est celle décrite dans la notice d'utilisation du kit "2-D Clean-Up Kit" (Amersham, Royaume-Uni).

- Une quantité d'échantillon équivalente à 100 µg de protéines est mélangée à 300 µl de précipitant. Le mélange est homogénéisé (vortex) et laissé à incuber sur glace durant 15 minutes. Ensuite, 300 µl de co-précipitant sont ajoutés.
- Le mélange est centrifugé durant 5 minutes, à 12000 g et à température ambiante. Le surnageant est ensuite prélevé et éliminé.
- 40 µl de co-précipitant sont ajoutés à chaque culot, et l'échantillon est laissé à reposer sur glace durant 5 minutes.
- Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 5 minutes à 12000 g et à température ambiante. On ajoute alors 100 µl d'eau Milli-Q, et on mélange (vortex). Le culot se disperse alors, mais sans se dissoudre.
- On ajoute ensuite à chaque échantillon 1 ml de tampon de lavage (préalablement refroidi à -20°C) et 5 µl d'additif de lavage. Les échantillons sont ensuite soumis à une dernière centrifugation, toujours à température ambiante et à 12000 g, et toujours durant 5 minutes.
- Le surnageant est ensuite prélevé et éliminé, et les culots sont laissés à sécher durant 5 minutes.
- Au terme de cette période, les échantillons sont prêts pour la réhydratation (voir point IV.9.2).

### 3. Détail des valeurs d'activité des GSTs

#### 1. Mise au point du dosage – influence du pH

Activités GST en <b>nanomoles/min/μg protéines</b>					
<b>Individu</b>	<b>pH 6,0</b>	<b>pH 6,5</b>	<b>pH 7</b>	<b>pH 7,5</b>	<b>pH 8</b>
<b>1</b>	0,185	0,256	0,189	0,262	0,153
<b>2</b>	0,199	0,201	0,204	0,169	0,159
<b>3</b>	0,147	0,259	0,151	0,261	0,157
<b>4</b>	0,205	0,222	0,210	0,152	0,139
<b>5</b>	0,184	0,265	0,189	0,152	0,122
<b>6</b>	0,211	0,168	0,178	0,180	0,164
<b>7</b>	0,190	0,185	0,200	0,162	0,174
<b>8</b>	0,144	0,200	0,192	0,123	0,143
<b>9</b>	0,179	0,224	0,148	0,153	0,079
<b>10</b>	0,153	0,144	0,181	0,130	0,160
<b>11</b>	0,177	0,154	0,178	0,267	0,148
<b>12</b>	0,192	0,145	0,192	0,155	0,154
<b>13</b>	0,142	0,232	0,142	0,174	0,152
<b>14</b>	0,169	0,159	0,197	0,096	0,135
<b>15</b>	0,177	0,162	0,184	0,102	0,118
<b>16</b>	0,167	0,181	0,167	0,141	0,159
<b>17</b>	0,187	0,226	0,188	0,142	0,169
<b>18</b>	0,184	0,180	0,180	0,168	0,139
<b>19</b>	0,175	0,159	0,139	0,151	0,098
<b>20</b>	0,136	0,216	0,161	0,114	0,165
<b>Moyenne</b>	0,175	0,197	0,179	0,163	0,144
<b>Ecart-type</b>	0,021	0,039	0,021	0,049	0,024

NB : Les mesures ont été réalisées à 25°C et sur des individus entiers. Pour chaque individu, la valeur présentée est la moyenne de 3 mesures distinctes.

## 2. Mise au point du dosage – Influence de la température

Activités GST en <b>nanomoles/min/μg protéines</b>			
<b>Individu</b>	<b>25°C</b>	<b>27°C</b>	<b>30°C</b>
<b>1</b>	0,256	0,184	0,169
<b>2</b>	0,201	0,185	0,175
<b>3</b>	0,259	0,147	0,173
<b>4</b>	0,222	0,204	0,153
<b>5</b>	0,265	0,183	0,135
<b>6</b>	0,168	0,172	0,181
<b>7</b>	0,185	0,194	0,192
<b>8</b>	0,200	0,186	0,158
<b>9</b>	0,224	0,144	0,111
<b>10</b>	0,144	0,176	0,176
<b>11</b>	0,154	0,169	0,188
<b>12</b>	0,145	0,190	0,200
<b>13</b>	0,232	0,182	0,164
<b>14</b>	0,159	0,141	0,116
<b>15</b>	0,162	0,172	0,183
<b>16</b>	0,181	0,177	0,183
<b>17</b>	0,226	0,199	0,194
<b>18</b>	0,180	0,192	0,159
<b>19</b>	0,159	0,148	0,112
<b>20</b>	0,216	0,181	0,178
<b>Moyenne</b>	0,197	0,176	0,165
<b>Ecart-type</b>	0,039	0,018	0,027

NB : Les mesures ont été réalisées à pH 6,5 et sur des individus entiers. Pour chaque individu, la valeur présentée est la moyenne de 3 mesures distinctes.

### 3. Mise au point du dosage – Influence du type d'échantillon

<b>Activité GST (nmol/min/mg protéines)</b>		
<b>Individu</b>	<b>Gammares entiers</b>	<b>Gammares décapités</b>
<b>1</b>	0,256	0,276
<b>2</b>	0,201	0,178
<b>3</b>	0,259	0,275
<b>4</b>	0,222	0,160
<b>5</b>	0,265	0,161
<b>6</b>	0,168	0,190
<b>7</b>	0,185	0,170
<b>8</b>	0,200	0,129
<b>9</b>	0,224	0,161
<b>10</b>	0,144	0,137
<b>11</b>	0,154	0,281
<b>12</b>	0,145	0,163
<b>13</b>	0,232	0,183
<b>14</b>	0,159	0,101
<b>15</b>	0,162	0,107
<b>16</b>	0,181	0,157
<b>17</b>	0,226	0,186
<b>18</b>	0,180	0,167
<b>19</b>	0,159	0,127
<b>20</b>	0,216	0,158
<b>Moyenne</b>	0,197	0,173
<b>Ecart-type</b>	0,039	0,051

NB : Les mesures ont été réalisées à pH 6,5 et à 25°C. Pour chaque individu, la valeur présentée est la moyenne de 3 mesures distinctes.

#### 4. Dosage de l'activité des GSTs sur des gammars contaminés en laboratoire

Activités GST en <b>nanomoles/min/μg protéines</b>					
<b>Individu</b>	<b>Témoins</b>	<b>Non contaminés</b>	<b>PCB n°77</b>	<b>PCB n°169</b>	<b>7 traceurs</b>
<b>1</b>	0,256	0,190	0,354	0,347	0,261
<b>2</b>	0,201	0,164	0,175	0,211	0,307
<b>3</b>	0,259	0,190	0,181	0,323	0,249
<b>4</b>	0,222	0,256	0,201	0,199	0,285
<b>5</b>	0,265	0,216	0,413	0,196	0,177
<b>6</b>	0,168	0,251	0,372	0,288	0,203
<b>7</b>	0,185	0,272	0,212	0,232	0,361
<b>8</b>	0,200	0,157	0,399	0,220	0,342
<b>9</b>	0,224	0,181	0,422	0,245	0,235
<b>10</b>	0,144	0,221	0,373	0,277	0,365
<b>11</b>	0,154	0,207	0,414	0,421	0,384
<b>12</b>	0,145	0,275	0,400	0,391	0,191
<b>13</b>	0,232	0,264	0,297	0,261	0,231
<b>14</b>	0,159	0,250	0,186	0,259	0,256
<b>15</b>	0,162	0,256	0,246	0,364	0,264
<b>16</b>	0,181	0,253	0,232	0,223	0,313
<b>17</b>	0,226	0,289	0,120	0,398	0,345
<b>18</b>	0,180	0,251	0,216	0,434	0,416
<b>19</b>	0,159	0,185	0,334	0,190	0,486
<b>20</b>	0,216	0,214	0,374	0,487	0,232
<b>Moyenne</b>	0,197	0,227	0,296	0,298	0,295
<b>Ecart-type</b>	0,039	0,040	0,099	0,091	0,081

NB : Les mesures ont été réalisées à pH 6,5, à 25°C et sur des gammars entiers. Pour chaque individu, la valeur présentée est la moyenne de 3 mesures distinctes.

## 5. Dosage de l'activité des GSTs sur des gammars prélevés en milieu naturel

Activités GST en <b>nanomoles/min/μg protéines</b>				
<b>Individu</b>	<b>Blanc-Gravier</b>	<b>Vesdre</b>	<b>Ourthe</b>	<b>Mehaigne</b>
<b>1</b>	0,256	0,255	0,316	0,270
<b>2</b>	0,201	0,260	0,198	0,312
<b>3</b>	0,259	0,203	0,223	0,242
<b>4</b>	0,222	0,208	0,169	0,306
<b>5</b>	0,265	0,264	0,194	0,279
<b>6</b>	0,168	0,270	0,223	0,332
<b>7</b>	0,185	0,220	0,152	0,267
<b>8</b>	0,200	0,199	0,150	0,255
<b>9</b>	0,224	0,197	0,217	0,210
<b>10</b>	0,144	0,322	0,179	0,248
<b>11</b>	0,154	0,342	0,217	0,346
<b>12</b>	0,145	0,327	0,247	0,363
<b>13</b>	0,232	0,213	0,183	0,257
<b>14</b>	0,159	0,203	0,269	0,206
<b>15</b>	0,162	0,192	0,225	0,250
<b>16</b>	0,181	0,204	0,214	0,191
<b>17</b>	0,226	0,217	0,277	0,349
<b>18</b>	0,180	0,210	0,250	0,209
<b>19</b>	0,159	0,275	0,226	0,228
<b>20</b>	0,216	0,185	0,299	0,255
<b>Moyenne</b>	0,197	0,238	0,221	0,269
<b>Ecart-type</b>	0,039	0,048	0,045	0,051

NB : Les mesures ont été réalisées à pH 6,5, à 25°C et sur des gammars entiers. Pour chaque individu, la valeur présentée est la moyenne de 3 mesures distinctes.

## 4. Détail des valeurs d'activité de l'EROD

Au total, 8 essais ont été réalisés. Pour chacun d'entre eux, nous avons tenté de mesurer l'activité de l'EROD chez 15 gammare. Pour chaque gammare, la mesure a été réalisée 3 fois.

2 essais ont ainsi été réalisés en utilisant le protocole de FISHER *et al.* (2003). Dans le cadre du premier essai, les surnageants ont été dilués 3 fois avec du tampon phosphate 0,13 M à pH 7,8 avant la mesure d'activité. Dans le cadre du second essai, ils n'ont pas été dilués.

6 essais ont été réalisés en utilisant le protocole de KUTLU & SUSUZ, 2004. Lors de ces essais, différentes concentrations d'éthoxyrésorufine et de NADPH ont été testées. Les concentrations utilisées pour chacune des essais sont détaillées dans le tableau suivant :

<b>Essai n°</b>	<b>Concentration en éthoxyrésorufine (µM)</b>	<b>Concentration en NADPH (mM)</b>
<b>1</b>	10	10
<b>2</b>	20	10
<b>3</b>	100	10
<b>4</b>	20	5
<b>5</b>	20	10
<b>6</b>	20	100

Les valeurs d'activité obtenues lors de ces différents essais sont présentées dans les tableaux des pages IX à XIII.

1. Protocole de FISHER *et al.* (2003), 1<sup>er</sup> essai

Activités EROD en picomoles/min/mg protéines				
Individu	Activité - Mesure 1	Activité - Mesure 2	Activité - Mesure 3	Activité moyenne
1	0,02	0,01	-0,01	0,01
2	0,04	0,00	-0,07	-0,01
3	0,03	0,05	-0,03	0,02
4	0,01	-0,03	0,01	0,00
5	0,02	0,01	-0,03	0,00
6	0,00	-0,03	0,00	-0,01
7	0,00	0,00	0,03	0,01
8	-0,01	0,03	0,00	0,01
9	0,02	0,06	-0,01	0,02
10	0,01	-0,07	0,02	-0,01
11	0,03	-0,01	0,01	0,01
12	-0,04	-0,03	0,01	-0,02
13	0,01	0,02	0,00	0,01
14	0,02	0,00	0,05	0,02
15	0,01	0,01	-0,03	0,00
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,00 ± 0,01</b>

2. Protocole de FISHER *et al.* (2003), 2<sup>ème</sup> essai

Activités EROD en picomoles/min/mg protéines				
Individu	Activité - Mesure 1	Activité - Mesure 2	Activité - Mesure 3	Activité moyenne
1	-0,01	0,01	0,02	0,01
2	0,02	0,02	0,04	0,03
3	0,01	0,03	0,03	0,02
4	0,03	0,00	0,01	0,01
5	-0,04	0,02	0,02	0,00
6	0,01	0,01	0,00	0,01
7	0,02	0,00	0,00	0,01
8	0,01	0,00	-0,01	0,00
9	0,02	0,03	0,02	0,02
10	0,04	0,02	0,01	0,02
11	0,03	-0,02	0,03	0,01
12	0,01	0,02	-0,04	0,00
13	0,02	0,01	0,01	0,01
14	0,00	0,01	0,02	0,01
15	0,00	0,01	0,01	0,01
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,01 ± 0,01</b>

### 3. Protocole de KUTLU & SUSUZ (2004), 1<sup>er</sup> essai

Activités EROD en picomoles/min/mg protéines				
Individu	Activité - Mesure 1	Activité - Mesure 2	Activité - Mesure 3	Activité moyenne
1	0,01	0,01	0,02	0,01
2	0,03	0,00	0,04	0,02
3	0,00	0,05	0,03	0,03
4	0,01	-0,03	0,01	0,00
5	0,02	0,01	0,02	0,02
6	0,06	-0,03	0,00	0,01
7	0,00	0,00	0,00	0,00
8	-0,01	0,03	-0,01	0,00
9	0,02	0,06	0,02	0,03
10	0,04	-0,07	0,01	-0,01
11	0,03	-0,01	0,03	0,02
12	-0,04	-0,03	-0,04	-0,07
13	0,01	0,02	0,01	0,01
14	0,02	0,00	0,02	0,01
15	0,01	0,01	0,01	0,01
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,02 ± 0,02</b>

### 4. Protocole de KUTLU & SUSUZ (2004), 2<sup>ème</sup> essai

Activités EROD en picomoles/min/mg protéines				
Individu	Activité - Mesure 1	Activité - Mesure 2	Activité - Mesure 3	Activité moyenne
1	0,02	0,01	0,02	0,02
2	0,04	0,02	0,04	0,03
3	0,03	0,00	0,03	0,02
4	0,01	0,01	0,01	0,01
5	0,02	0,05	0,02	0,03
6	0,00	-0,04	0,00	-0,01
7	0,00	0,01	0,00	0,00
8	0,06	0,03	0,01	0,03
9	-0,07	0,00	0,02	-0,02
10	-0,01	0,01	0,00	0,00
11	-0,03	0,02	0,00	0,00
12	0,02	0,06	0,00	0,03
13	0,00	0,00	0,01	0,00
14	0,01	-0,01	0,01	0,00
15	0,04	0,01	0,01	0,02
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,01 ± 0,02</b>

5. Protocole de KUTLU & SUSUZ (2004), 3<sup>ème</sup> essai

<b>Activités EROD en picomoles/min/mg protéines</b>				
<b>Individu</b>	<b>Activité - Mesure 1</b>	<b>Activité - Mesure 2</b>	<b>Activité - Mesure 3</b>	<b>Activité moyenne</b>
1	-0,01	-0,03	-0,01	-0,02
2	-0,07	0,00	0,02	-0,02
3	-0,03	0,03	0,01	0,00
4	0,01	0,06	0,03	0,03
5	-0,03	-0,07	-0,04	-0,05
6	0,00	-0,01	-0,03	-0,01
7	0,03	-0,03	0,00	0,00
8	0,00	0,02	0,04	0,02
9	0,03	0,00	0,06	0,03
10	0,02	0,01	-0,02	0,00
11	-0,02	0,01	-0,01	-0,01
12	0,02	0,03	-0,03	0,01
13	0,01	-0,04	-0,02	-0,02
14	0,01	0,01	0,00	0,01
15	0,01	0,02	0,01	0,01
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,00 ± 0,02</b>

6. Protocole de KUTLU & SUSUZ (2004), 4<sup>ème</sup> essai

<b>Activités EROD en picomoles/min/mg protéines</b>				
<b>Individu</b>	<b>Activité - Mesure 1</b>	<b>Activité - Mesure 2</b>	<b>Activité - Mesure 3</b>	<b>Activité moyenne</b>
1	0,02	0,01	-0,02	0,00
2	0,01	0,02	0,00	0,01
3	0,03	0,00	0,00	0,01
4	-0,04	0,01	0,03	0,00
5	0,01	0,05	0,00	0,02
6	0,02	-0,04	0,00	0,00
7	0,01	0,01	0,01	0,01
8	0,02	0,03	0,02	0,02
9	0,04	0,02	0,03	0,03
10	0,03	0,01	0,00	0,01
11	0,01	0,03	0,02	0,02
12	0,02	-0,04	0,01	0,00
13	0,00	0,01	0,00	0,00
14	0,00	0,02	0,00	0,01
15	0,04	0,01	0,03	0,03
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,01 ± 0,01</b>

7. Protocole de KUTLU & SUSUZ (2004), 5<sup>ème</sup> essai

Activités EROD en picomoles/min/mg protéines				
Individu	Activité - Mesure 1	Activité - Mesure 2	Activité - Mesure 3	Activité moyenne
1	-0,02	0,03	0,00	0,00
2	-0,02	0,00	0,00	0,00
3	0,00	0,01	0,03	0,02
4	0,03	0,02	0,02	0,02
5	-0,05	0,06	-0,02	0,00
6	-0,01	0,00	0,02	0,00
7	0,00	-0,01	0,01	0,00
8	0,03	0,01	0,01	0,02
9	0,06	-0,01	0,01	0,02
10	-0,07	-0,07	0,00	-0,05
11	-0,01	-0,03	0,00	-0,01
12	-0,03	0,01	0,00	-0,01
13	0,02	-0,03	0,02	0,00
14	0,00	0,00	0,02	0,01
15	0,01	0,03	0,05	0,03
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,00 ± 0,02</b>

8. Protocole de KUTLU & SUSUZ (2004), 6<sup>ème</sup> essai

Activités EROD en picomoles/min/mg protéines				
Individu	Activité - Mesure 1	Activité - Mesure 2	Activité - Mesure 3	Activité moyenne
1	0,00	-0,01	0,03	0,01
2	-0,01	0,02	-0,04	-0,01
3	0,02	0,01	0,01	0,01
4	0,01	0,03	0,02	0,02
5	0,01	-0,04	0,01	-0,01
6	0,00	0,01	-0,07	-0,02
7	0,05	0,02	-0,01	0,02
8	-0,03	0,01	-0,03	-0,02
9	0,01	-0,01	0,01	0,00
10	-0,03	0,02	0,00	0,00
11	0,00	0,01	0,05	0,02
12	0,03	0,03	-0,03	0,01
13	0,06	-0,04	0,01	0,01
14	-0,07	-0,03	-0,03	-0,04
15	0,01	0,00	0,04	0,02
<b>Moyenne ± écart-type</b>				<b>0,00 ± 0,02</b>