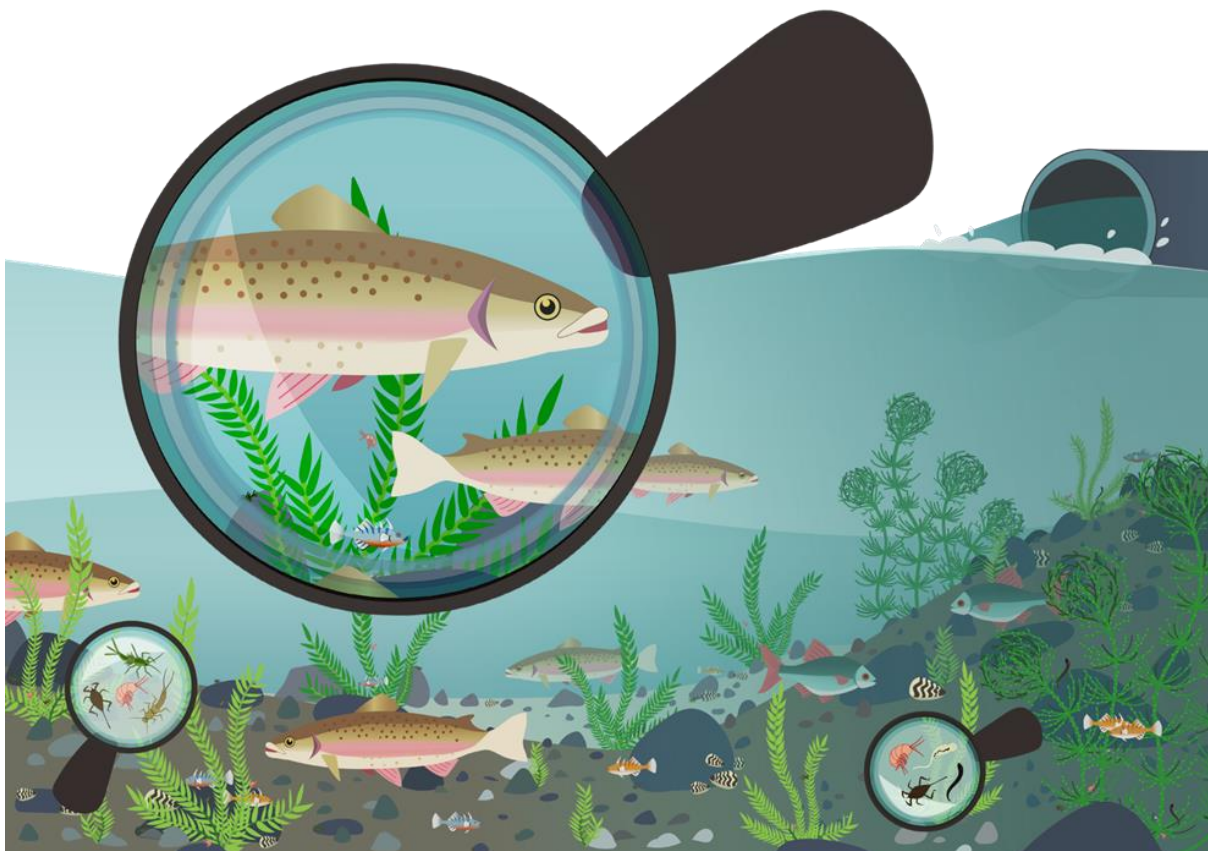


Guide des gestionnaires

Méthodologie d'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide de la truite arc-en-ciel engagée (*Oncorhynchus mykiss*)

Avec le soutien du Fonds Européen pour le Développement Régional (FEDER) et de la Wallonie via la Direction générale de l'Agriculture, des Ressources naturelles et de l'Environnement (DGO3)



Avant-propos

Le développement de ce guide méthodologique visant l'évaluation de la qualité des masses d'eau via l'utilisation d'une méthodologie active d'encagement et utilisant comme modèle biologique la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) a été réalisé dans le cadre du projet INTERREG FWVL DIADeM. Le guide présente de façon détaillée la méthodologie développée ainsi que l'ensemble des protocoles utilisés pour la mesure des effets toxiques des masses d'eau sur la base de la mesure de biomarqueurs. L'organisation et la rédaction de ce guide ont été réalisées par Mahaut BEGHIN, doctorante (URBE, UNamur). Les différents contributeurs à la rédaction de ce document sont Séverine PALACIO-PARIS, Maître de conférence (UMR I-02 Sebio, URCA) et Patrick KESTEMONT, Professeur (URBE, UNamur).

La section concernant l'analyse des biomarqueurs de détoxification et de stress oxydant a été réalisée par Audrey CATTEAU, ingénieure de recherche (UMR I-02 Sebio, URCA) et provient du guide méthodologique visant l'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*).

TABLE DES MATIERES

1.	Origine et transport des poissons.....	4
1.1.	Elevage.....	4
1.2.	Réception et transport.....	4
2.	Méthodologie d'encagement	4
2.1.	Conception des cages	4
2.2.	Mise en place sur le terrain	5
3.	Récupération des cages et prélèvements.....	6
3.1.	Préparation du matériel nécessaire aux prélèvements.....	6
3.2.	Récupération des cages	8
3.3.	Dissection.....	8
4.	Mesure des biomarqueurs généraux.....	10
4.1.	Coefficient de Fulton.....	10
4.2.	Taux de croissance spécifique (Specific Growth Rate)	10
5.	Analyses biochimiques.....	11
5.1.	Système immunitaire.....	11
5.2.	Système reproducteur	21
5.3.	Système nerveux.....	28
5.4.	Marqueurs de détoxification et de stress oxydant.....	31
5.5.	Histopathologie.....	44
6.	Utilisation d'un index IBR (Integrative Biomarker Response) pour l'interprétation des résultats.....	47
7.	Liste du matériel pour la récupération des cages :.....	49
8.	Bibliographie.....	51

1. ORIGINE ET TRANSPORT DES POISSONS

1.1. Elevage

Les truites proviennent d'une pisciculture possédant un statut sanitaire enregistré dans le registre des exploitations piscicoles. La pisciculture doit être déclarée indemne des pathologies telles que l'anémie infectieuse du saumon ou la septicémie infectieuse virale et ne présenter aucun cas d'infection connue. Les organismes sont préférentiellement élevés dans des étangs d'eau douce alimentés en eau de source afin d'éviter de travailler avec des organismes ayant déjà été exposés à des contaminants d'origine anthropique. Des organismes sexuellement adultes sont sélectionnés avec un poids compris entre 100 et 200 g. Afin d'étudier des variables du système reproducteur, un sexe ratio de 50 : 50 est recommandé.

1.2. Réception et transport

Les truites sont transportées depuis la pisciculture jusqu'au site d'encagement dans une cuve adaptée au transport de poissons et continuellement oxygénée (idéalement par apport d'oxygène liquide). Avant d'être transférés dans les cages, les poissons sont placés dans des seaux contenant un mélange d'eau provenant de la cuve et du site d'encagement afin de les acclimater aux conditions de température auxquelles ils seront exposés une fois dans les cages. L'état sanitaire des organismes est évalué par un vétérinaire avant l'encagement. La taille et le poids de chaque poisson sont ensuite encodés avant de répartir les animaux de façon homogène dans les cages par groupe de 15.

2. METHODOLOGIE D'ENCAGEMENT

2.1. Conception des cages

Des cages d'une dimension de 0,3 x 0,9 x 1 m (0,27m³) sont confectionnées à l'aide de tôles en aluminium perforé possédant un maillage carré de 12 x 12 mm (Figure 1). Ces cages peuvent accueillir 15 poissons de 100 g. Deux rectangles de 0,3 x 1m sont découpés dans la tôle pour former le fond et le couvercle de la cage. Les faces avant et arrière sont composées de deux rectangles de 0.9 x 1 m. Les faces latérales ont une dimension de 0,3 x 0,9 m. L'armature de la cage se compose de tubes carrés en aluminium reliés par des raccords carrés triples ou doubles pour le couvercle. Une fois la structure assemblée, les morceaux de tôle préalablement découpés y sont fixés à l'aide de rivets. Le couvercle est relié au reste de la cage par deux charnières permettant une ouverture facile. Enfin, des pitons sont fixés sur le couvercle et le bord supérieur de la cage afin de pouvoir y placer un cadenas. Le placement de pitons sur les côtés latéraux de la cage permettra d'y passer la corde qui servira à attacher la cage au niveau de la berge.

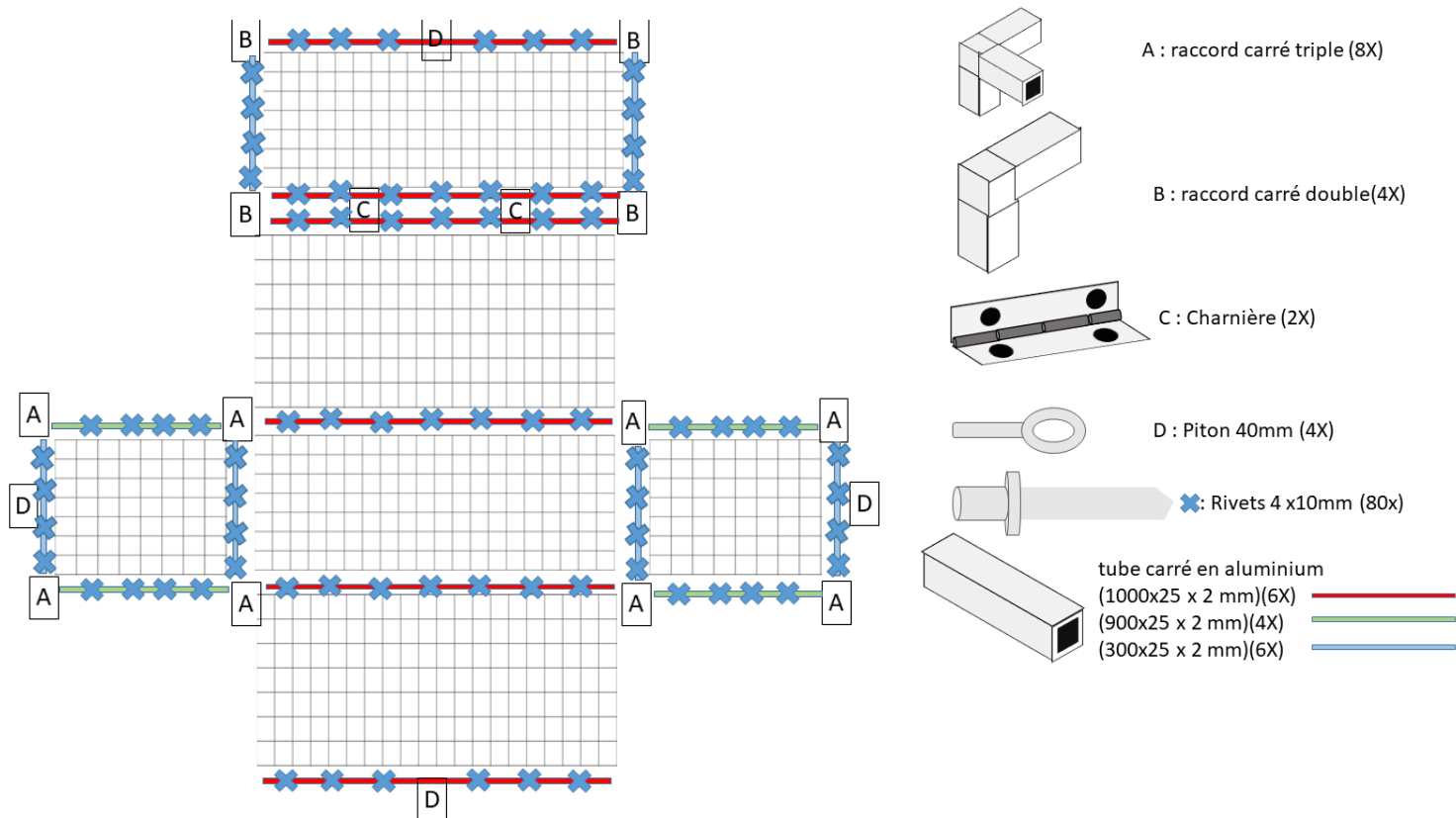


Figure 1: Plan de construction d'une cage de 0,3 x 0,9 x 1 m en aluminium



Figure 2: Structure finale d'une cage

2.2. Mise en place sur le terrain

Les cages sont préparées sur la berge avant d'être positionnées au niveau des coordonnées GPS des sites préalablement sélectionnés lors d'une prospection. Les paramètres physico-chimiques sont mesurés sur les sites (oxygène dissous, pH, température, conductivité). Chaque cage est lestée avec un poids de 5 kg afin de la stabiliser. En fonction de la hauteur de la colonne d'eau, les cages vont soit être disposées sur le lit du cours d'eau soit être maintenues en flottaison juste en dessous du niveau de l'eau. Dans ce second cas, deux bouées sont attachées de part et d'autre de la cage afin d'en assurer la position. Si plusieurs cages sont utilisées (par exemple 3 cages par site d'encagement), elles sont liées entre elles par des cordes qui sont passées dans les pitons se trouvant sur chacune d'elles. Les cordes sont ensuite attachées à des arbres de part et d'autre des cages. Des pierres peuvent être placées au fond des cages afin de permettre aux truites de s'abriter du courant pendant la période d'expérimentation. Une fois les cages disposées, les poissons y sont transférés et les cages

sont scellées par des cadenas. Le titane est privilégié pour les cadenas afin d'éviter le dépôt de rouille pendant la période d'immersion. Les cages sont positionnées à l'écart de la berge afin de réduire leur accessibilité et de les placer dans le courant d'eau. Si les cages sont positionnées trop proches de la berge, l'eau pourrait y stagner. La stagnation de l'eau dans les cages rend les conditions d'exposition moins représentatives de celles rencontrées dans le cours d'eau et pourrait affecter la survie des truites, poissons exigeants en oxygène dissous. Une affiche peut être positionnée sur les cages afin d'expliquer l'expérience en cours et de fournir les coordonnées des personnes en charge du projet. Cette affiche permettra de limiter le risque de vandalisme et d'être joignable en cas de problèmes.

La position exacte de chaque cage est identifiée par GPS et photographiée afin de pouvoir évaluer leur possible déplacement. Ces photos permettront également de faciliter la récupération des cages. Les cages sont aussi vérifiées toutes les semaines par les expérimentateurs.



Figure 3: Placement des cages en fonction de la profondeur du cours d'eau. Les cages sont déposées sur le lit d'un cours d'eau peu profond ou positionnées en flottaison dans un cours d'eau profond.

3. RECUPERATION DES CAGES ET PRELEVEMENTS

3.1. Préparation du matériel nécessaire aux prélèvements

Le matériel nécessaire aux prélèvements des échantillons biologiques doit être préparé à l'avance afin de pouvoir réaliser ceux-ci rapidement et ne pas altérer l'intégrité des échantillons.

3.1.1. Equipement pour réaliser les dissections

Afin de réaliser les dissections dans de bonnes conditions :

- Stériliser les outils de dissection et en prévoir pour le nombre de préleveurs.
- Préparer des bacs ainsi que des planches de dissection (en verre ou en liège).
- Préparer une quantité de glace suffisante pour remplir tous les bacs de dissection.
- Prévoir une cuve remplie d'azote liquide afin de stocker les organes après prélèvement.
- Préparer et annoter des microtubes de 1,5mL pour chaque organe à prélever. Pour éviter que les organes soient mélangés, utiliser des tubes de couleurs différentes pour chaque organe.
- En plus, préparer pour chaque individu autant de microtubes de 500µL que d'analyses qui seront réalisées sur le plasma (5 sont décrites dans ce guide).
- Préparer une fiche de dissection où les informations relatives à chaque individu seront répertoriées.

3.1.2. Equipement pour prélever le sang

Pour chaque individu à prélever préparer :

- Une seringue de 1mL(ref) héparinée et équipée avec une aiguille 22G
- Un microtube contenant 50µL d'héparine

3.1.3. Equipement pour prélever la rate

Les rates ne sont pas conservées dans l'azote liquide comme les autres organes, mais dans du milieu de culture L15 afin de pouvoir ensuite étudier leurs populations leucocytaires.

Pour chaque individu préparer :

- Un microtube contenant 1ml de milieu de culture L15 (ThermoFisher Scientific : 11450049) complété avec 1% de Pénicilline/streptomycine 10 000 U/mL (Thermofisher Scientific: 15140122) et 10% de Foetal Bovine Serum (FBS) (Thermofisher Scientific: 10270106)
- Un pilon permettant de broyer la rate (un piston de seringue stérile peut être utilisé si on ne dispose pas de pilons)
- Une petite boîte de Pétri
- Un tube à centrifuger conique de 15mL annoté comme le microtube
- Un tamis cellulaire avec un maillage de 100µm

3.1.4. Equipement pour réaliser les prélèvements histologiques

Pour chaque individu, préparer :

- Une histosette annotée (annoter au crayon ou avec un marqueur spécialisé car l'encre des indélébiles classiques ne tient pas dans le liquide de fixation)

Pour conserver les échantillons, préparer des bidons de milieu de fixation pouvant contenir le nombre total d'histosettes. La solution de fixation peut être préparée à l'avance sous hotte chimique :

- Pour 1L, ajouter 110mL de formaldéhyde 35% et 10mL d'acide acétique glacial à 880mL d'eau distillée.

3.1.5. Equipement pour prélever le foie

- Préparer une solution mère de PMSF (PhénylMéthylSulfonideFluorure, CAS 329-98-6) à 1M dans du DMSO et placer cette solution dans une fiole en verre conservée à 4°C. Le PMSF utilisé en tant qu'inhibiteur de protéases sera ajouté aux solutions de conservation du foie le jour même de la dissection à raison de 0,2 mM final, en raison de sa faible stabilité une fois en solution.
- Remplir une série de tubes à bouchon vissant avec des billes en verre (Ø 1mm) et les numéroter.
- Préparer une solution de conservation composée de tampon phosphate pH 7,8 à 0,1M, de glycérol à 20 %.
- Remplir les tubes avec 800µL de la solution de conservation.

3.2. Récupération des cages

Les coordonnées GPS et les photos prises lors du déploiement des cages sont utilisées lors de la récupération. Les paramètres physico-chimiques sont mesurés (pH, oxygène dissous, conductivité, température). Les cages sont rapprochées de la berge et ouvertes individuellement. Les poissons de chaque cage sont transférés dans des seaux contenant de l'eau provenant du site d'encagement et oxygénée à l'aide de bulleurs. La mortalité dans chaque cage est évaluée et rapportée sur la fiche de terrain. Deux poissons par cage sont prélevés et confiés à un vétérinaire afin d'évaluer leur état de santé suite à l'encagement.

3.3. Dissection

Ajouter une dose de 150 mg L^{-1} de MS-222 (Tricaine methanesulfonate) dans les seaux afin d'anesthésier les truites.

Prélever ensuite le sang dans les 5 min par ponction de la veine caudale à l'aide d'une seringue de 1 mL préalablement héparinée et le placer dans le microtube correspondant et contenant $50 \mu\text{L}$ d'héparine. Conserver les microtubes sur glace avant de les centrifuger (10 min, $10\,000 \text{ g}$, 4°C). Récupérer le plasma (phase supérieure) et le distribuer dans les microtubes de $500 \mu\text{L}$ qui seront utilisés pour les différentes analyses. Placer ces tubes dans la cuve d'azote liquide.



Figure 4: Prélèvement du sang par ponction de la veine caudale

Immédiatement après le prélèvement de sang, euthanasier les truites par un excès d'anesthésiant suivi d'une dislocation des vertèbres cervicales. Encoder le poids et la longueur totale de chaque individu. Procéder à la dissection en réalisant une incision partant de l'anus et remontant jusqu'à la tête en veillant à ne pas sectionner les parois du tube digestif.

Prélever la rate et la mettre dans un microtube préalablement rempli avec 1 mL de la solution de L15 enrichie et la placer sur glace. Vider le microtube dans un tamis cellulaire placé dans une boîte de Petri contenant 4 mL de L15 enrichi. Broyer ensuite la rate à l'aide du pilon en réalisant des mouvements circulaires ; transférer la suspension cellulaire obtenue dans le tube à centrifuger de 15 mL à l'aide d'une pipette bulle. Rincer le tamis et la boîte avec 4 mL de L15 enrichi et transférer la suspension dans le tube. Conserver les tubes à 4°C et réaliser les analyses décrites au point 5.1.1. le lendemain.

Prélever un échantillon de muscle en réalisant une incision d'1 cm sur 1 cm à l'arrière de la nageoire dorsale (Figure). Pour faciliter les analyses ultérieures, retirer la peau de l'échantillon avant de le placer dans un microtube dans l'azote liquide.

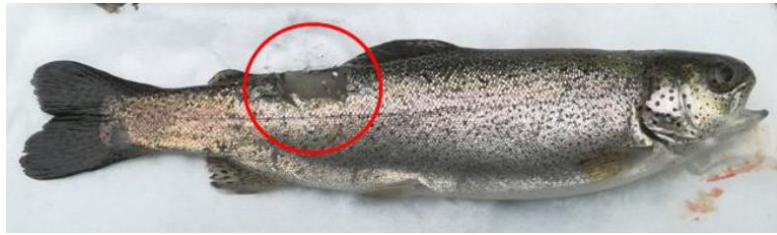


Figure 5: Le cercle rouge indique l'endroit où le muscle doit être prélevé

Pour les analyses histologiques, prélever les échantillons de foie et de gonades en petits blocs de 5 mm² maximum avec des coupures nettes sans compression, sans déchirement, sans contact avec de l'eau ou des matériaux secs (pas de papier absorbant par exemple). Les placer dans les histosettes. Placer ensuite les histosettes rapidement dans la solution de fixation (le liquide fixateur est toxique, il faut manipuler au grand air ou sous une hotte avec du liquide frais (entre 5 et 10°C) pour limiter les émanations). Conserver les échantillons minimum 24h dans la solution de fixation. Si la suite du protocole ne peut pas être faite dans les jours suivants (moins de 7j), placer les échantillons au frais (entre 5 et 10°C) pour éviter une sur-fixation.

Récupérer le reste du foie en veillant à ne pas percer la vésicule biliaire et le placer dans un microtube préalablement rempli avec les billes d'homogénéisation et la solution de conservation dans l'azote liquide.

Une fois de retour au laboratoire, trier les échantillons par organes et les stocker dans un congélateur à -80°C. L'évaluation de la taille des populations leucocytaires et de leur activité de phagocytose dans la rate se fait 24 h après le prélèvement. Les autres analyses peuvent être réalisées ultérieurement tant que les échantillons sont conservés à -80°C.

4. MESURE DES BIOMARQUEURS GÉNÉRAUX

4.1. Coefficient de Fulton

D'après Fulton (1902)

Principe : Le coefficient de condition de Fulton permet d'évaluer l'état de santé global de l'organisme (croissance, embonpoint) avant et après l'encagement sur base de sa taille et de son embonpoint.

Protocole :

- Peser le poisson.
- Mesurer la longueur totale.
- Calculer l'index de condition (K) :

$$K = \frac{\text{poids (g)}}{\text{longueur totale}^3} \times 100$$

4.2. Taux de croissance spécifique (Specific Growth Rate)

Principe : Le calcul du taux de croissance spécifique permet d'évaluer le gain ou la perte de poids journalière pendant l'encagement sur base du poids moyen des individus en début et en fin d'expérience et du nombre de jours d'expérimentation.

Protocole :

- Peser les organismes avant et après l'encagement.
- Calculer le SGR :

$$SGR (\%) = \left(\frac{\ln(\text{poids}_2) - \ln(\text{poids}_1)}{t_2 - t_1} \right) \times 100$$

Avec *poids1* le poids moyen des poissons exprimé en g avant l'encagement et *poids2* le poids moyen des poissons en g après l'encagement. *t2-t1* le nombre de jours d'exposition entre les deux mesures de poids.

5. ANALYSES BIOCHIMIQUES

5.1. Système immunitaire

5.1.1. Analyse de la taille des populations leucocytaires et de la phagocytose dans la rate

Principe : Les populations leucocytaires sont analysées en cytométrie en flux. Les cellules sont propulsées individuellement à grande vitesse devant une source lumineuse (laser). Un système de miroirs et de filtres permet de collecter les signaux émis par la cellule. On peut ainsi quantifier le nombre de cellules dans un échantillon et définir à quelles populations elles appartiennent. La lumière diffractée (Forward Scatter) par la cellule donne une information sur sa taille relative, tandis que la lumière réfléchie (Side Scatter) donne une information sur sa granularité ou sa complexité relative. On peut ainsi discriminer les lymphocytes de petite taille et de faible granularité, des monocytes de taille et de granularité moyenne, des granulocytes qui possèdent une granularité importante.

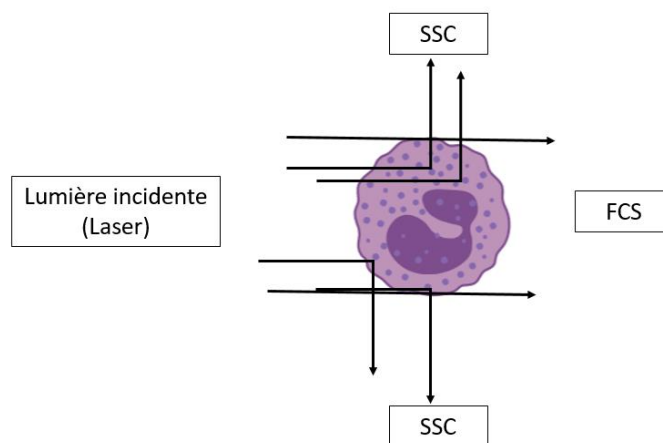


Figure 6: Fonctionnement d'un cytomètre en flux

Le marquage des cellules avec un réactif fluorescent, l'iodure de propidium (IP), permet de discriminer les cellules vivantes des mortes. L'IP est un agent intercalant des acides nucléiques qui permet de marquer les noyaux des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire. Seules les cellules mortes apparaîtront donc fluorescentes avec ce marquage

a. Isolement leucocytaire et viabilité

Réactifs et solutions :

- Milieu de culture L15 (ThermoFisher Scientific : 11450049)
- Pénicilline/streptomycine 10 000 U/mL (Thermofisher Scientific: 15140122)
- Solution de L15 complétée en antibiotiques :
 - Complémenter le L15 avec 1% de pénicilline/streptomycine.

Protocole :

Après avoir laissé incuber les échantillons overnight à 4°C :

- Centrifuger les tubes (20 min, 400g, 4 °C, acc1, decc 1).
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 6 mL de L15 complémenté en antibiotiques.
- Centrifuger (20 min, 400 g, 4 °C, acc1, decc 1).
- Re-suspendre le culot dans 1 mL de L15 complémenté en antibiotiques.

b. Viabilité cellulaire

D'après Inoue et al. (2002)

Equipement :

- Cytomètre en flux (BD FACSVerser™)
- Centrifugeuse (Eppendorf™, 5810R)

Réactifs et solutions :

- Iodure de propidium 1mg mL⁻¹ (Sigma-Aldrich : P4864)
- Milieu de culture L15

Protocole :

- Allumer le FACS 20 min à l'avance.
- Allumer l'ordinateur pour faire le daily clean et la calibration sur le programme FACS.
- Préparer autant de tubes que d'échantillons, comprenant 485 µL de L15 et 10µL d'échantillon.
- Vérifier les paramètres suivants :
 - Vitesse : High
 - P1: 10 000 évènements
 - FSC (Front Scattering): 230
 - SSC (Side Scattering): 401
 - FITC : 492
 - PE : 487
 - PerCP : 544
- Analyser les tubes au FACS en respectant un délai de 2min entre chaque tube.
- Ajouter 5 µL d'iodure de propidium.
- Incuber 5 min à l'abri de la lumière.
- Lire les échantillons au cytomètre en flux.
-

Traitement des résultats :

- Dot plot : Avec FSC en abscisses et SSC en ordonnées, il permet de tracer les « gates » pour différencier les différentes populations leucocytaires (lymphocytes, monocytes/macrophages et granulocytes) en se basant sur les images ci-dessous :
- Il est important de créer les marqueurs sur l'histogramme d'une « gate » (par exemple P2 = tous les leucocytes) et de copier-coller sur les autres pour garder les mêmes critères.
- Histogramme : La fluorescence PerCP en abscisses (logarithmique) et le nombre d'évènements en ordonnées permettent de tracer les « gates » séparant les cellules mortes des cellules vivantes.

- Demander les statistiques pour chaque « gate » :
 - Mortalité $\leq 5\%$ = bonne viabilité
 - Mortalité $\geq 5\%$ = mauvaise viabilité

Si la viabilité est bonne, les analyses de phagocytose peuvent être réalisées.

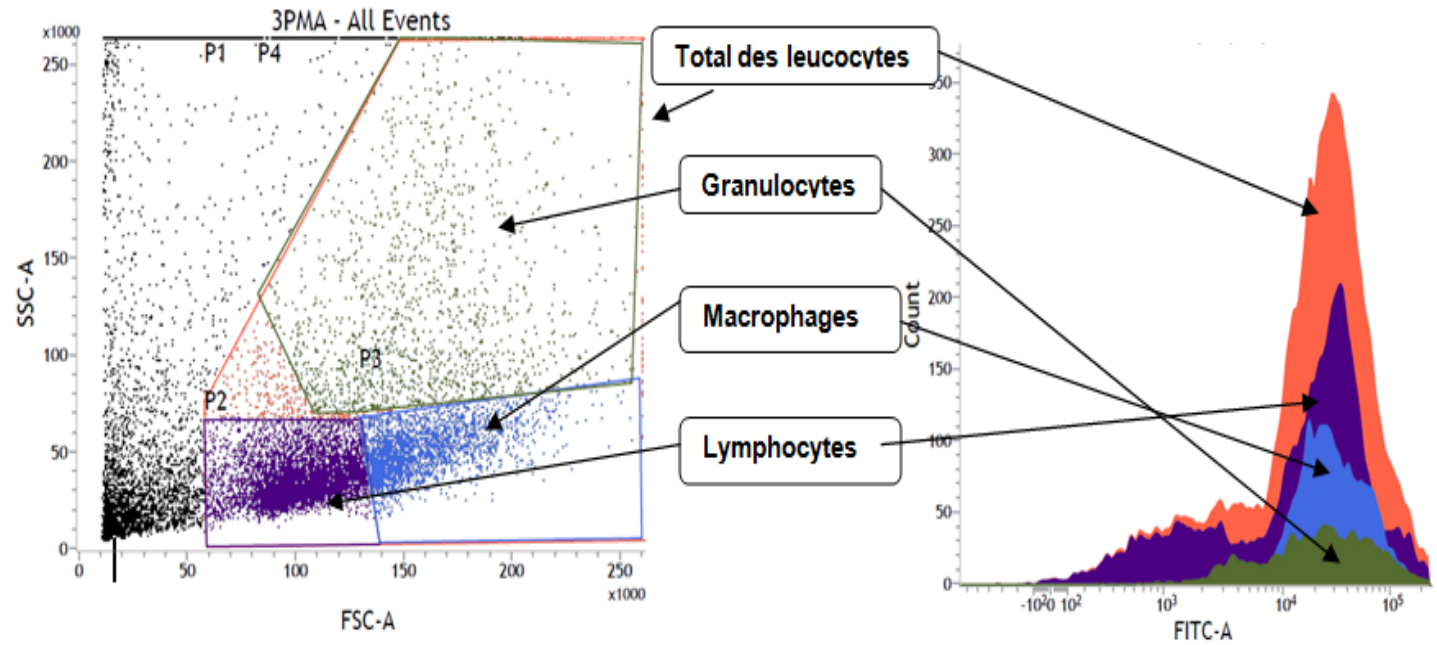


Figure 7: Identification des populations leucocytaires par cytométrie en flux

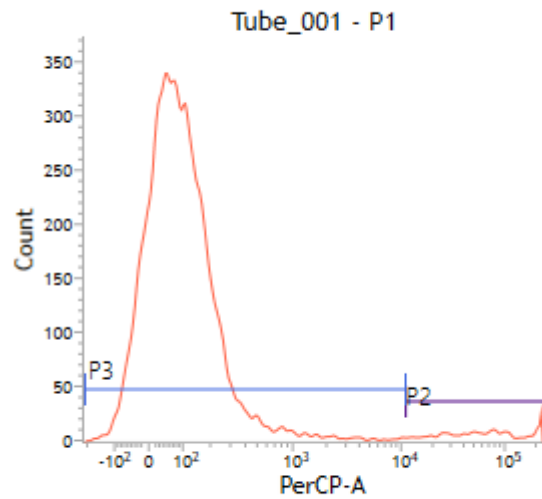


Figure 8: Identification des cellules mortes (P2) et vivantes (P3)

c) Activité de la phagocytose

D'après Samaï et al. (2002)

Principe : Les leucocytes sont incubés avec une quantité connue de microbilles de latex fluorescentes. Après la période d'incubation, les cellules sont rincées et le signal de fluorescence analysé. Sur base de l'intensité du signal de fluorescence émis par une bille isolée, on peut calculer le nombre de billes phagocytées par chaque cellule. On considère qu'une cellule a une activité de phagocytose lorsque trois billes ou plus ont été phagocytées.

Réactifs et solutions :

- Eau milliQ
- Milieu de culture L15
- Pénicilline/streptomycine 10 000 U mL⁻¹
- Formaldéhyde 37% (VWR : 1.04003.1000)
- Azide de sodium (VWR : J21610.22)
- Billes fluorescentes (Fluoresbrite Carboxy YG 2.0 Micron Microsphere) de diamètre = 2,00 µm, volume = 5mL polyscience : 09847)
- Tablettes de PBS (Thermofisher Scientific :18912014)
- Tampon phosphate :
 - Dissoudre une tablette de PBS dans 500mL d'eau milliQ.
- Solution de fixation (SOUS HOTTE) :
 - Ajouter 0,1 g d'azide de sodium à 675 µL de formaldéhyde 37% puis porter à 50mL avec du tampon phosphate.
- Solution de L15 complétée en antibiotiques :
 - Complémenter le L15 avec 1% de pénicilline/streptomycine.

Protocole :

- Calculer la concentration initiale de billes dans la solution stock :

$$\text{Nombre de billes/mL} = \frac{6W \cdot 10^{12}}{\pi \cdot d \cdot \beta^3}$$

W = g de polymère/mL (0,025 pour le latex 2,5%)

D = Densité du polymère (1,05 pour la latex)

B = Diamètre des billes (A vérifier pour chaque lot !)

- Préparer une plaque 96 puits à fond rond (U shape):
 - Calculer le volume d'échantillon pour obtenir 1 000 000 de cellules (Utiliser le gate P1, viabilité cellulaire).

$$\text{Volume} = \frac{1000000}{\frac{\text{event}}{\mu\text{L}} \cdot 50}$$

Remarque : on multiplie par 50 car dilution 50X lors de l'IP : 10 µL ech/500µL)

- Ajouter du L15 complété pour arriver à 200 µL (on travaille en duplicata).
- Diluer les billes dans la solution de L15 pour atteindre une concentration de 20 billes/cellule.
- Ajouter 4 µL de billes dans tous les puits.
- Mélanger par up/down à la pipette multicanaux.
- Incuber 18 h à 22°C à l'obscurité.

- Centrifuger (10 min, 400 g, 4°C).
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 200 µL de solution de fixation.
- Lire la plaque au cytomètre en flux. La lecture peut se faire quelques jours plus tard si la plaque est conservée à 4°C à l'abri de la lumière.

Traitement des résultats :

La phagocytose correspond à l'ingestion > 3 billes/cellules.

- Mettre un marqueur P2 sur l'histogramme à partir de la fin du 2ème pic en allant vers la droite (3 billes et +).
- Mettre un marqueur P3 sur le 1^{er} pic (1 seule bille).
- Demander les statistiques pour avoir le % de cellules ayant phagocyté 3 billes et +
- Diviser la fluorescence moyenne pour 3 billes et + par celle de la fluorescence moyenne pour 1 bille (P2/P3) => nombre moyen de billes phagocytées par cellule.
- Calculer l'Index de Phagocytose :

$$IP = \frac{\% \text{ de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes}}{\text{Nombre moyen de billes phagocytées par une cellule ayant phagocyté}}$$

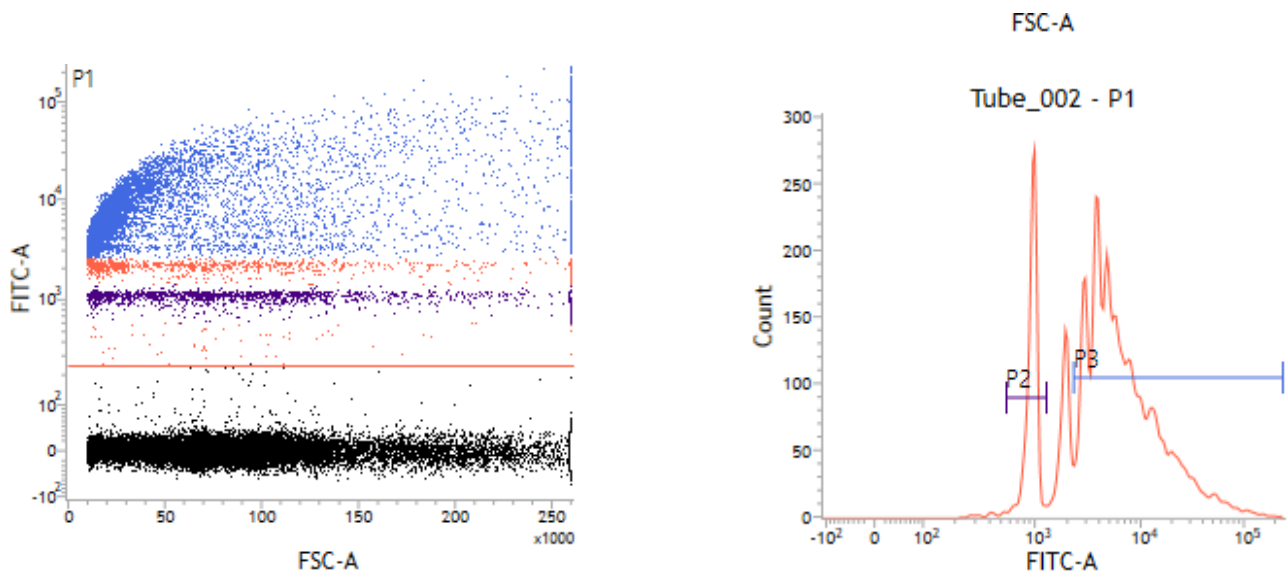


Figure 9: Identification des cellules ayant phagocyté une bille (P2- population mauve) ou 3 et plus de 3 billes (P3- population bleue)

5.1.2. Dosage de l'activité du lysozyme plasmatique

D'après Ellis (1990)

Principe : Les échantillons de plasma sont mis en présence d'une solution contenant des bactéries *Micrococcus lysodeikticus*. Ces bactéries confèrent une turbidité à la solution. Elles vont être reconnues par les lysozymes et progressivement lysées par ceux-ci, ce qui va entraîner une diminution de la turbidité de la solution au cours du temps. Au plus cette diminution est rapide, au plus les lysozymes présents dans l'échantillon de plasma sont actifs.

Equipement :

- Spectrophotomètre (FLUOstar® Omega Plate Reader, BMG LABTECH)

Réactifs et solutions :

- *Micrococcus lysodeikticus* ATCC No. 4698 (Sigma: M3770-5G)
- Tampon phosphate (Na_2PO_4 , 0,05M, pH 6,02) :
 - Ajouter 1,33 g de Na_2HPO_4 dans 500 mL d'eau milliQ. Le tampon se conserve à 4°C entre les dosages.
- Solution de *Micrococcus lysodeikticus* :
 - Préparer une solution de 0,6 mg mL⁻¹ de *Micrococcus* dans le tampon phosphate. La solution se conserve une demi-journée à température ambiante et sous agitation constante.

Protocole :

- Faire décongeler les échantillons de plasma sur glace puis les vortexer.
- Sur la plaque 96 puits à fond plat préparer en triplicata :
 - Les échantillons : 10 µL de plasma
 - Les blancs : 260 µL de tampon phosphate
 - Les contrôles *Micrococcus* : 10 µL de tampon phosphate
- A l'aide d'une pipette multicanaux, ajouter 250 µL de solution de *Micrococcus* dans tous les puits à l'exception des blancs.
- Homogénéiser par up/down.
- Mesurer l'absorbance à 450 nm pendant 15 min (zone de linéarité).

Traitement des résultats :

- Une unité de lysozyme induit une diminution d'absorbance de 0,001 min⁻¹
- Calculer la pente moyenne pour chaque échantillon.
- Soustraire la valeur du contrôle négatif à la pente moyenne.
- Diviser par -0,001 pour obtenir l'activité enzymatique.
- Multiplier par 100 pour obtenir l'activité par mL de plasma.

5.1.3. Dosage du complément plasmatique

D'après Sunyer and Tort (1995)

Principe : Les échantillons de plasma sont mis en présence d'érythrocytes de lapin qui vont être reconnus par le complexe du complément et être lysés par celui-ci. La lyse des érythrocytes va induire la libération de l'hémoglobine qu'ils contiennent. La libération de cette hémoglobine va induire une augmentation de la turbidité de la solution à 615nm. Le nombre d'érythrocytes lysés et donc la quantité d'hémoglobine libérée va dépendre de l'activité du complément. Celle-ci est exprimée comme étant l'inverse de la dilution de l'échantillon de plasma induisant 50% de lyse. Pour déterminer cette valeur, une dilution sériée du plasma est réalisée.

Equipement :

- Spectrophotomètre (FLUOstar® Omega Plate Reader, BMG LABTECH)
- Centrifugeuse (Eppendorf™, 5810R)

Réactifs et solutions :

- Tampon Veronal (Biomérieux, n° 72171)
- Hématies de lapin
- Solution de tampon veronal :
 - Diluer 950 mg de poudre de tampon veronal dans 100 mL d'eau milliQ (conserver à 4°C).
- Solution d'hématies de lapin 3% :
 - Centrifuger le sang de lapin (10 min, 500 g, 4°C).
 - Enlever le plasma à la pipette pasteur.
 - Diluer les hématies 2X dans le tampon Veronal à 4°C, mélanger par inversion.
 - Centrifuger (10 min, 500g, 4°C).
 - Enlever le surnageant.
 - Répéter 2 fois les étapes 4 à 6 pour laver les hématies.
 - Diluer les hématies 2X dans le tampon Veronal à 4°C.

Le sang doit être centrifugé rapidement après le prélèvement. Les hématies doivent être utilisées dans les trois jours et **ne doivent pas** être mises sur glace, **mais peuvent être conservées au frigo**. 3 mL de sang total donnent 2 mL d'hématies à 50%.

Protocole :

- Laisser décongeler les échantillons de plasma sur glace puis les vortexer.
- Dans une plaque 96 puits à fond rond, de type « U-Shape », avec un volume final de 60µL, réaliser les dilutions sériées reprises dans le tableau ci-dessous pour chaque échantillon en duplicata :

Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10	11	12
Dilution	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560		1/5120	60µL Eau milliQ	60µL Tampon Veronal

Les puits 11 et 12 servent de contrôles positif (eau MilliQ) et négatif (tampon Veronal).

- Juste avant utilisation, préparer une solution d'hématies à 3 % dans du tampon Veronal.
- Ajouter 10 µL d'hématies 3% dans chaque puits, y compris les contrôles.

- Incuber 2h à température ambiante ($\pm 20^{\circ}\text{C}$) sur un agitateur à 300 RPM.
- Mesurer la turbidité de la plaque à 615 nm au spectrophotomètre.

Traitement des résultats :

- Calculer la valeur de DO correspondant à 50% de lyse : $\frac{DO_{\text{contrôle positif}} - DO_{\text{contrôle négatif}}}{2}$
- Trouver entre quelles valeurs de dilution cette valeur de DO se trouve.
- Calculer la pente et l'ordonnée à l'origine sur base des deux valeurs de Do obtenues à ces deux dilutions.
- Calculer la valeur d'AC50 : $Ach50 = (DO \text{ correspondant à } 50\% \text{ de lyse} * \text{pente}) + \text{ordonnée à l'origine}$

5.1.4. Mesure de l'activité de la peroxydase plasmatique

D'après Quade and Roth (1997)

Principe : La peroxydase catalyse l'oxydation de différents substrats avec du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le substrat utilisé ici est le Tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB). La production de sa forme oxydée va être proportionnelle à l'activité de la peroxydase et peut être suivie en mesurant l'absorbance à 652 nm. La réaction est stoppée par l'ajout d'une solution d'acide sulfurique. L'absorbance est lue à 450nm et est proportionnelle à la quantité de TMB oxydée.

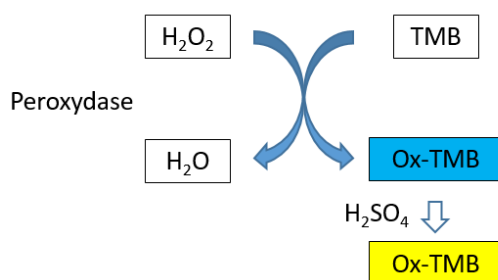


Figure 10: Réaction d'oxydation du TMB par l'activité de la peroxydase plasmatique

Equipement :

- Spectrophotomètre (FLUOstar® Omega Plate Reader, BMG LABTECH)

Réactifs et solutions :

- Tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB) (Sigma: T8768-1G)
- H₂O₂ 30 % (Sigma: H1009-100ML)
- H₂SO₄ 97% (Merck: 1007310510)
- HBSS no calcium, no magnesium (Life Tech : 14170112)
- Solution réactionnelle (5 mM H₂O₂, 20 mM TMB) :
 - Ajouter 62,65 mg TMB à 5,15 µL H₂O₂ 30 % et 10 mL H₂O
- Solution d'acide sulfurique (4M) :
 - Mélanger 38,88 mL H₂O à 11,11 mL H₂SO₄ (toujours mettre l'acide dans l'eau).

Protocole :

- Décongeler les échantillons en les gardant sur glace puis les vortexer.
- Sur plaque ajouter en triplicata:
 - Les blancs : 5 µL d'eau
 - Les échantillons : 5 µL de plasma
- Ajouter 70 µL d'HBSS dans tous les puits.
- Ajouter 25 µL de solution réactionnelle et déclencher le minuteur dès le 1^{er} puits.
- Incuber pendant 2min.
- Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 450 nm.

Traitement des résultats :

- Faire la moyenne des triplicatas.
- Soustraire les blancs à la moyenne des triplicatas des échantillons.
- Multiplier par 200 pour avoir l'activité moyenne par mL.
- Refaire les échantillons dont l'absorbance moyenne est >2 en les diluant 2 fois.

5.2. Système reproducteur

5.2.1. Dosage des stéroïdes sexuels plasmatiques par RadioImmunoAssay (RIA)

D'après Fostier et Jalabert (1986)

Principe : Le dosage radio-immunologique est basé sur la compétition entre une quantité d'hormone froide (H°) variable et inconnue (échantillon) et une quantité déterminée d'hormone marquée (H^*) par un isotope radioactif (H^3 ou I^{125}) vis à vis d'un anticorps (As) qui lui est spécifique.

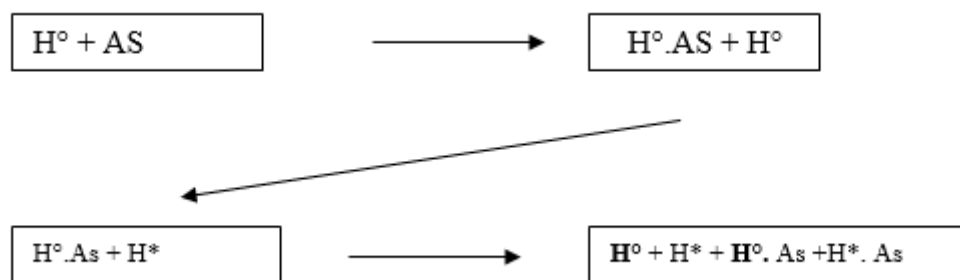


Figure 11: Principe de la RIA

L'hormone froide est sous deux formes : liée à l'anticorps ou libre. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée restant constante, toute augmentation d'hormone froide entraîne une réduction d'hormone marquée qui se fixe sur l'anticorps. En séparant l'hormone marquée liée à l'anticorps de l'hormone marquée libre, on peut, par la mesure de la radioactivité de l'une de ces fractions, calculer la concentration en hormone froide dans l'échantillon. Une courbe standard permet d'établir le pourcentage d'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps en présence d'une quantité progressivement croissante d'hormone froide.

a) Extraction

Equipement :

- SpeedVac (Jouan)
- Tubes en verre de 10mL et bouchons

Réactifs et solutions :

- Ethanol absolu (Merck : 1070172511)
- Cyclohexane (Merck : 1028171000)
- Acétate d'éthyle (Merck : 1007891000)
- Solution de cyclohexane et d'acétate d'éthyle (1:1) (SOUS HOTTE) :
 - Mélanger un volume équivalent de cyclohexane et d'acétate d'éthyle.

Protocole :

- Préparer deux séries de tubes en verre annotés pour chaque échantillon.
- Décongeler les échantillons sur glace puis les vortexer.
- Transférer 25 μ L de plasma par hormone à doser dans le tube en verre correspondant.
- Sous hotte, ajouter dans chacun des tubes de la 1^{ère} série 1 mL de cyclohexane-éthyle acétate à l'aide de la pipette à piston en verre.
- Boucher les tubes et vortexer 1min.
- Incuber 2 heures à -20°C .

- En laissant les tubes sur glace, récupérer par retournement le surnageant de la série 1 dans les tubes correspondants de la série 2.
- Ajouter 1ml de cyclohexane-éthyle acétate sur les culots restants de la série 1.
- Mettre les deux séries 2h à -20°C.
- Sous hotte, pooler les deux séries.
- Evaporer l'entièreté du liquide à 35°C dans un SpeedVac (+/- 1 h).
- Re-suspendre dans 150 µL d'éthanol absolu et vortexer 1min.
- Boucher les tubes et conserver à -20°C.

b) Dosage des hormones

Matériel :

- Compteur à scintillation (Beckman Counter LS6500 Liquid Scintillation Counter)
- Tubes en polypropylène et bouchons
- Centrifugeuse (EppendorfTM, 5810R)

Réactifs et solutions :

- Anticorps (E2 : CER-groupe : AS.A.9 ; T : CER-groupe : AS.A.3)
- Traceur (E2 : PerkinElmer : NET517250UC ; T : PerkinElmer : NET370250UC)
- 17β-œstradiol (Sigma-Aldrich : E8875-1G)
- Testostérone (Sigma-Aldrich : 86500-1G)
- Gélatine
- Polyéthylène Glycol 6000 (Merck : 8074915000)
- Liquide scintillant
- Tampon phosphate (TP) (pH 7,25) :
 - Préparer 3 litres de TP contenant :
 - 1,20 g L⁻¹ de NaH₂PO₄ anhydre
 - 1,42 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ anhydre
 - 9,0 g L⁻¹ de NaCl
- Tampon phosphate gélatiné (TPG) :
 - Ajouter 1g L⁻¹ de gélatine dans le TP et chauffer à 60°C pour dissoudre la gélatine.
- Polyéthylène glycol 25% (PEG) :
 - Ajouter 250g de Polyéthylène Glycol 6000 dans 750 mL de TP.
- Solution mère (M) (standard d'hormone non marquée) :
 - Diluer 100 µg mL⁻¹ de l'hormone d'intérêt dans de l'éthanol absolu (conserver plusieurs mois à -20°C).
- Solution de traceur :
 - Diluer le traceur 50X dans de l'éthanol absolu (conserver plusieurs mois à -20°C).
 - Diluer la solution de traceur 50X dans du TP pour atteindre (conserver 1 semaine à 4°C) :
 - 10 000 CPM pour la 11-ketotestostérone et la testostérone
 - 8000 CPM pour l'œstradiol
- Solution d'anticorps :
 - Re-suspendre les anticorps lyophilisés dans 10 mL d'eau distillée (conserver 1 semaine à 4°C).

Protocole :

- Mettre les extraits d'échantillons au speedvac à 35°C afin d'évaporer l'éthanol (15 min).
- Pour chaque stéroïde préparer une droite d'étalonnage :

- Solution A : 0,1 mL de solution de stéroïde M porté à 10 ml avec du TPG ($=1\mu\text{g mL}^{-1}$)
- Solution B : 1 mL de solution A porté à 10 mL avec du TPG ($=100\text{ ng mL}^{-1}$)
- Solution C : 1 mL de solution B porté à 10 mL avec du TPG ($= 10\text{ ng mL}^{-1}$)
- Solution D : 1 mL de solution C porté à 10 mL avec du TPG ($= 1\text{ ng mL}^{-1}$)
- Préparer 15 tubes annotés de 3000 à 0 et les remplir selon le tableau ci-dessous. Chaque dose correspondant à un point de la droite de calibration.

Dose (pg) = Nom du tube	Volume de TPG (μl)	Volume de solution B (μl)	Volume de solution C (μl)	Volume de solution D (μl)
3 000	700	300		
2 500	750	250		
2 000	800	200		
1 500	850	150		
1 000	900	100		
600	400		600	
400	600		400	
200	800		200	
150	850		150	
100	900		100	
50	500			500
25	750			250
12	880			120
5	950			50
0	1 000			0

- Vortexer les tubes et distribuer 100 μL en triplicata dans des tubes en polypropylène pour chaque point de la droite.
- Ajouter 400 μL de TPG dans les échantillons évaporés et les vortexer.
- Distribuer 100 μL des extraits en triplicata dans des tubes en polypropylène.
- Préchauffer l'incubateur à 37 C°.
- Ajouter 100 μL de la solution d'anticorps à tous les triplicatas de la courbe et des échantillons.
- Ajouter 100 μL du traceur correspondant à tous les triplicatas de la courbe et des échantillons.
- Préparer 3 tubes supplémentaires pour l'évaluation de la radioactivité résiduelle (Background) contenant 200 μL de TPG et 100 μL de traceur.
- Préparer 3 tubes pour l'évaluation de la radioactivité totale (TC) contenant 100 μL de traceur et boucher ces tubes.

Tableau récapitulatif :

Réactifs	Standard	Echantillon	Background	TC
TPG	-	-	200	-
Standard/Echantillon	100	100	-	-
Anticorps	100	100	-	-
Traceur	100	100	100	100

- Vortexer tous les tubes 1min.
- Incuber pendant 1h à 37°C.
- Incuber pendant 2h à 4°C.
- Ajouter 2 mL de PEG dans tous les tubes excepté les TCs.
- Incuber une nuit, soit 12 h à 4°C.
- Centrifuger (30 min, 3200 g, 10°C).
- Aspirer le surnageant et ajouter 2 ml de PEG (sauf TC).
- Centrifuger (20min, 3200 g, 10°C).
- Aspirer le surnageant et retourner les tubes pour les vider.
- Reprendre tous les tubes y compris les TCs avec 100 µL d'éthanol absolu et vortexer 1min.
- Ajouter 2 mL de liquide scintillant dans chacun des tubes y compris les TCs.
- Boucher les tubes et vortexer 1 min
- Passer les tubes au compteur à scintillation.

Traitement des résultats :

- Calculer la moyenne des triplicatas (en CPM) pour chaque échantillon et point de la droite de calibration.
- Calculer le pourcentage de liaison de chaque point de la droite de calibration par rapport au point 0 : %B/B0.
- Etablir une droite de régression log logit de type $y = ax + b$ pour déterminer la concentration en hormone dans les échantillons.

5.2.2. Vitellogénine

Le dosage de la vitellogénine plasmatique est réalisé avec le kit ELISA Salmonid vitellogenin (TECOmedical AG). Tous les réactifs sont fournis dans le kit.

Principe :

La concentration en vitellogénine dans le plasma est dosée par ELISA. Les échantillons de plasma sont incubés dans une plaque 96 puits dont les puits ont préalablement été recouverts d'anticorps anti-vitellogénine. Tout ce qui ne s'est pas lié aux anticorps est retiré. On ajoute ensuite des anticorps polyclonaux conjugués à une peroxydase HRP (Horseradish peroxydase). La vitellogénine est ainsi prise « en sandwich » entre les deux couches d'anticorps. On ajoute alors du TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine), le substrat de la HRP. Le TMB va être transformé en un produit coloré. La réaction est stoppée et la DO mesurée 450nm. La DO est directement proportionnelle à la quantité de vitellogénine contenue dans l'échantillon.

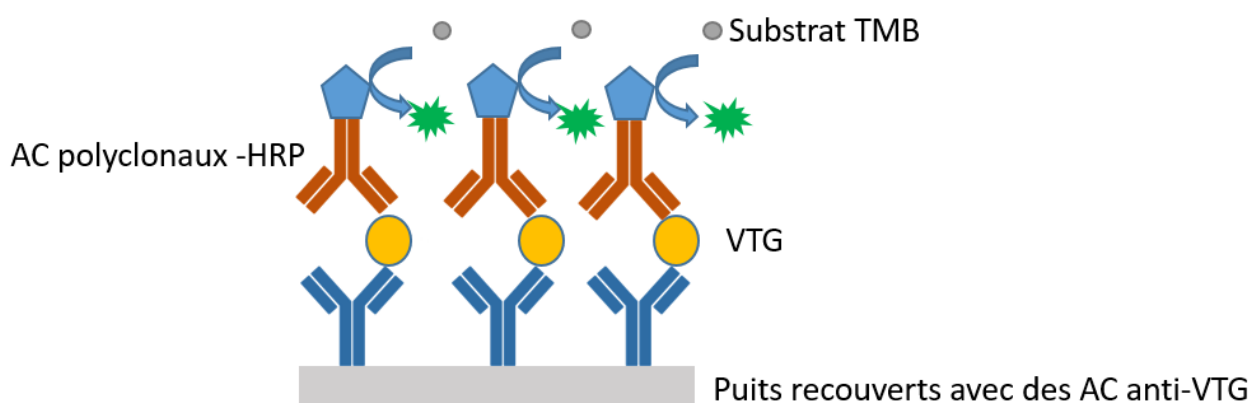


Figure 12: Schéma du principe de l'ELISA en sandwich

Equipement :

- Spectrophotomètre (FLUOstar® Omega Plate Reader, BMG LABTECH)

Réactifs et solutions :

- Tampon de dilution
- Contrôle 1
- Contrôle 2
- Solution standard de vitellogénine (35 ng mL⁻¹)
- Tampon de rinçage (diluer 50 X avec de l'eau MilliQ)
- Solution matrice
- Conjugué HRP
- Tampon pour conjugué HRP
- Solution de TMB
- Solution STOP

Protocole :

- Ajouter 500 μL de tampon de dilution dans le tube contenant le stock de vitellogénine (Standard A).
- Incuber 30 min à température ambiante puis vortexer 10s.
- Pendant que le Standard A incube, ajouter 500 μL de tampon de dilution dans les tubes contrôle 1 et contrôle 2.
- Incuber 30 min à température ambiante puis vortexer 10s.
- Diluer, si besoin, les échantillons dans le tampon de dilution.
- Pour créer la gamme étalon, suivre le tableau ci-dessous :

Etalon	Tampon de dilution (μL)	Standard (μL)
Standard A (35 ng mL^{-1})	500	-
Standard B ($11,7 \text{ ng mL}^{-1}$)	200	100 μL de standard A
Standard C ($3,9 \text{ ng mL}^{-1}$)	200	100 μL de standard B
Standard D ($1,3 \text{ ng mL}^{-1}$)	200	100 μL de standard C
Standard E ($0,4 \text{ ng mL}^{-1}$)	200	100 μL de standard D
Standard F ($0,0 \text{ ng mL}^{-1}$)	200	-

- Vortexer chaque solution pendant 10 s avant d'en prélever les 100 μL .
- Dans tous les puits de la plaque 96 puits, ajouter 50 μL de solution Matrice.
- Ajouter 50 μL en duplicata des éléments suivants :
 - Contrôles 1 et Contrôle 2
 - Les 6 points de la droite de calibration
 - Les échantillons (40 maximum)
- Incuber 2 h à température ambiante (20-28°C) sur un agitateur (300 RPM).
- Diluer 60 μL de conjugué HRP dans 12 mL de tampon pour conjugué HRP.
- Vider la plaque et la sécher en la retournant sur du papier absorbant.
- Ajouter avec la pipette multicanaux 350 μL de tampon de lavage dans tous les puits.
- Répéter ces étapes de lavage 5X.
- Vider la plaque et la sécher en la retournant sur du papier absorbant.
- Ajouter à la pipette multicanaux 100 μL de conjugué HRP préalablement dilué dans tous les puits.
- Fermer la plaque et incuber 30 min à température ambiante (20-28°C) sur un agitateur (300 RPM).
- Vider la plaque et la sécher en la retournant sur du papier absorbant.
- Ajouter avec la pipette multicanaux 350 μL de tampon de lavage dans tous les puits.
- Répéter ces étapes de lavage 5X.
- Vider la plaque et la sécher en la retournant sur du papier absorbant.
- Ajouter à la pipette multicanaux 100 μL de TMB dans tous les puits.
- Fermer la plaque et incuber 30 min dans le noir à température ambiante (20-28°C) sur un agitateur (300 RPM).
- A l'aide de la pipette multicanaux, stopper la réaction enzymatique en ajoutant 100 μL de la solution STOP dans chaque. Puits.
- Mesurer la densité optique dans chaque puits à 450 nm avec un spectrophotomètre.

Traitement des résultats :

- Mesurer la densité optique (DO) moyenne des échantillons.
- La relation entre la DO et la concentration en VTG est une équation du type « 4-parameter » et a pour équation :

$$x = C \left(\frac{A - D}{y - D} - 1 \right)^{\frac{1}{B}}$$

Les paramètres de cette équation (A, B, C, D) sont déterminés sur base de la droite de calibration (cette dernière permet en effet de tracer le graphe de la DO ~ VTG).

- Calculer l'équation de la droite de calibration (DO~VTG) qui permet de déterminer l'équation de la VTG~DO
- Calculer la concentration en VTG dans les échantillons sur base de leur DO

Ces calculs peuvent facilement être réalisés sur le site <https://www.elisaanalysis.com/>

5.3. Système nerveux

5.3.1. Activité de l'acétylcholinestérase (AChE) musculaire

Selon Ellman et al. (1961)

Principe : La méthode d'Ellman consiste en l'utilisation de l'Acétylthiocholine iodide (ASCh) en tant que substrat. Le produit de la réaction est la thiocholine (SCh). La réaction de la thiocholine avec le DTNB (Dithiobis-2-nitrobenzoic acid) produit alors un composé jaune : le TNB (ou S Thio- 2- N nitroBenzoate) absorbant à 412 nm. Plus l'absorbance du TNB mesurée à l'aide du spectrophotomètre est importante, plus l'activité enzymatique de l'acétylcholinestérase est élevée.

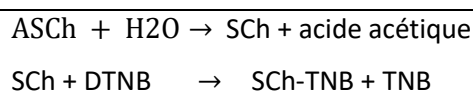


Figure 13: Réaction catalysée par l'AChE

Equipement :

- Homogénéisateur à billes (Bullet Blender Storm 24, NextAdvance)
- Sonicateur (Virsonic Cell Disrupter model no 150 Virsonic® the VIRTIS®CO)
- Spectrophotomètre (FLUOstar® Omega Plate Reader, BMG LABTECH)
- Centrifugeuse (Eppendorf™, 5810R)
- Billes d'homogénéisation en zirconium (NextAdvance)

Réactifs et solutions :

- Inhibiteur de protéase (Thermofisher scientific : 78437)
- DNTB (Roth : 6334.1)
- Acétylcholine iodide (Sigma : A7000-5G)
- BSA
- Tampon d'homogénéisation (pH 7,5) :
 - Ajouter 0,6799 g K_2HPO_4 à 200 mL d' H_2O milliQ. La solution se conserve plusieurs jours au frigo. Juste avant utilisation, ajouter l'inhibiteur de protéase.
- Tampon sodium-phosphate (pH 7,4) :
 - Ajouter 1,4 g Na_2HPO_4 et 0,4155 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ à 250 ml de H_2O milliQ.
- Solution d'Ellmann ou DNTB :
 - Ajouter 66 mg de DTNB à 10 mL de tampon sodium phosphate.
 - Diluer 10 X dans du tampon sodium phosphate juste avant utilisation.
- Solution d'acétylcholine iodide 30 mM :
 - Ajouter 87 mg de d'acétylcholine iodide à 10 ml de tampon sodium-phosphate.
- Solution de Bovine Serum Albumine (BSA) :
 - Préparer une solution de 2 mg mL^{-1} de BSA dans de l'eau milliQ (se conserve plusieurs mois à -20°C).

Protocole :

a) Homogénéisation des échantillons de muscle

- Peser 100 mg de muscle.

- Faire une dilution 5X dans du tampon d'homogénéisation.
- Homogénéiser à l'aide de l'homogénéisateur à billes 2 fois 30 s (remettre les échantillons sur glace entre les deux homogénéisations).
- Soniquer 1 fois à 40 Hz, 5s.
- Centrifuger (10min, 10 000 g, 4°C).
- Faire deux aliquotes du surnageant et jeter le culot. Une aliquote servira à la mesure de l'activité enzymatique et l'autre au dosage de la quantité de protéine totale. Les aliquotes peuvent être conservées à -80°C avant analyse.

b) Dosage de l'activité de l'AChE

- Laisser les échantillons dégeler sur glace.
- Vortexer les échantillons.
- Diluer 10X les échantillons dans du tampon d'homogénéisation.
- Mettre 15 µL d'échantillon en triplicata sur la plaque (vortexer avant chaque manipulation).
- Ajouter 250 µL de la solution de DTNB diluée 10 X avec la multipipette et homogénéiser par up/down.
- Ajouter 15 µL d'acétylcholine iodide avec la multipipette et homogénéiser par up/down.
- Mesurer le changement d'absorbance par minute à 412 nm pendant 10min.

c) Dosage de la quantité de protéine totale par la méthode de Pierce

- Laisser les échantillons dégeler sur glace puis les vortexer.
- Diluer les échantillons 10 X dans de l'eau milliQ.
- A partir de la solution stock de BSA (2 mg mL⁻¹), préparer les points de la droite de calibration suivante en la diluant dans de l'eau milliQ (vortexer les solutions de BSA entre chaque manipulation) :

A : BSA 2 mg mL⁻¹

B : BSA 1,6 mg mL⁻¹

C : BSA 0,8 mg mL⁻¹

D : BSA 0,4 mg mL⁻¹

E : BSA 0,2 mg mL⁻¹

F : BSA 0 mg mL⁻¹

- Dans une plaque 96 puits à fond plat, mettre en triplicata :
 - Les échantillons : 10 µL de plasma dilué 10X
 - Les 6 points de la droite de calibration : 10µL des solutions A à F
- Ajouter 150 µL de réactif de Pierce dans chaque puits et mélanger par up/down.
- Incuber 20 min à température ambiante à l'abris de la lumière.
- Mesurer l'absorbance au spectrophotomètre à 660 nm.

Traitement des résultats :

- Calculer la pente par min pour chaque réplicat.
- Calculer la pente moyenne pour les triplicatas.
- Calculer la concentration moyenne en protéines dans chaque échantillon.
- Calculer l'activité de l'acétylcholinestérase selon la formule suivante :

$$\text{Activité AchE} = \frac{\text{Pente } \frac{\text{Absorbance}}{\text{minute}} \times \text{volume réactionnel total (0,280)} \times \text{dilution (50)}}{\text{volume d'échantillon (0,015)} \times \epsilon \text{ DTNB (0,0136)} \times \text{concentration en protéines } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right)}$$

5.4. Marqueurs de détoxification et de stress oxydant

L'ensemble des analyses des marqueurs de détoxification et de stress oxydant ont été réalisées à l'INERIS. Les protocoles décrits ci-dessous ont été rédigés par Audrey CATTEAU et proviennent du guide méthodologique développé pour l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Les mesures de marqueurs de détoxification et de stress oxydant sont réalisées en microplaque 384 puits et font appel à des techniques de lecture colorimétriques ou fluorimétriques à l'aide d'un lecteur multimode (Synergy H4, BioTek Instrument). Toutes les étapes de pipetage (dilutions et ajouts de réactifs) sont effectuées à l'aide d'un robot de pipetage (Evo150, Tecan). Tous les dosages sont réalisés en duplicata.

5.4.1. Récupération de la fraction S9

Protocole :

- Mettre sous tension la centrifugeuse et la mettre à refroidir à +4°C.
- Récupérer du congélateur -80°C les échantillons à traiter et les stocker provisoirement au congélateur -20°C. Sortir les échantillons du congélateur au fur et à mesure des centrifugations.
- Disposer 24 échantillons sur un carrousel du broyeur à billes.
- Lorsque les échantillons sont décongelés mais encore froids, placer le carrousel sur l'axe de broyage. Attention à le positionner correctement sous peine de voir le carrousel éjecté de l'axe.
- Lancer le broyage (2 x 10 sec à 6000 rpm).
- Aussitôt mettre à centrifuger les échantillons homogénéisés à 10000 g pendant 15 min à +4°C.
- En fin de centrifugation placer les échantillons sur glace.
- Récupérer le surnageant (= fraction S9) dans des minitubes 1,2 mL répartis sur leur grille de positionnement. Le maintien au froid est réalisé grâce à un support en aluminium préalablement stocké à +4°C.
- À l'aide du robot, effectuer une aliquote dans une 2^{ème} boîte de minitubes et congeler immédiatement ce 2^{ème} aliquote.
- Conserver à +4°C l'aliquote de travail qui va servir à doser les protéines totales.

5.4.2. Dosage des protéines totales

D'après Bradford (1976)

Principe :

Le dosage des protéines repose sur une méthode colorimétrique faisant appel au kit « Bio-Rad Protein Assay ». Le bleu brillant de Coomassie G250 en solution acide réagit avec les protéines en formant une coloration bleue relativement stable. Le produit de la réaction absorbe entre 465 nm et 595 nm.

Le robot de pipetage prélève et dilue les échantillons selon une liste de travail Excel, prépare une gamme étalon de BSA à partir d'une aliquote de BSA conservée congelée, transfère en plaque 384 puits les échantillons dilués et la gamme de standards, ajoute le réactif de Bradford.

Réactifs et solutions :

- Eau pure (machine Elix)
- Standard de BSA. Aliquotes d'environ 500 µL à 1000 µg mL⁻¹. (-20°C, stable pendant 6 mois)
- Tampon phosphate 100 mM pH 7,4 (+4°C, stable 1 an)
- Réactif Bio-Rad (solution acide de bleu brillant de Coomassie G250) (+4°C, stable 1 an) : diluer le réactif Bio-Rad au 1/5 dans de l'eau. Préparer 95 µL par puits + 6 mL de volume mort qui correspond au volume mort du bac à réactif.

$$\text{Volume réactif} = [(\text{nb échantillons} + 4 \text{ standards}) * 2 * 95 \mu\text{L}] + 6000 \mu\text{L}$$

Protocole :

- Le robot prélèvera 5 µL d'échantillon selon l'ordre établi dans le fichier Excel préalablement rempli. Il diluera d'abord ces 5µL d'échantillon au 10X en deepwell avant de les diluer au 1X en microplaque 96 selon le facteur de dilution renseigné au lancement du script.
- En parallèle il réalisera une gamme étalon à partir de la solution mère de BSA.
- Le robot déposera en microplaque 384 transparente 5 µL d'échantillon dilué (1X) ou de standard par puits auquel il ajoute 95 µL de réactif.
- Agiter ensuite la plaque de lecture 1 à 2 min à 900 rpm sur un agitateur (MixMate Eppendorf).
- Centrifuger la plaque afin d'égaliser la surface des ménisques (un short spin de quelques secondes à 300 g suffit).
- Lire la plaque 10 min après l'ajout du réactif sur le lecteur de plaque (Synergy H4 BioTek). La coloration est stable pendant environ 30 min.
- Vérifier que le % de CV des absorbances à 570 nm des échantillons soit inférieur à 10 %. En cas de CV élevé mélanger les 2 réplicats à l'aide d'une aiguille et relire la plaque. Des ménisques « en biais » peuvent engendrer des longueurs de trajet optique différentes entre les réplicats et ainsi influencer sur le résultat final. Le mélange avec l'aiguille égalise ces ménisques.

5.4.3. Activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase hépatique (EROD)

D'après Flammarion et al. (2002)

Principe :

La 7-éthoxyrésorufine (7-ERF) est transformée en un composé fluorescent, la résorufine, par la 7-éthoxyrésorufine-o-dééthylase (EROD) en présence d'un cofacteur, le NADPH réduit (Figure 14). L'apparition de résorufine est mesurée au spectrofluorimètre à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La concentration en produit formé est déterminée sur la base d'une gamme de résorufine standard. Le résultat est exprimé en pmole de résorufine formée par minute par mg de protéines totales.

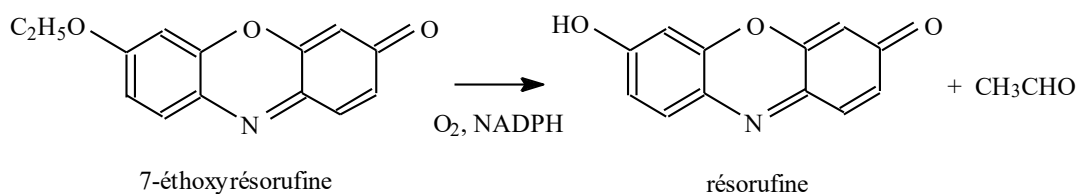


Figure 14 : Réaction catalysée par l'EROD

Réactifs et solutions :

- Tampon phosphate 100 mM pH 7,4
- 7-éthoxyrésorufine (PM=241) : la 7-ERF (Sigma réf E3763) est diluée dans du DMSO (solution saturée) en suspendant les 5 mg de poudre (solution stable à température ambiante pendant 1 an, à l'abri de la lumière. Préparer une solution de travail à 8 μM diluée dans du tampon phosphate.
- Solution de NADPH à 11,52 mM (PM=833,4) : préparer une solution de travail de NADPH à 9,6 mg/ml dans de l'eau ultra pure. Attention à la stabilité de la solution ! Protéger de la lumière. Se conserve au maximum 2 jours à 4°C.
- Solution de Résorufine (PM=235,2) : dissoudre quelques mg de résorufine (-20°C, frigo) dans du DMSO (solution saturée), bien agiter pour atteindre environ 2 à 4 mM. Calculer la molarité de cette solution mère. Aliquoter et congeler à -20°C. Il est possible de décongeler/recongeler les aliquotes plusieurs fois sans dégradation de la solution si celle-ci a été correctement protégée de la lumière et recongelée rapidement. Les aliquotes utilisées dans le cadre des dosages du programme DIADeM sont à 2,346 mM.

Protocole :

La mesure s'effectue dans des microplaques noires à fond plat de 384 puits.

- Décongeler dans la glace des S9 de foie dont la teneur en protéine a été préalablement déterminée.
- Dilution des échantillons selon la charge protéique préalablement établie lors des mises au point du dosage. Attention, la charge protéique optimale est dépendante de l'espèce. Généralement il s'agit d'une fourchette dans laquelle le dosage est valide. Dans cette fourchette, l'activité EROD mesurée est linéaire en fonction de la quantité de protéines (pas d'effet matrice). Dans notre cas entre 5 et 10 g L⁻¹ de protéines totales.
- Dépôt de la gamme standard : 100,6 μL /puits de standard sont déposés par le robot en duplicata à 0; 0,002346; 0,02346; 0,2346; 2,346; 23,46 μM soit (0; 0,236; 2,36; 23,6; 236; 2360 pmol/puits)

- Dépôt des échantillons (duplicatas) : Le robot dépose dans l'ordre (100,6 µL final par puits) :
 - 4,6 µl d'échantillon ou de tampon
 - 101,2 µl de 7-ERF à 8 µM
 - 4,6 µl de solution de NADPH à 11,52 mM (concentration finale 0,5 mM)

La réaction a lieu à température ambiante. La lecture est effectuée en fluorimétrie (BioTek SynergyH4) pendant 30 minutes, aux longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectives de 530 et 590 nm (bande passante de 20 nm). Dans ces conditions, l'augmentation de fluorescence est linéaire jusqu'à 10-15 minutes.

Traitement des résultats :

Modéliser graphiquement les cinétiques de formation de résorufine selon une fonction linéaire ($y=ax+b$). Prendre le facteur a comme paramètre de pente initiale, exprimée en unités de fluorescence par minute ($UF \text{ min}^{-1}$). La rapporter en pmol de RF par minute et par mg de protéines.

5.4.4. Activité glutathion-S-transférase hépatique (GST)

D'après Habig et al. (1974)

Principe :

Les glutathion S-transférases (GST) sont des enzymes de phase II. Responsables de la complexation avec le glutathion des métabolites réactifs générés par les cytochromes P450. Leur dosage utilise le principe de la chaîne réactionnelle suivante :



Figure 15: Réaction catalysée par la Glutathion-S-transférase

On se place à une longueur d'onde $\lambda=340$ nm à laquelle le thioether formé absorbe intensément.

Réactifs et solutions :

- Préparer une solution de CDNB à 42 mM (8,509 mg mL⁻¹) dans de l'acétone (+4°C, stable 1 semaine)
- Préparer dans l'eau une solution à 42 mM de GSH (12,906 mg/ml) (+4°C, stable 1 semaine)
- Préparer une solution de tampon phosphate à 0,1 M pH 6,5 (+4°C, stable 1 an)
- Etalon GST d'origine équine à aliquoter dans le tampon phosphate à 200 U mL⁻¹.

Protocole :

- Préparer un mélange réactionnel pour une plaque de 384 puits complète (mix). Ce mélange inclut les volumes morts nécessaires. Concentrations finales : GSH 1 mM ; CDNB 1 mM.

	Mix 1 plaque 384
Tp Phosphate 0,1 M pH 6,5	24343 μ L
CDNB 42 mM	1329 μ L
GSH 42 mM	1329 μ L

- Le robot dilue les échantillons en les normalisant par leur charge protéique à 0,2 g/L de protéines totales.
- Le robot prépare une gamme de GST de 0 à 4 U mL⁻¹ préparée à partir de l'étalon GST à 200 U mL⁻¹ (congélateur -20°C) dans du tampon phosphate pH 6,5.
- Dépôt par le robot de 55 μ L d'échantillon (ou de standard) suivi de 45 μ L de mélange réactionnel, en plaque 384 puits transparente. Dosage réalisé en duplicata, 176 échantillons maximum par plaque.
- Lecture au SynergyH4 (Biotek) en absorbance à 340 nm en cinétique avec lecture de la plaque complète toutes les 22 secs. Introduire immédiatement la plaque dans le lecteur préalablement thermostaté à 25°C. La réaction est linéaire pendant les trois premières minutes.

Traitement des résultats :

La partie linéaire de la croissance de l'absorbance (correspondant à l'apparition du thioether) permet de définir une pente maximale (Abs min^{-1}) calculée par régression linéaire. Une droite d'étalonnage est alors obtenue en exprimant la variation d'absorbance par minute (Abs min^{-1}) en fonction de la concentration en GST. La gamme est linéaire de 0 à 4 U mL^{-1} . L'activité des différents échantillons est calculée à partir de cette gamme étalon de GST elle est rapportée à la charge protéique de l'échantillon (U g^{-1} de protéine de S9).

5.4.5. Activité glutathion-péroxydase hépatique (GPx)

D'après Paglia and Valentine (1967)

Principe :

Présente au niveau cytosolique (PL GPx et Se GPx) et dans la matrice mitochondriale (Se GPx), la GPx catalyse la réduction des hydroperoxydes tels que le peroxyde d'hydrogène. Cette réduction nécessite la présence du glutathion réduit (GSH) comme donneur d'hydrogène (Figure 16).

L'activité de la GPx est dosée grâce au couplage d'une réaction de régénération du GSH dans laquelle le cofacteur NADPH intervient comme donneur d'hydrogène. En rapportant la vitesse de disparition du NADPH à 340 nm à la concentration de standards de GPx présents dans le mélange réactionnel, il est possible de doser l'activité GPx présente dans des échantillons biologiques.

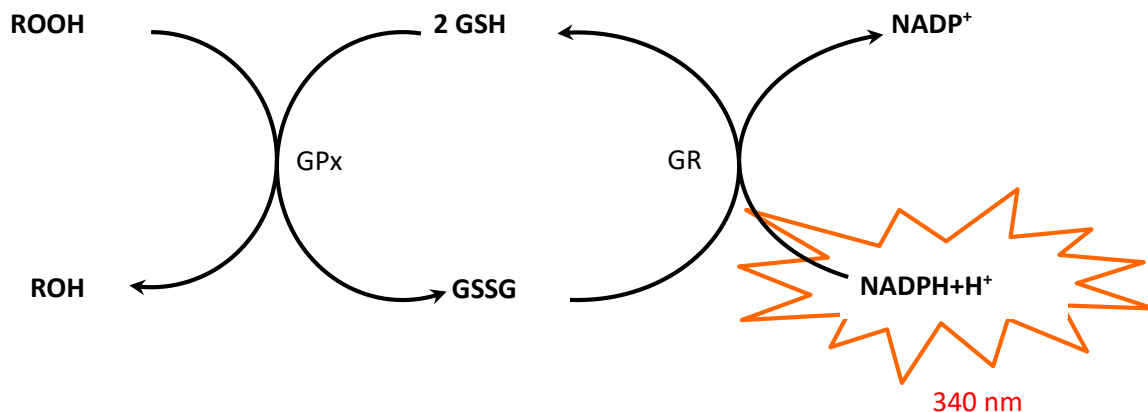


Figure 16 : Réaction catalysée par la Glutathion-péroxydase

Réactifs et solutions :

- Tampon phosphate 100 mM pH 7,6 (+ 4°C).
- Solution de glutathion réduit (GSH) 30 mM dans Tp Phosphate.
- Solution de NADPH 3,6 mM dans NaHCO₃ 0,5 %.
- Solution de glutathion réductase 30 U mL^{-1} dans Tp Phosphate.

- Solution d'hydroperoxyde de cumène 0,552 mM (+ 4°C).

Protocole :

- Préparer le mélange réactionnel dans les proportions suivantes. Tenir compte dans la préparation du mix d'un volume mort de 5 mL.

Mix	1 puits (µL)	½ plaque 384
Tp phosphate	46,6	13173
GSH	3,32	938,5
NADPH	3,32	938,5
GR	3,32	938,5

Du fait de la vitesse élevée de métabolisation du substrat par l'enzyme, il n'est possible de travailler en plaque 384 puits que sur une moitié de plaque. En effet, le lecteur de plaque nécessite 22 secs pour la lecture d'une plaque 384 complète. Or, cet intervalle de temps ne suffit pas pour obtenir des courbes cinétiques complètes. Nous diminuons donc le nombre de puits à lire pour obtenir des intervalles de temps réduits permettant d'exploiter une cinétique complète.

- Le robot dépose 10 µL d'échantillon ou de standard dans un puits de microplaque transparente (gamme de GPx préparée par le robot : 0 – 0,0625 - 0,125 – 0,25 – 0,5 U/ mL). Il dépose ensuite 56,6 µL du mélange réactionnel puis 33 µL de cumène.
- La plaque est rapidement insérée dans le lecteur et les mesures d'absorbance à 340 nm en cinétique démarrent.
- Tracer Abs=f(temps) et calculer la pente maximale (Vmax).
- Tracer la droite de régression de gamme étalon de GPx : $\text{Abs min}^{-1} = f(\text{conc GPx})$.

5.4.6. Glutathion total hépatique (GSH)

D'après Vandeputte et al. (1994)

Principe :

Le dosage des différentes formes de glutathion est basé sur la réaction entre le groupement –SH du glutathion et le DTNB qui forme un composé absorbant à 405 nm (Figure 17).



Figure 17: Couple d'oxydoréduction : glutathion oxydé (GSSG) et glutathion réduit (GSH)

Réactifs et solutions :

- Tampon Phosphate pH 7,4 100 mM-EDTA 10 mM.
- Tampon Phosphate 100 mM-EDTA 10 mM – BSA 2,5 g L⁻¹
- Standard de GSH 1 mM (+4°C)
- DTNB 10 mM
- Acide trichloroacétique (TCA) 25%
- NADPH à 2 mM dans la solution de tampon phosphate pH7,4 100 mM/EDTA 10mM
- Glutathion réductase (GR) 2,83 U mL⁻¹. Le robot déposera 40 µL par puits.

Calcul du volume de GR à préparer (incluant les volumes morts) :

$$\text{Vol}_{\text{GR}} = [(\text{nb échantillons} + 6 \text{ standards}) \times 2 \times 40 \mu\text{L}] + 6000 \mu\text{L}$$

- Préparer le mélange réactionnel (Mix). Le robot dépose 40 µL de mélange réactionnel par puits sur l'ensemble des 384 puits d'une plaque de lecture.

Calcul du volume des constituants du mélange réactionnel incluant les volumes morts :

$$\text{Vol}_{\text{mix}} = [(\text{nb échantillons} + 6 \text{ standards}) * 2 \text{ répliqués} * 40 \mu\text{L}] + 6000 \mu\text{L}$$

	1 puit
Tampon phosphate/EDTA	24,7 µL
NADPH	9,6 µL
DTNB	5,6 µL

Protocole :

Le robot prélève et dilue les échantillons selon une liste de travail, prépare une gamme d'étalonnage de GSH à partir d'une solution mère, précipite les protéines par ajout de TCA, transfère en microplaque 384 le surnageant déprotéiné et y ajoute du mélange réactionnel puis du NADPH pour initier la réaction avant lecture de la plaque.

- Séquence 1 :
 - Le robot prépare la gamme étalon de GSH (de 0 à 100 μM) diluée dans du Tp P/EDTA/BSA. En parallèle, il normalise les échantillons par leur charge protéique à 2,5 g L^{-1} dans du Tp P/EDTA à un volume de 64 μL selon le fichier Excel saisi.
 - Le robot ajoute 16 μL de TCA 25 % (soit 5 % final) pour précipiter les protéines des échantillons afin de ne doser que le -SH du GSH (et pas ceux des protéines). L'équivalent de 150 μL de standard sont traités par 37,5 μL de TCA 25 % dans les mêmes conditions que les échantillons.
 - Agiter les deepwells d'échantillons et standards déprotéinés sur Eppendorf Mix Mate à 1000 rpm pendant quelques secondes et les centrifuger 15 min, 2000 g à 4°C.
- Séquence 2 :
 - Remettre les deepwells en place sur le robot et lancer le transfert des surnageants en plaque de lecture 384 transparente.
 - Le robot ajoute successivement 40 μL de mix et 40 μL de GR qui vont déclencher la réaction.
 - Mettre très rapidement la microplaque dans le lecteur de microplaque et lancer la lecture sans attendre. Les mesures d'absorbance à 405 nm s'effectuent en cinétique pendant 10 min. La vitesse maximale de la réaction (V_{max}) est fonction de la concentration en GSH dans le puits.

5.4.7. Activité catalase hépatique (CAT)

D'après Babo and Vasseur (1992). (Article original de Beers and Sizer (1952).

Principe :

La catalase est une enzyme antioxydante localisée majoritairement dans les peroxysomes. Elle réalise la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène.



Figure 18: Réaction catalysée par la catalase.

La catalase est dosée dans la fraction S9 de foie par méthode spectrophotométrique en mesurant l'absorbance du peroxyde d'hydrogène dans l'UV à 240 nm. Les résultats sont exprimés en μmol de H_2O_2 consommés par minute (= 1 U de catalase).

Réactifs et solutions :

- Solution Tampon phosphate pH 7,4 100 mM / H_2O_2 28 mM : à préparer à partir d'une solution mère de H_2O_2 à 8,82 M (stockée à +4°C). Pour une plaque de 96 puits, diluer 64,5 μL dans 20 mL de tampon Phosphate. À conserver à l'abri de la lumière.
- Solution catalase standard à 1000 $\mu\text{ mL}^{-1}$: à préparer à partir de Catalase standard d'érythrocytes bovins EC 1.11.1.6 en poudre (1870 U mg^{-1}) (stockée à -20°C).

Protocole :

- Le robot prépare une gamme de catalase à partir de la solution mère standard à 1000 U/mL comme suit : 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 0 U mL^{-1} . En parallèle, les échantillons sont dilués en les normalisant par leur charge protéique en 2 étapes (au 10X puis au 1X pour atteindre 0,018 g L^{-1} en protéines totales).
- 100 μL d'échantillons normalisés et de standards dilués sont ensuite déposés en duplicata dans une microplaque de quartz.
- Le robot ajoute 100 μL de la solution tampon phosphate/ H_2O_2 (H_2O_2 à 14 mM final), ce qui déclenche immédiatement la réaction.
- Mettre immédiatement la plaque de quartz dans le lecteur de plaque et lancer la lecture. Les mesures sont effectuées en cinétique à 240 nm pendant 5 minutes. La vitesse maximale de la réaction est fonction de l'activité de la catalase dans le puits.

5.4.8. Activité superoxide-dismutase hépatique (SOD)

D'après Paoletti et al. (1986).

Principe : Méthode spectrophotométrique basée sur l'inhibition de l'oxydation du NADH par la superoxyde dismutase. La diminution du taux d'oxydation du NADH est fonction de la concentration d'enzyme. 50 % d'inhibition correspond à une unité d'enzyme (c'est à dire pour environ 15 ng de SOD pure). La mesure est effectuée en plaque 384 puits.

Réactifs et solutions :

- Solution de β -NADH 7,5 mM
- Solution EDTA 100 nM / $MnCl_2$ 50 mM : mélanger un volume égal d'une solution de stockage EDTA dihydrate 0,2 M et d'une solution de stockage $MnCl_2$ 0,1 M.
- β -mercaptoéthanol 10 mM
- SOD standard aliquoté à 3000 U/ml (stocké à $-20^\circ C$)

Protocole :

- Prévoir du mix pour une plaque 384 complète avec 6 mL de volume mort.

Mix	1 puit	384 puits + 6 mL vol mort
Tp phosphate 0,1 M pH7,4	80,07 μL	36295 μL
NADH 7,5 mM	4,00 μL	1813 μL
EDTA 100 nM / $MnCl_2$ 50 mM	2,502 μL	1133 μL

- Le robot prépare une gamme d'étalonnage à partir du standard de SOD à 3000 U mL^{-1} ($-20^\circ C$) comme suit : 0 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 U mL^{-1}
- En parallèle, les échantillons sont dilués en les normalisant à 5 g L^{-1} de protéines totales à partir d'une liste de travail Excel.
- Le robot dépose en plaque 384 : 10 μL d'échantillon ou de standard dilué et ajoute 86,58 μL de mélange réactionnel puis 10 μL de β -mercaptoéthanol.
- Après 20 minutes d'incubation à température ambiante la plaque est insérée dans le lecteur de microplaques. La lecture s'effectue par mesure d'absorbance à 340 nm en cinétique pendant 20 minutes.

Traitement des résultats :

Calculer pour chaque puits la vitesse maximale de la réaction (V_{max}). Considérant la V_{max} du blanc de la gamme comme étant le 100 % d'oxydation du NADH, calculer le pourcentage d'oxydation du NADH pour chaque puits.

À partir de la gamme d'étalonnage, tracer $\% = f(\log[SOD \text{ std}])$ et déterminer l'équation de droite.

Chercher le « $\log [SOD]$ » pour 50 % d'oxydation de NADH. Transformer cette valeur en U mL^{-1} . Le résultat obtenu correspond à 1 U mL^{-1} de SOD.

Pour les échantillons : à partir du pourcentage calculé précédemment utiliser ce % dans l'équation de la droite d'étalonnage pour obtenir un « $\log [SOD]$ ». Transformer cette valeur en concentration de SOD (faire inverse de log). Une règle de 3 avec la relation donnant 1 U mL^{-1} de SOD donne l'activité de la SOD dans l'échantillon.

5.4.9. Dosage de la lipoperoxydation hépatique (TBARS)

D'après Ohkawa et al. (1979)

Principe :

Les radicaux libres réagissent avec les macromolécules (acides nucléiques, protéines, glucides et lipides) et provoquent leur dégradation. La dégradation des lipides a lieu principalement au niveau des phospholipides membranaires car leurs chaînes d'acides gras sont la cible des attaques radicalaires. Les acides gras polyinsaturés sont les plus touchés. Les attaques portées consistent en l'arrachement d'un atome d'hydrogène et, par clivage, réarrangements moléculaires et réaction d'oxydation, conduisent à des hydroperoxydes et des aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA), facilement dosable par des méthodes classiques mais peu spécifiques.

En milieu acide et par la chaleur, les hydroperoxydes lipidiques et leurs dérivés aldéhydiques (dont le MDA) forment avec l'acide thiobarbiturique un complexe rose qui absorbe à 535 nm et fluoresce à 553 nm lorsqu'il est excité à 515 nm (Figure 19). Les complexes TBARS formés sont dosés sur la base contre d'une gamme étalon de malondialdéhyde (MDA).

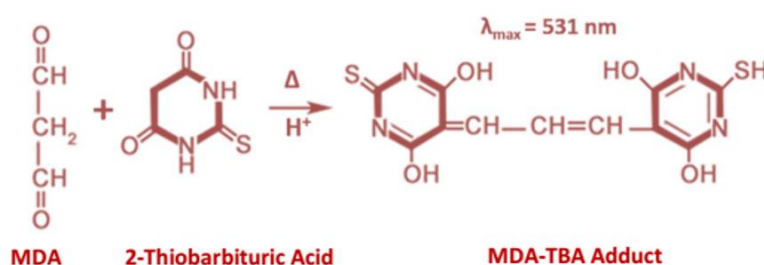


Figure 19 : Réaction entre le malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique

Réactifs et solutions :

- Tampon phosphate 100 mM / EDTA 10 mM pH 7,8
- Tampon phosphate 100 mM / EDTA 10 mM / BSA 10 g L⁻¹ à pH 7,8
- BHT 1 mM dissous dans de l'éthanol 100 %.
- Acide trichloroacétique (TCA) 50 % (w/v)
- Acide thiobarbiturique 1,3 % (w/v) préparé dans NaOH 0,3 % (w/v)
- MDA 1 mM : préparé dans le tampon phosphate / EDTA / BSA à 10 g L⁻¹.

Protocole :

- Préparer le mélange réactionnel. Le volume total à préparer est calculé en fonction du nombre d'échantillons, selon le calcul suivant (incluant les volumes morts) :

$$V_{tot} = [(nb \text{ échantillons} * 210 \mu L) + (6 \text{ standards} * 290 \mu L) + 6000 \mu L]$$

	1 échantillon	96 échantillons	176 échantillons
Tp phosphate 0,1 M/EDTA 10 mM	117	16311	26325
BHT 1 mM	6,14	856	1382
TCA 50%	30,7	4280	6908
TBA 1,3%	46,14	6432	10382

Le robot prélève et dilue les échantillons selon une liste de travail d'un fichier Excel, prépare une gamme étalon de MDA à partir d'une solution mère et ajoute du réactif sur les échantillons et standards dilués. Après incubation à 80°C et centrifugation le robot transfère en plaque blanche 384 puits blanche les surnageants d'échantillons et de standards ayant réagi avec le réactif. La fluorescence émise est ensuite lue.

- Séquence 1 :

- Le robot prépare la gamme étalon de MDA (de 0 à 1 μM) diluée dans du Tp P/EDTA/BSA 10 g L⁻¹.
- En parallèle, il normalise les échantillons par leur charge protéique (10 g L⁻¹ pour les foies d'épinoches) dans du tampon Phosphate/EDTA selon le fichier Excel saisis (volume final : 35 μL).
- Le robot ajoute ensuite le milieu réactionnel aux échantillons dilués et standards dilués.
- Recouvrir les deepwells ainsi préparées avec un film adhésif pour microplaque et renforcer avec du ruban adhésif. Placer les deepwells scellées dans une étuve à 80°C en atmosphère humide et laisser la réaction se développer pendant 40 minutes.
- Sortir les deepwells et les placer sur un mélange de glace et d'eau jusqu'à refroidissement complet pour stopper l'apparition de coloration.
- Centrifuger la plaque à 3000 g pendant 10 minutes afin de culotter les protéines précipitées par le TCA. Le liquide doit être exempt de turbidité afin d'éviter toute fluorescence autre que celle du complexe MDA-TBA lors de la lecture.

- Séquence 2 :

- Remettre les deepwells sur le robot. Le robot transfère en microplaque blanche 384 puits les surnageants d'échantillons et de standards en duplicata.
- Lire la plaque en fluorescence : excitation à 515 nm, émission à 553 nm.
- Établir une droite d'étalonnage en exprimant les unités de fluorescence en fonction des concentrations en MDA des points de gamme. En déduire les concentrations en MDA de chaque échantillon.

5.5. Histopathologie

5.5.1. Histologie des tissus hépatiques et des gonades

Principe : L'analyse histo-pathologique des organes permet d'observer les perturbations structurales induites lors de la mise en cage aussi bien de type adaptatif que pathologique. Elle peut être mise en œuvre pour déterminer le sexe et le stade de développement gonadique des individus ainsi que pour révéler la présence de parasites.

Matériel :

- Bains chauffants réglables pour paraffine
- Moules d'inclusion
- Microtome
- Lames en verre
- Rasoir en acier

Réactifs et solutions :

- Ethanol absolu
- Butanol
- Paraffine
- Gélatine
- Toluène
- Rouge nucléaire solide
- Picro-indigo-carmin
- Résine d'inclusion
- Solution d'alcool 50% :
 - Mélanger un volume équivalent d'éthanol absolu et d'eau ultra-pure.
- Solution d'eau gélatinée :
 - Ajouter 0.1g L⁻¹ de gélatine dans de l'eau tiède sans la faire bouillir. Cette solution doit être préparée de façon journalière.

Protocole :

a) Inclusion dans la paraffine

- Rincer le liquide de fixation en réalisant des bains successifs d'une heure dans de l'alcool 50%. La première étape consiste à rincer le liquide fixateur. Le nombre et la durée des bains dépend de la durée de la fixation. Si la fixation a été de quelques jours, trois bains successifs d'une heure dans de l'alcool 50 % (dilution d'éthanol 95%) suffisent. Si la fixation a été longue, il faut réaliser des bains plus longs et plus nombreux.
- Déshydrater les échantillons toujours dans les histosettes par des bains de degrés alcooliques croissants (vider le liquide et re-remplir rapidement par le suivant en limitant l'exposition à l'air) d'une demi-heure à une heure chacun en triplicata avec des agitations fréquentes mais douces à température ambiante : trois bains à 75%, 90% (dilution d'éthanol 95%), 95%, 99% (dilution d'éthanol 100%) et trois derniers bains à 100%. Les bains doivent être suffisamment longs pour que l'eau sorte des échantillons mais pas trop longs pour éviter une brûlure par l'alcool.
- Placer les échantillons dans du butanol pour un bain de 24 h puis dans un deuxième bain de 24h minimum sans limite de temps jusqu'à l'inclusion.

- Le jour de l'inclusion, faire fondre la paraffine dans 6 bacs chauffants à 60-70°C puis la refroidir et la maintenir à 50 °C pour l'inclusion sous une hotte chimique.
- Egoutter les histosettes et les placer dans la paraffine liquide dans un premier bain chauffant pendant 1h afin d'éliminer le butanol des échantillons et permettre la diffusion de la paraffine au cœur de l'échantillon.
- Déplacer les histosettes toutes les heures dans les 4 bains suivants. Placer les histosettes une par une dans le sixième bain pour les ouvrir.
- Récupérer les échantillons et les placer dans un moule rempli de paraffine liquide venant du sixième bain, le tout étant à la même température pour une bonne réussite des coupes. Ces étapes peuvent être réalisées manuellement ou semi-automatiquement avec des appareils spécifiques.
- Les blocs obtenus par refroidissement doivent être laissés au repos au minimum 24 h. Ils peuvent être conservés longtemps, idéalement entre 10 et 25 °C.

b) Réalisation des coupes

- Démouler les blocs de paraffines et les tailler en pyramide autour de l'échantillon puis les fixer sur un porte échantillon.
- Les couper en rubans de 5 µm (foie, gonade) ou 7 µm (branchie, gonade femelle mature) d'épaisseur sur un microtome à l'aide d'un rasoir d'acier.
- Placer les rubans sur une lame de verre recouverte d'eau gélatinée puis sur une plaque chauffant à 40°C pour défroisser les rubans.
- Déplier les rubans à l'aide d'une pince ou d'une pique.
- Lorsqu'ils sont entièrement détendus, retirer les rubans et les égoutter par inclinaison sur une poubelle de récupération.
- Sécher les rubans sur un papier absorbant qui ne sera utilisé qu'une seule fois. Le séchage et la prise de la gélatine se poursuivent au moins 24 h à température ambiante avant que les lames puissent être colorées.

c) Coloration des coupes

- Déparaffiner les lames en réalisant deux bains successifs de 15min dans du toluène sous hotte chimique. Les lames doivent être déparaffinées avant coloration car les colorants sont aqueux alors que la paraffine est de nature lipidique hydrophobe. Pour les manipuler facilement, placer les lames sur des porte-lames. **Les rubans ne doivent jamais être touchés.**
- Rincer le toluène en passant les lames dans des bains alcooliques de concentrations décroissantes pendant 15min : deux bains d'éthanol 100%, deux bains 95%, un bain 80%, un bain 50%, un bain d'eau (l'eau du robinet peut convenir).
- Placer les lames dans un bain de rouge nucléaire solide pendant 10min.
- Rincer les lames 10min à l'eau courante.
- Colorer ensuite 10s. avec le micro-indigo-carmin (ce temps peut varier en fonction de la fraîcheur du colorant et de la température ambiante).
- Rincer les lames en les plaçant successivement pendant quelques secondes dans des bains d'alcool 70% puis 95% et enfin dans deux bains d'alcool 100% pendant 5min.
- Recouvrir les lames de résine miscible à l'alcool puis d'une lamelle et faire sécher.

NB : De nombreux protocoles peuvent être utilisés. La coloration au rouge nucléaire solide micro-indigocarmin décrite ici est utilisée préférentiellement pour le foie et les gonades car elle permet une bonne vision topographique tout en mettant en évidence les fibroses (en bleu grâce à l'indigo), les noyaux et les nucléoles mais aussi les nécroses ou les pycnoses.

d) Observation des coupes de tissus hépatiques

Les coupes de foie sont observées au microscope optique. La surface totale de coupe est d'abord étudiée pour repérer trois zones représentant un total de 2 mm² éloignées entre elles de 100 µm et représentatives de l'échantillon. Un score de pathologie sur 10, prenant en compte l'intensité des atteintes et leur fréquence ou étendue, est attribué pour chaque zone pour les atteintes suivantes : les centres mélano-macrophages, la fibrose, la vacuolisation des hépatocytes. La superficie des zones de lyses et de nécroses hépatiques est évaluée en pourcentage des surfaces observées sur au moins 10000 µm² et traduite en une note sur 10 (exemple 20 % donne 2/10). Toute autre pathologie observée (foyer de régénération, néoplasie, œdème, par exemple) peut être scorée. Une note globale de pathologie est obtenue en faisant la moyenne des différents scores.

e) Observation des gonades

Le stade de développement gonadique peut être évalué en déterminant le degré de maturation des gamètes majoritairement présents dans les gonades. Il est important de faire cette analyse sur la totalité de la gonade observée longitudinalement. A défaut, la partie médiane transverse peut être utilisée. En effet la maturation des gonades chez la plupart des poissons commence par la partie distale postérieure et finit par la partie proximale antérieure. En conséquence le stade de développement gonadique est plus avancé vers la papille génitale et en retard vers la tête par rapport au reste de la gonade.

6. UTILISATION D'UN INDEX IBR (INTEGRATIVE BIOMARKER RESPONSE) POUR L'INTERPRETATION DES RESULTATS

D'après Sanchez et al.(2012)

Objectif : L'utilisation d'une approche multi-biomarqueur permet de mieux comprendre l'impact de l'exposition à un facteur de stress sur la physiologie de l'organisme. Cependant l'augmentation du nombre de biomarqueurs complexifie également l'interprétation des résultats. L'utilisation d'outils tels que l'index IBR permet de faciliter leur interprétation. Ici, l'IBRv2 développé par Sanchez et al. (2012) sur base des travaux de Beliaef et Burgeot (2002) a été utilisé. Cette approche permet également de comparer les réponses obtenues chez les organismes engagés avec ceux d'une population contrôle et donc d'établir le profil de réponse caractéristique du stress auquel les organismes engagés ont été exposés.

Protocole :

La réponse moyenne pour chaque biomarqueur est calculée dans chaque groupe d'individus avant d'être standardisée :

$$Y_i = \log\left(\frac{X_i}{X_0}\right)$$

Avec X_i la valeur moyenne mesurée pour chaque biomarqueur dans le groupe i et X_0 la moyenne de ce même biomarqueur dans la population contrôle.

Les valeurs de Y_i obtenues sont ensuite standardisées pour obtenir la valeur Z_i :

$$Z_i = \frac{(Y_i - \mu)}{\sigma}$$

Avec μ et σ correspondant respectivement à la moyenne générale et à l'écart-type de toutes les valeurs de Y_i obtenues pour un biomarqueur.

Afin de quantifier la déviation existant entre les niveaux de réponses mesurés dans la population contrôle et les organismes exposés, un index de déviation (A) est calculé. Le niveau de réponse observé dans la population contrôle étant considéré comme le niveau basal de réponse, celui-ci est centré sur zéro :

$$A = Z_i - Z_0$$

Une valeur A négative est considérée comme une inhibition de la réponse du biomarqueur chez les organismes exposés tandis qu'une valeur positive est interprétée comme une induction de la réponse de ce biomarqueur.

En sommant la valeur absolue des valeurs A obtenues pour chaque biomarqueur, on obtient le score global de l'IBR pour chaque groupe.

$$IBR = \sum |A|$$

Pour simplifier encore l'interprétation, il est possible de calculer le score moyen pour chaque fonction physiologique étudiée.

$$IBR = \sum (|A| / n_i)$$

Avec n le nombre de biomarqueurs représentatifs de la fonction physiologique i .

Les scores obtenus peuvent ensuite être représentés sous forme de diagrammes en étoiles. L'ensemble des calculs et les graphiques peuvent être réalisés sur Excel.

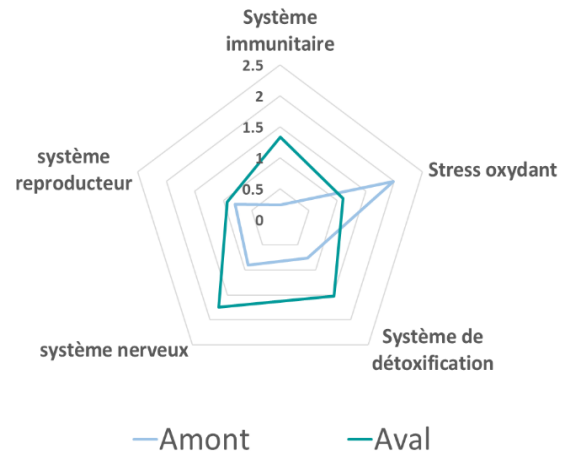
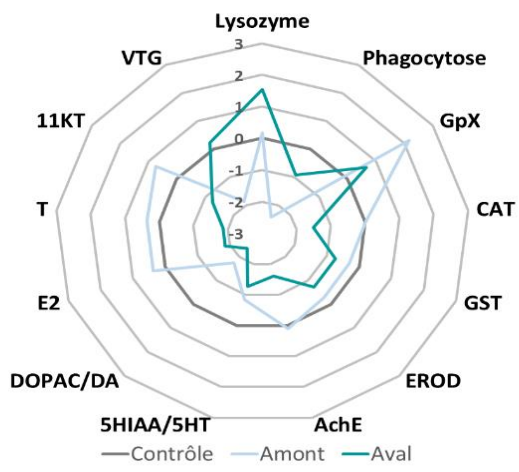


Figure 20: Star plots représentant les scores IBR obtenus (A) pour chaque biomarqueur (B) le score moyen obtenu pour chaque fonction physiologique étudiée

7. LISTE DU MATERIEL POUR LA RECUPERATION DES CAGES :

- Clés des cadenas
- Fiche de terrain + crayons+ marqueurs indélébiles
- GPS
- Sonde multiparamétrique
- Bottes
- Waders
- Glace
- Bacs de dissection
- Planche en verre de dissection
- Papier Tork
- Troussets de dissection
- Lames de scalpels
- Cuve d'azote liquide
- Seaux
- Bulleurs
- Groupe électrogène
- Centrifugeuse de terrain
- Micropipettes (+tips)
- Seringues 1mL héparinées
- Tubes eppendorfs annotés pour chaque organe à prélever
- Tubes eppendorfs héparinés (0,5mL) pour le sang
- Tubes eppendorfs avec 1mL de L15 complémenté
- L15 complémenté
- Pilons
- Boîtes de pétri
- MS-222
- Histosettes annotées
- Solution de formol acétique
- Poubelles pour déchets biologiques
- Poubelles pour aiguilles
- Boîte à outils
- Trousse de secours
- Ichtyomètre

- Balance
- Multiprise
- Gants en nitrile
- Tables

8 . BIBLIOGRAPHIE

- Babo, S., Vasseur, P. In vitro effect of thiram on liver antioxidant enzyme activities on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol.* 1992; 22: 61-68.
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-257
- Ellis, A.E. Lysosyme assays, in: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in fish immunology, ed. SOS publications, New York, 1990, pp. 101-103.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.V. Jr., Featherstone, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7 (1961) 88-95.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garic, J. Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large french watershed. *Ecotoxicol Environ Saf.* 1998; 40: 144-153.
- Fostier, A., Jalabet, B. Steroidogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at various preovulatory stages: changes in plasma hormone levels and in vivo and in vitro responses of the ovary to salmon gonadotropin. *Fish Physiology and Biochemistry.* 1986; 2: 87-99.
- Fulton T.W., Rate of growth of sea fishes. Neil Compagny. 1906.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-Transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974; 249: 7130-7139.
- Inoue, T., Moritomo, T., Tamura, Y., Mamiya, S., Fujino, H., Nakanishi, T. A new method for fish leucocyte counting and partial differentiation by flow cytometry. *Fish Shellfish Immunol.* 2002; 13: 379-390.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70: 158-169.
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry.* 1986; 154: 536-541.
- Quade, M.J., Roth, J.A. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules.
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.M. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2013; 20: 2721-2725.
- Samai, H.C., Rioult, D., Bado-Nilles, A., Delahaut, L., Jubreaux, J., Geffard, A., Porcher, J.M., Betoulle, S. Procedures for leukocytes isolation from lymphoid tissues and consequences on immune endpoints used to evaluate fish immune status: A case study on roach (*Rutilus rutilus*). *Fish Shellfish Immunol.* 2018; 74: 190-204.
- Sunyer, J.O., Tort, L. Natural hemolytic and antibacterial activities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995; 45: 333-345.