

# Guide des gestionnaires

Méthodologie d'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide de l'épinoche encagée (*Gasterosteus aculeatus*)

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 à l'aide de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), et selon une méthodologie active d'encagement, 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 supervisées par Audrey CATTEAU, ingénieure de recherche au sein de l'UMR I-02 Sebio (URCA). Les différents contributeurs à la rédaction de ce document sont Olivier Palluel (Ingénieur d'étude, UMR I-02 Sebio, INERIS), Cyril Turiès (Ingénieur d'étude, UMR I-02 Sebio, INERIS), Anne Bado-Nilles (Ingénieure de recherche, UMR I-02 Sebio, INERIS) et Jean-Marc Porcher (Directeur de recherche, UMR I-02 Sebio, INERIS).

## TABLE DES MATIERES

<b>1. Réglementation.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Origine des épinoches et condition d'élevage et de stabulation .....</b>	<b>4</b>
2.1. Elevage .....	4
2.2. Tri, sexage et stabulation des poissons.....	5
<b>3. Déploiement des dispositifs d'encagement .....</b>	<b>6</b>
3.1. Description des cages.....	6
3.2. Constitution des lots .....	7
3.3. Transport vers les sites d'étude et dépôt des organismes.....	7
<b>4. Fin de l'encagement et récupération des échantillons .....</b>	<b>9</b>
4.1. Préparation du matériel avant la récupération des organismes.....	9
4.2. Récupération des cages.....	10
4.3. Récupération des échantillons biologiques.....	10
<b>5. Mesures des biomarqueurs .....</b>	<b>13</b>
5.1. Biochimie.....	13
5.1.1. Récupération de la fraction S9 (foie et muscle) .....	13
5.1.2. Dosage des protéines totales .....	14
5.1.3. Activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase hépatique (EROD).....	15
5.1.4. Activité glutathion-S-transférase hépatique (GST).....	17
5.1.5. Activité glutathion-péroxydase hépatique (GPx) .....	19
5.1.6. Glutathion total hépatique (GSH).....	21
5.1.7. Activité catalase hépatique (CAT).....	23
5.1.8. Activité superoxide-dismutase hépatique (SOD).....	24
5.1.9. Dosage de la lipoperoxydation hépatique (TBARS) .....	25
5.1.10. Dosage des cholinestérases musculaires (ChE) .....	27
5.1.11. Concentration en spiggin rénale (SPG).....	29
5.1.12. Concentration en vitellogénine circulante (VTG) .....	31
5.2. Cytométrie en flux.....	34
5.2.1. Distribution et mortalité leucocytaire .....	34
5.2.2. Activité de phagocytose .....	34
5.2.3. Flambée oxydative.....	34
5.2.4. Présence en lysosomes.....	34
<b>Références .....</b>	<b>36</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>37</b>

## 1. REGLEMENTATION

---

L'exercice de la pêche en eau douce à des fins sanitaires, scientifiques et écologiques ainsi que la capture, le transport ou la vente de poissons, sont soumis à autorisation préalable de l'autorité administrative (Code de l'environnement [Article L436-9](#)). La forme et le contenu de la demande d'autorisation sont précisées dans le [Titre III de l'Arrêté du 6 août 2013](#) et sont à adresser à la Direction Départementale des Territoires (DDT) du département dans lequel a lieu le prélèvement/encagement.

Tout transport d'animaux vertébrés vivants réalisé dans le cadre d'une activité économique, y compris le transport des poissons et de leurs alevins (mais pas celui de leurs œufs), est soumis aux exigences du [Règlement \(CE\) n°1/2005](#) relatif à la protection des animaux pendant le transport. Dès lors que les animaux sont transportés sur plus de 65 km, une autorisation de transporteur est requise au titre de la protection animale.

Enfin, le [Décret n° 2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013](#) relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques encadre l'utilisation des animaux dans des procédures expérimentales, ainsi que l'autorisation et l'évaluation éthique préalables des projets ([Arrêté du 1<sup>er</sup> février 2013](#)).

Les autorisations administratives et demandes préalables à un encagement d'épinoches sur le terrain sont :

- Une autorisation de projet approuvée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation, après évaluation par un comité d'éthique.
- Une autorisation de transport des animaux délivrée par la Direction Départementale de la Protection des Populations (DDPP).
- Un arrêté préfectoral autorisant l'introduction de poissons à des fins scientifiques par site étudié délivré par la Direction Départementale des Territoires (DDT ou DDTM si milieu marin).

## 2. ORIGINE DES EPINOCHES ET CONDITION D'ELEVAGE ET DE STABULATION

---

### 2.1. Elevage

Les épinoches à trois épines utilisées lors des encagements sont des individus âgés d'environ 1 an, nés dans les canaux témoins des mésocosmes l'année précédente et maintenus dans des bassins extérieurs. Au moment de la vidange des mésocosmes (octobre), les juvéniles d'une taille inférieure à 25mm sont répartis dans plusieurs bassins de stabulation extérieurs. Ils sont ensuite alimentés tout au long de l'année avec des apports quotidiens en vers de vase, artémies et larves de moustiques. Afin d'optimiser leur croissance, l'apport de nourriture varie qualitativement et quantitativement en fonction de la taille et du nombre de poissons.

Les bassins de stabulation extérieurs (Figure 1) sont conçus pour présenter des conditions compatibles avec l'écologie de l'épinoche à trois-épines. Ils sont peu profonds (maximum 80 cm) et présentent un volume d'environ 1000 L et une surface suffisante pour permettre aux épinoches de développer des comportements naturels (nage en banc, reproduction et comportements associés). Ils présentent une couche sédimentaire sur laquelle se développent plusieurs types de végétaux (potamot, callitriche) ainsi que plusieurs groupes d'invertébrés benthiques (aselles, gammarès, radix, sangsues...). Un enrichissement est également apporté par l'ajout de tubes en PVC percés servant de cachettes. Les

bassins sont alimentés en eau potable avec un renouvellement continu et un courant faible. La conductivité y est stable (environ  $700 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) et la température est suivie tout au long de l'année.



Figure 1: Bassin de stabulation des épinoches à trois épines

## 2.2. Tri, sexage et stabulation des poissons

Environ 1 mois avant le début de la campagne d'encagement, les poissons sont triés selon leur longueur standard (distance entre la pointe de la bouche et le pédoncule caudal) et seuls ceux d'une taille supérieure à 38 mm sont prélevés. Cette limite a été fixée pour éviter l'utilisation d'individus trop petits qui pourraient s'échapper à travers les mailles des cages. Elle permet également d'assurer une quantité suffisante de matériel biologique pour mesurer l'ensemble de la batterie de biomarqueurs.

Une fois les individus sélectionnés, ils sont triés selon leur sexe grâce à une méthode d'analyse d'image basée sur la morphologie de la tête (De Kermoysan et al. 2013). Les poissons sont prélevés un par un et chaque individu est placé sur une feuille de papier millimétrée. Un appareil photo fixé sur un trépied permet de prendre une photo du poisson entier (vue latérale). Les photos sont ensuite transférées sur un ordinateur et immédiatement analysées avec le modèle développé dans la publication citée ci-dessus, via le logiciel ImageJ (Figure 2). Pendant la durée des analyses, les épinoches photographiées sont isolées dans des récipients contenant environ 30cL d'eau. Les analyses doivent être effectuées le plus rapidement possible pour limiter la durée d'isolement (durée maximale conseillée : 1h).

### MATERIEL NECESSAIRE

- ▲ Papier millimétré
- ▲ Appareil photo
- ▲ Papier absorbant
- ▲ Seaux
- ▲ Epuisette(s)
- ▲ Trépied
- ▲ Logiciel de traitement d'image (imageJ) avec le modèle développé par De Kermoysan et al., (2013)



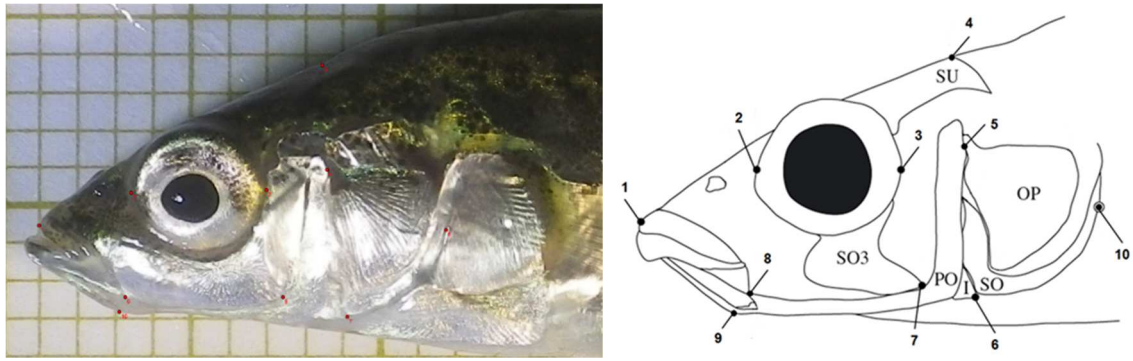


Figure 2 : Détermination du sexe des épineche basée sur la morphologie de la tête (De Kermoisan et al. 2013). À gauche : les dix points placés sur une photographie d'un individu. À droite : une représentation schématique du positionnement des points

Cette étape de détermination du sexe et de la constitution des groupes mâles/femelles peut s'étendre sur plusieurs jours. Il faut cependant s'assurer de respecter un délai d'au moins deux semaines entre ces manipulations et le dépôt des cages, afin que les épineches puissent complètement récupérer du stress généré. Une fois les groupes de mâles et de femelles constitués, ils sont maintenus séparés dans deux bassins de stabulation jusqu'au début de l'expérimentation. Ils sont nourris quotidiennement jusqu'à la veille de la constitution des lots.

### 3. DEPLOIEMENT DES DISPOSITIFS D'ENCADEMENT

#### 3.1. Description des cages

Des cages cylindriques en acier inoxydable sont utilisées pour les encadrements d'épineches. D'une longueur de 63 cm pour un diamètre de 27 cm et un maillage de 5mm de côté, elles s'ouvrent aux deux extrémités et présentent une cloison centrale qu'il est possible de refermer pour constituer deux lots séparés d'individus dans la même cage. Elles sont enrichies avec des tubes en PVC pour permettre aux poissons de conserver un comportement de fuite en cas de stress (agressivité d'autres épineches, courant, prédateur) (Figure 3).

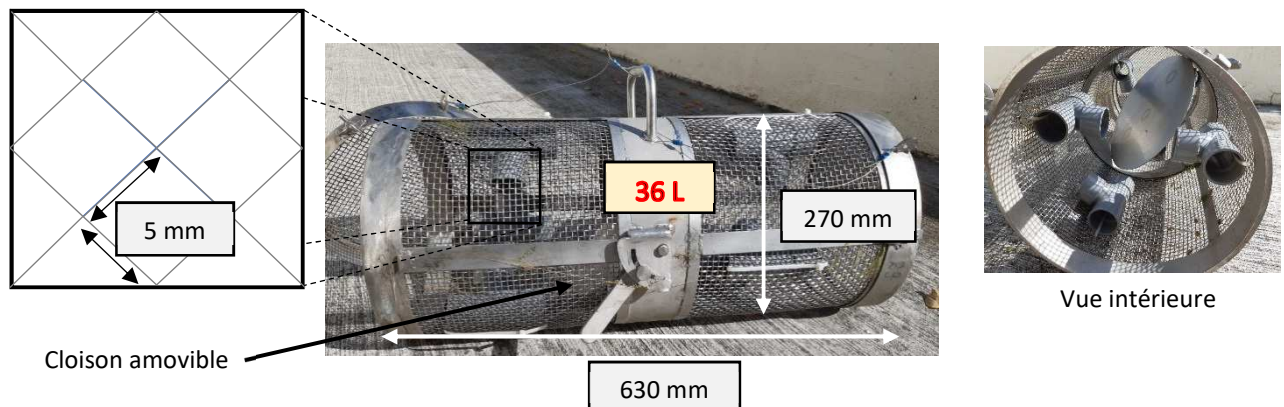


Figure 3 : Caractéristiques des cages utilisées pour l'encadrement de l'épineche à trois-épines

### 3.2. Constitution des lots

La constitution des lots doit s'effectuer la veille du dépôt des cages (ou le vendredi si l'encagement doit avoir lieu le lundi). L'objectif est d'assurer un sexe-ratio équilibré dans chaque cage, mais également d'homogénéiser la taille des individus entre les cages.

Les épinoches, dont le sexe a été déterminé à l'étape précédente, sont prélevées dans les bassins de stabulation. Quinze femelles et quinze mâles sont choisis et chaque poisson est pesé, mesuré puis placé dans un seau pour constituer un lot de 30 poissons. Ces mesures doivent être consignées, pour une future comparaison avec les données récoltées à l'issue de l'encagement. Une fois un lot complet constitué, il est maintenu isolé dans une nasse immergée dans les bassins de stabulation jusqu'au départ, le lendemain (Figure 4).



Figure 4 : Nasse immergée dans un bassin de stabulation

#### MATERIEL NECESSAIRE

- ▲ Balance
- ▲ Papier millimétré, règle graduée ou pied à coulisse
- ▲ Seaux
- ▲ Epuisette
- ▲ Feuille et stylo

### 3.3. Transport vers les sites d'étude et dépôt des organismes

Les lots constitués la veille sont placés dans les bacs de transport de poissons préalablement remplis d'eau. Les bulleurs sont allumés pour toute la durée du transport et on s'assure de leur fonctionnement avant le départ (Figure 5).



Figure 5 : Organisation du camion lors du transport des épinoches sur les sites d'études. En vert, les bacs de transport adaptés aux épinoches. Au fond à gauche, la bonbonne d'air comprimé reliée aux bulleurs se trouvant dans le fond des bacs

#### MATERIEL NECESSAIRE

- ▲ Bacs de transport adaptés pour les épinoches
- ▲ Cages
- ▲ Air comprimé avec bulleur adaptés aux bacs de transport
- ▲ Seaux
- ▲ Epuisettes
- ▲ Fût(s) avec couvercle
- ▲ Bottes
- ▲ Waders
- ▲ Sonde physicochimique
- ▲ Enregistreur de température
- ▲ Gants
- ▲ Étiquettes
- ▲ Câbles et serres câbles
- ▲ Clé à cliquet

Une fois sur le site, les poissons doivent être acclimatés une quinzaine de minutes dans un mélange eau des bacs de transport / eau du site d'étude (adaptation aux nouvelles conditions physicochimiques). Pendant ce temps, des mesures physicochimiques de l'eau sont réalisées (pH, Conductivité, oxygénation). La cage est installée verticalement dans l'eau (couvercle sur le fond de l'eau fermé) et arrimée avec un câble à un point fixe (arbre, poteau). S'il n'y a pas de point fixe aux alentours, il est possible de l'accrocher à un ancrage plantée dans le sol. Si le site se trouve sur un petit cours d'eau, il convient de placer la cage dans une zone peu profonde (60cm maximum) à faible courant, avec si possible une couche sédimentaire et/ou des végétaux pour s'approcher des conditions naturelles de vie de l'épinoche. Une fois les poissons acclimatés aux nouvelles conditions, ils peuvent être placés à l'intérieur de la cage (renverser le seau doucement dans la cage), en même temps qu'un enregistreur de température (

Figure 6). La cage doit alors être correctement fermée avant d'être délicatement déposée sur le fond de la rivière.



Figure 6 : Dépôt des épinoches sur un site d'étude

À gauche : des épinoches qui s'acclimatent à l'eau du site.  
À droite : les épinoches sont placées dans les cages, préalablement installées et accrochées à un point fixe.

En cas d'encagement sur une grande rivière, l'encagement peut s'effectuer depuis la rive. Dans ce cas, la cage doit être préalablement arrimée à un point fixe à l'aide des câbles et des serre-câbles. Elle peut ensuite être placée dans un grand bac rempli d'eau de la rivière, et le dépôt des poissons dans la cage pourra se faire dans ce bac. Si la cage ne peut pas être placée sur le fond de la rivière, il est important de s'assurer qu'elle ne soit pas placée trop profondément dans la colonne d'eau (ajuster au besoin la longueur de câble).

Avant de quitter le site, il est important de noter la position GPS précise de la cage et de prendre quelques photos, afin de pouvoir retrouver facilement les poissons au moment de la récupération.



Figure 7 : Des cages contenant des épinoches sur différents sites d'études. Sur la photo du milieu, on aperçoit le câble qui relie la cage au point fixe situé sur la rive.



## 4. FIN DE L'ENCAGEMENT ET RECUPERATION DES ECHANTILLONS

Le déplacement sur le terrain pour la récupération des cages et le prélèvement des échantillons biologiques nécessite au minimum 3 personnes.

### 4.1. Préparation du matériel avant la récupération des organismes

À l'issue des 21 jours d'encagement, les cages sont récupérées et le prélèvement des échantillons biologiques sur les animaux s'effectue *in situ*. Par conséquent, le matériel nécessaire au bon déroulement des dissections (bonbonne d'azote de transport d'échantillons, tubes numérotés, tampons de conservation des échantillons, fiches de dissection) doit être préparé en amont du déplacement (la veille, pour les tampons de conservation).

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 sang, du foie et du muscle le jour même de la dissection à raison de 0,2 mM final, en raison de sa faible stabilité une fois en solution.

Pour le prélèvement sanguin destiné aux mesures de la concentration en vitellogénine circulante, numéroté une série de minitubes (1,2mL) (Figure 8) et la placer sur un rack de maintien. Préparer une solution de conservation PBS/glycérol 20 %/Héparine 30 %. Le volume de solution de conservation sera fonction du nombre d'individus à prélever.



Figure 8 : Minitubes de collecte d'échantillons

Préparer un excès de solution car le volume sanguin que l'on peut prélever peut varier d'un individu à l'autre. Il faut prévoir 120  $\mu$ L de tampon pour un prélèvement sanguin de 5  $\mu$ L et 240  $\mu$ L de tampon pour un prélèvement de 10  $\mu$ L.

Pour les prélèvements de foie et de muscle, remplir deux séries de tubes à bouchon vissant avec des billes en verre ( $\varnothing$  1mm) et les numéroté. Préparer une solution de conservation composée de tampon phosphate pH 7,8 à 0,1M, de glycérol à 20 %. Le volume de solution à préparer est fonction du nombre de prélèvements à effectuer, à raison de 400  $\mu$ L par tube pour le foie et 800  $\mu$ L par tube pour le muscle.

Pour le prélèvement de rein, remplir une autre série de tubes à bouchons vissant avec des billes en verre ( $\varnothing$  1mm) et numéroté les tubes. Remplir ces tubes de 100  $\mu$ L d'un tampon de dénaturation composé de Tris-HCl 100 mM, EDTA 10mM, urée 8 M, SDS 2 % (w/v),  $\beta$ -mercapto-éthanol 200 mM (opération à réaliser sous une sorbonne). Ce tampon peut se conserver 1 an à température ambiante et doit être stocké sous une sorbonne ou dans une armoire ventilée.

Pour la conservation des leucocytes, compléter une bouteille de milieu Leibovitz 15 médium avec de l'héparine (10  $\mu$ /mL), de la pénicilline (500 U/mL) et de la streptomycine (500  $\mu$ g/mL).

Numéroté une série de cassettes d'histologie destiné à contenir les gonades des individus qui seront placés dans du formol.

Préparer une fiche de dissection permettant de noter les poids des différents organes et les volumes sanguins prélevés, ainsi que la taille/poids/sexe des poissons (Figure 9).

Date	Site	n°	Sexe	Taille (cm)	Poids (g)	Sang VTG (µL)	Vol. Tampon VTG (µL)	Foie (mg)	Gonades (mg)	Reins (mg)	Remarque
		1									
		2									
		3									
		4									
		5									
		6									
		7									
		8									
		9									
		10									
		11									
		12									
		...									
		...									

Figure 9 : Modèle d'une fiche de dissection

#### 4.2. Récupération des cages

La récupération nécessite un grand bac pouvant contenir la cage entière, un fût avec couvercle et une épuisette. Placer de l'eau dans le grand bac, à un volume suffisant pour permettre à la cage d'être suffisamment immergée (au moins 1/3 de la cage doit être dans l'eau). Si la cage est très envasée, prévoir volume d'eau plus important. Une fois le bac prêt, sortir la cage de l'eau et la placer rapidement dans le bac, afin de limiter l'exposition des poissons à l'air libre (Figure 10). La cage peut alors être inclinée sur un côté puis ouverte du côté immergé. Plusieurs seaux d'eau peuvent être versés sur la cage pour faire chuter tous les poissons dans le bac. Récupérer les poissons à l'épuisettes et les placer dans le fût préalablement rempli d'eau. Récupérer également la sonde de température. Mesurer les paramètres physicochimiques du site.

#### MATERIEL NECESSAIRE

▲ Voir Annexe 1



Figure 10 : Récupération des épinoches. Les cages sont déposées dans un bac contenant l'eau du site étudié. Les épinoches sont libérées dans ce bac et peuvent être récupérées à l'épuisette

#### 4.3. Récupération des échantillons biologiques

Afin de réduire le temps de dissection du poisson pour éviter la dégradation des tissus il est important de répartir les tâches dont s'acquitteront les différents participants. La qualité des prélèvements sera ainsi optimale.

Au dernier moment, avant le début de la dissection, ajouter le PMSF à la solution de conservation des échantillons sanguins (PBS/glycérol 20%/Héparine 30%) pour obtenir une concentration finale en

PMSF à 0,2 mM. Dans les minitubes 1,2 mL, déposez 120 µL de tampon PBS/glycérol/Héparine/PMSF pour un prélèvement de 5 µL de sang, ou 240 µL de tampon pour 10 µL de sang. Ajouter également le PMSF à la solution de conservation du foie et du muscle (tampon phosphate 0,1 M/glycérol 20 %) pour obtenir une concentration finale en PMSF à 0,2 mM. Déposer respectivement 400 µL et 800 µL de cette solution phosphate/glycérol/PMSF dans les tubes de prélèvement du foie et du muscle.

Avec une épauvette, prélever un individu et le placer quelques minutes dans de l'eau contenant du MS222 (Tricaine methanesulfonate) concentré à 100 mg/L pour l'anesthésier. Selon la température de l'eau, l'anesthésie sera plus ou moins rapide.

Une fois le poisson anesthésié, effectuer rapidement une entaille derrière la tête à l'aide d'une paire de ciseaux fins jusqu'à atteindre la cavité cardiaque. À l'aide d'un cône préalablement hépariné, prélever 10 µL de sang à travers cette entaille et placer l'échantillon dans un minitube contenant 240 µL de tampon PBS/glycérol/héparine/PMSF (ou 5 µL de sang dans 120 µL de tampon). Homogénéiser en tapotant le tube sur la table. Ces tubes doivent être conservés au frais jusqu'au retour au laboratoire où ils seront placés à -80°C. Ces prélèvements de sang doivent s'effectuer rapidement après la mort de l'individu, pour éviter la coagulation et s'assurer d'avoir les volumes nécessaires. Une fois le prélèvement sanguin effectué, peser l'épinoche et mesurer sa longueur standard (du bout du museau jusqu'au pédoncule caudal). Epinglez ensuite le poisson sur la planche de dissection et l'ouvrez.

Prélever la rate et la déposer dans un tamis (mailles Ø40 µm) (Figure 11). Broyer manuellement la rate dans 1 mL de L15 modifié à l'aide d'un tube à hémolyse. Ne pas hésiter à appuyer fortement pour récupérer toutes les cellules. Il ne doit pas rester de tissus visibles à l'issue du broyage. Récupérer au maximum le liquide passé au travers du tamis (suspension leucocytaire) et placer cet extrait cellulaire dans un puits de deepwell. Ajouter 1 mL de L15 modifié dans le puits pour porter le volume final à 2mL environ. La deepwell doit être conservée au frais durant la journée (sur glace ou non selon la température ambiante).



Figure 11 : Tamis utilisés pour broyer la rate et récupérer une suspension leucocytaire

Prélever rapidement le foie le placer dans un tube de broyage avec le tampon phosphate/glycérol/PMSF, le peser et placer le tube dans l'azote liquide. Attention : ne pas prélever la vésicule biliaire et ne pas la percer. En cas de perçage, éponger avec un peu de papier absorbant et le spécifier sur la fiche de dissection. Un rinçage au KCl est possible.

Déterminer visuellement le sexe du poisson à partir des gonades puis les prélever avec précautions, les placer dans la cassette d'histologie, les peser et placer la cassette dans le pot de formol. Attention : le rein peut se détacher en même temps que les gonades, dans ce cas, séparer le rein des gonades sans trop abîmer ces dernières qui doivent rester intactes pour l'histologie.

Prélever le rein, le placer dans le tube de broyage contenant le tampon de lyse, le peser et placer le tube dans l'azote liquide.

En fin de dissection, prélever un morceau de muscle caudal et le placer dans un tube 2 mL avec le tampon phosphate/glycérol/PMSF 0,2 prévu à cet effet. Placer ce tube dans l'azote liquide.



Figure 12 : Matériel déployé sur le terrain lors de la récupération des échantillons biologiques

Dès le retour au laboratoire, stocker dans un réfrigérateur à 4°C les extraits cellulaires issus de la rate. Les analyses en cytométrie de flux seront réalisées dès le lendemain. Stocker dans un congélateur à -80°C les échantillons de sang pour les dosages de VTG, ainsi que tous les tubes placés dans l'azote liquide en veillant à ne pas décongeler le contenu des tubes le temps du tri de ceux-ci.



## 5. MESURES DES BIOMARQUEURS

---

### 5.1. Biochimie

Les mesures de marqueurs biochimiques 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 duplicats.

#### 5.1.1. Récupération de la fraction S9 (foie et muscle)

##### 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 bille.
- 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 un aliquote dans une 2<sup>ème</sup> boîte de minitubes et congeler immédiatement ce 2<sup>ème</sup> aliquote.
- Conserver à +4°C l'aliquote de travail qui va servir à doser les protéines totales.

##### MATERIEL NECESSAIRE

- ▲ Centrifugeuse
- ▲ Broyeur automatique FastPrep 24-5G
- ▲ Minitubes 1,2 mL sur leur support avec cadre de maintien
- ▲ Bloc support réfrigérant en aluminium pour minitubes

### 5.1.2. 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'un aliquote de BSA conservé congelé, transfère en plaque 384 puits les échantillons dilués et la gamme de standards, ajoute le réactif de Bradford.

#### Réactifs et tampons

- Eau pure (machine Elix)
- Standard de BSA. Aliquotés d'environ 500 µl à 1000 µg/ml. (-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.

Volume réactif = [(nb échantillons + 4 standards)\*2\*95 µL] + 6000 µL]

#### 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 répliqués à l'aide d'une aiguille et relire la plaque. Des ménisques « en biais » peuvent engendrer des longueurs de trajet optique différentes entre les répliqués et ainsi influencer sur le résultat final. Le mélange avec l'aiguille égalise ces ménisques.



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 de protéines totales.

- Dépôt de la gamme standard (duplicat) : 100,6 µL/puits de standard sont déposés par le robot en duplicat 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 (duplicat) : 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.

### Expression 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/min). La rapporter en pmol de RF par minute et par mg de protéines.



#### 5.1.4. Activité glutathion-S-transférase hépatique (GST)

D'après Habig et al. (1974)

##### Principe

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



Figure 14: 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 tampons

- Préparer une solution de CDNB à 42 mM (8,509 mg/mL) dans de l'acétone (+4°C, stable 1 semaine)
- Préparer dans l'eau d'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.

##### 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.

	<b>Mix 1 plaque 384</b>
<b>Tp Phosphate 0,1 M pH 6,5</b>	24343 $\mu$ L
<b>CDNB 42 mM</b>	1329 $\mu$ L
<b>GSH 42 mM</b>	1329 $\mu$ 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 préparée à partir de l'étalon GST à 200 U/ml (congélateur -20°C) dans du tampon phosphate pH 6,5.
- Dépôt par le robot de 55  $\mu$ L d'échantillon (ou de standard) suivi de 45  $\mu$ L de mélange réactionnel, en plaque 384 puits transparente. Dosage réalisé en duplicat, 176 échantillons maximum par plaque.
- Lecture au SynergyH4 (Biotek) en absorbance à 340 nm en cinétique avec lecture de la plaque complète tous les 22 secs. Introduire immédiatement la plaque dans le lecteur préalablement thermostaté à 25°C. La réaction est linéaire pendant les trois premières minutes.

### Expression 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) calculée par régression linéaire. Une droite d'étalonnage est alors obtenue en exprimant la variation d'absorbance par minute (Abs/min) en fonction de la concentration en GST. La gamme est linéaire de 0 à 4 U/ml. 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 de protéine de S9).

### 5.1.5. 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 15).

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.

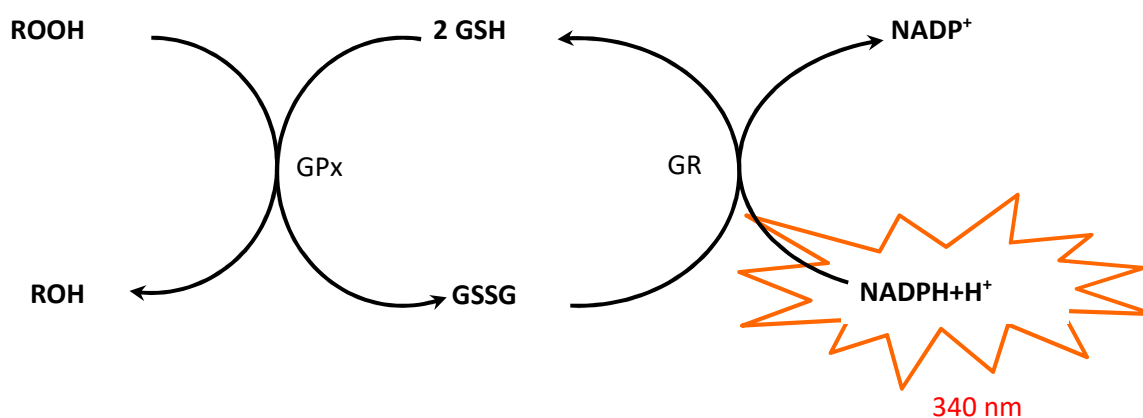


Figure 15 : Réaction catalysée par la Glutathion-péroxydase

#### Réactifs et tampons

- 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 NaHCO<sub>3</sub> 0,5 %.
- Solution de glutathion réductase 30 U/mL 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 réduisons donc le nombre de puits à lire pour obtenir des intervalles de temps réduits permettant d'exploiter une cinétique complète.

- Le robot dépose 10  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  du mélange réactionnel puis 33  $\mu\text{L}$  de cumène.
- La plaque est rapidement insérée dans le lecteur et les mesures d'absorbance à 340 nm en cinétique démarrent.
- Tracer  $\text{Abs} = f(\text{temps})$  et calculer la pente maximale ( $V_{\text{max}}$ ).
- Tracer la droite de régression de gamme étalon de GPx :  $\text{Abs}/\text{min} = f(\text{conc GPx})$ .



### 5.1.6. 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 16).



Figure 16: Couple d'oxydoréduction : glutathion oxydé (GSSG) et glutathion réduit (GSH)

#### Réactifs et tampons

- Tampon Phosphate pH 7,4 100 mM-EDTA 10 mM.
- Tampon Phosphate 100 mM-EDTA 10 mM – BSA 2,5 g/l
- 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. 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 :

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

	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  $\mu\text{M}$ ) diluée dans du Tp P/EDTA/BSA. En parallèle, il normalise les échantillons par leur charge protéique à 2,5 g/L dans du Tp P/EDTA à un volume de 64  $\mu\text{L}$  selon le fichier Excel saisi.
- Le robot ajoute 16  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de standard sont traités par 37,5  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  de mix et 40  $\mu\text{L}$  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 ( $V_{\text{max}}$ ) est fonction de la concentration en GSH dans le puits.

### 5.1.7. 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.



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  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consommés par minute (= 1 U de catalase).

#### Réactifs et tampons

- Solution Tampon phosphate pH 7,4 100 mM /  $\text{H}_2\text{O}_2$  28 mM : à préparer à partir d'une solution mère de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 8,82 M (stockée à +4°C). Pour une plaque de 96 puits, diluer 64,5  $\mu\text{L}$  dans 20 mL de tampon Phosphate. À conserver à l'abri de la lumière.
- Solution catalase standard à 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  : à préparer à partir de Catalase standard d'érythrocytes bovins EC 1.11.1.6 en poudre (1870 U/mg) (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. 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 en protéines totales).
- 100  $\mu\text{L}$  d'échantillons normalisés et de standards dilués sont ensuite déposés en duplicats dans une microplaque de quartz.
- Le robot ajoute 100 $\mu\text{L}$  de la solution tampon phosphate/ $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$  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.

### 5.1.8. Activité superoxyde-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 tampons

- Solution de  $\beta$ -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.
- $\beta$ -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
<b>Tp phosphate 0,1 M pH7,4</b>	80,07 $\mu$ L	36295 $\mu$ L
<b>NADH 7,5 mM</b>	4,00 $\mu$ L	1813 $\mu$ L
<b>EDTA 100 nM / <math>MnCl_2</math> 50 mM</b>	2,502 $\mu$ L	1133 $\mu$ L

- Le robot prépare une gamme d'étalonnage à partir du standard de SOD à 3000 U/mL ( $-20^\circ C$ ) comme suit : 0 – 0,1 – 0,25 – 0,5 – 1 – 2 U/ml
- En parallèle, les échantillons sont dilués en les normalisant à 5 g/L de protéines totales à partir d'une liste de travail Excel.
- Le robot dépose en plaque 384 : 10  $\mu$ L d'échantillon ou de standard dilué et ajoute 86,58  $\mu$ L de mélange réactionnel puis 10  $\mu$ L de  $\beta$ -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.

#### Expression 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. Le résultat obtenu correspond à 1 U/mL 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 de SOD donne l'activité de la SOD dans l'échantillon.



### 5.1.9. 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'acide 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 17). Les complexes TBARS formés sont dosés sur la base contre d'une gamme étalon de malondialdéhyde (MDA).

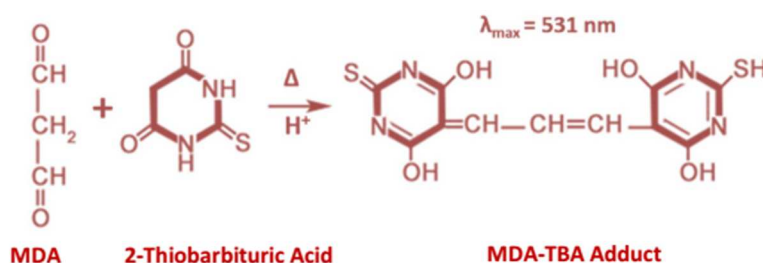


Figure 17 : Réaction entre le malondialdéhyde et l'acide thiobarbiturique

#### Réactifs et tampons

- Tampon phosphate 100 mM / EDTA 10 mM pH 7,8
- Tampon phosphate 100 mM / EDTA 10 mM / BSA 10 g/L à pH 7,8
- BHT 1 mM dissout 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.

#### 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) :

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

	1 échantillon	96 échantillons	176 échantillons
<b>Tp phosphate 0,1 M/EDTA 10 mM</b>	117	16311	26325
<b>BHT 1 mM</b>	6,14	856	1382
<b>TCA 50%</b>	30,7	4280	6908

<b>TBA 1,3%</b>	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 blancs 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  $\mu$ M) diluée dans du Tp P/EDTA/BSA 10 g/L.
- En parallèle, il normalise les échantillons par leur charge protéique (10 g/L pour les foies d'épinoches) dans du tampon Phosphate/EDTA selon le fichier Excel saisi (volume final : 35  $\mu$ L).
- 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 duplicat.
- 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.

### 5.1.10. Dosage des cholinestérases musculaires (ChE)

D'après Ellman et al. (1961)

#### Principe

Sur des échantillons de muscle ou de cerveau, on mesure la capacité des cholinestérase (ChE) à dégrader l'acétylthiocholine (ATCi), analogue structural de l'acétylcholine. La thiocholine formée réagit avec l'ion dithiobisnitrobenzoate (DTNB) pour former le 5-thio-2-nitro-acide benzoïque (TNB), un complexe de coloration jaune (Figure 18).

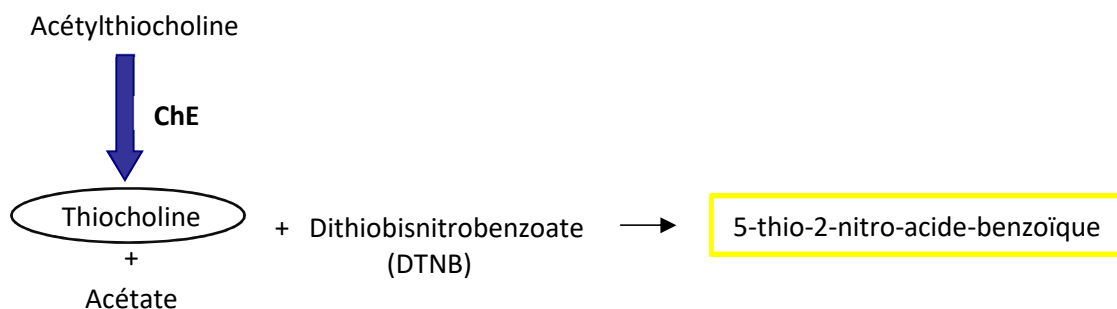


Figure 18 : Réaction catalysée par les ChE et formation du complexe coloré par complexation des thiocholines avec le DTNB

Afin de connaître l'activité de telle ou telle ChE on peut inhiber l'activité de la butyrylcholinestérase (BChE) par incubation de l'échantillon avec l'iso-OMPA à  $10^{-5}$  M. Seule l'activité acétylcholinestérase (AChE) sera alors mesurée. La vitesse de formation du TNB est proportionnelle à l'activité de l'enzyme.

#### Réactifs et tampons

- Tampon Phosphate 100 mM à pH 7,4
- Standard Acétylcholinestérase d'anguille électrique (SIGMA réf C2888) aliquoté à 105,2 U/mL dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,4
- Iodure d'acétylthiocholine (ACTI) (réf SIGMA A5751) aliquoté à 210 mM dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,4
- DTNB aliquoté à 21 mM dans du tampon phosphate 100 mM à pH 7,4
- Iso OMPA aliquoté à 510  $\mu$ M

#### Protocole

- Préparer un mélange réactionnel (mix) pour une plaque de 384 puits complète si seules les  $ChE_{\text{totales}}$  sont mesurées, sinon préparer un mélange réactionnel pour deux plaques 384 puits. Ce mélange inclut les volumes morts nécessaires. Concentrations finales : DTNB 0,2 mM ; ACTI 2 mM.

MIX	1 plaque 384 puits	2 plaques 384 puits
Tampon Phosphate 100 mM pH 7,4	39200 $\mu$ L	78400 $\mu$ L
ACTI 210 mM	400 $\mu$ L	800 $\mu$ L
DTNB 21 mM	400 $\mu$ L	800 $\mu$ L

Le robot permet de préparer le dosage d'activité des ChE<sub>totales</sub> mais aussi des AChE si l'on sélectionne en début de programme la réalisation de l'inhibition de la BChE par l'iso-OMPA en répondant « oui » à la question posée. Le robot déposera alors 2 µL d'Iso OMPA sur 100 µL d'échantillon dilué (concentration finale Iso-OMPA = 10<sup>-5</sup> M).

- Les échantillons seront d'abord normalisés par leur charge protéique à la concentration en protéines totales de 1,5 g/L.
- Le robot prépare la gamme d'AChE dans du tampon phosphate pH 7,4 à partir d'un standard à 105 U/ml aliquoté dans un minitube, aux concentrations suivantes : 0 - 0,03125 - 0,0625 - 0,125 - 0,25 - 0,5 U/mL.
- Si l'option du dosage des AChE a été choisie en début de programme :
  - Le robot déposera (en microplaque 96), 2 µL d'iso-OMPA sur 100 µL d'échantillon ou de standard dilué.
  - Mettre la plaque à incuber pendant 30 minutes à 25°C.
  - Après l'incubation, remettre la plaque sur le robot qui déposera alors 4,5 µL des échantillons incubés sur une microplaque 384 puits et ajoutera 90 µL de mélange réactionnel.
  - Lire alors aussitôt la plaque à 405 nm en mode cinétique pendant 10 minutes.
- Si seules les Che<sub>totales</sub> sont mesurées :
  - Le robot prélève et dépose en microplaque 384 puits 4,5 µL des échantillons dilués
  - Il ajoute 90 µL de mélange réactionnel
  - Lire alors aussitôt la plaque à 405 nm en mode cinétique pendant 10 minutes

L'ensemble des réactifs et échantillons doivent être maintenus à température ambiante sous peine d'inhibition de l'activité AChE. Thermostater le lecteur de microplaque à 25°C si la température de la pièce le nécessite.

### Expression des résultats

Une droite d'étalonnage est obtenue en exprimant la variation d'absorbance ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ) en fonction de l'activité du standard AChE. L'activité enzymatique est rapportée à la concentration en protéines dans le S9 donc exprimée en termes d'activité spécifique (U/g de protéines).

### 5.1.11. Concentration en spiggin rénale (SPG)

D'après Katsiadaki et al. (2002) et Sanchez et al. (2008)

#### Principe

La spiggin (SPG) est une protéine fortement hydrophobe sécrétée dans le rein des épinoches mâles et servant à la construction du nid. Sa synthèse est sous contrôle androgénique. Des contaminants environnementaux peuvent se lier au récepteur des androgènes et sont susceptibles d'induire la synthèse de spiggin aussi bien chez les mâles que les femelles et les juvéniles. La spiggin est donc un biomarqueur d'intérêt pour mettre en évidence les propriétés androgéniques de substances chimiques ou l'exposition à ces composés.

Le dosage par ELISA compétitif de la spiggin d'épinoche à trois épines repose sur la compétition de fixation de l'anticorps anti-HDR-16 entre la spiggin fixée sur les parois des puits d'une microplaque et la spiggin libre d'un échantillon biologique ou d'une solution standard de spiggin. Une réaction enzymatique produisant un produit coloré révèle la part d'anticorps fixés.

La méthode repose sur l'obtention de spiggin standard extraite à partir de reins d'épinoches exposées à un androgène (17  $\alpha$ -méthyltestostérone) et sur l'obtention d'un anticorps anti-HDR-16 dirigé contre une séquence peptidique de la protéine spiggin.

#### Dissolution des échantillons

Les reins sont décongelés et broyés dans leur tampon de dénaturation au broyeur (2x10 secondes) puis dénaturés en chauffant 2 h à 100 °C. Les reins dissouts peuvent être stockés à -80°C jusqu'au jour du dosage.

#### Protocole

- **Jour 1 :**
  - Coating : 100  $\mu$ L/puits de spiggin standard à 5 U/mL dans du tampon carbonate/bicarbonate 0,05 M pH 9,6. Incubation toute la nuit à 4°C.
  - Pré-incubation des échantillons et standards avec l'anticorps primaire anti-HDR-16.
  - Dilution en série du standard dans du PBS de 0,2 à 100 U/mL. Ajout d'un point maximum binding B0 ne contenant pas de standard. Dilution en série des échantillons du 1/50 au 1/50000 dans du PBS.
  - Mélange 1/1 des solutions diluées avec une solution d'anticorps primaire anti-HDR-16 diluée au 1/10000 (dilution finale 1/20000). Agitation pendant 30 min à température ambiante puis à 4°C toute la nuit.
- **Jour 2 :**
  - Lavage : 3 lavages au PBS/tween, 200  $\mu$ L/puits.
  - Saturation : 200  $\mu$ L de PBS/BSA 2% par puits pendant 1h à température ambiante.
  - Lavage : 3 lavages au PBS/tween 200  $\mu$ L/puits.
  - Incubation avec les anticorps primaires pré-incubés : 100  $\mu$ L de mélange anticorps/échantillons ou anticorps/standards pré-incubés sont déposés sur plaque et incubés 2h à température ambiante.
  - Lavage : 3 lavages au PBS/tween 200  $\mu$ L/puits.

- Incubation avec l'anticorps secondaire : 100 µL d'anticorps chèvre anti-lapin couplé à la HRP au 1/3000 dans du PBS/BSA 1 % sont déposés par puits et incubés 2h à 37°C.
- Lavage : 3 lavages au PBS/tween 200 µL/puits.
- Développement du système de révélation : 100 µL de TMB est ajouté par puits. La réaction est stoppée par 50 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M au bout de 30 min maximum ou lorsque la couleur bleue est suffisamment intense.
- Lecture et calculs : L'absorbance est lue à 450 nm. L'absorbance lue pour les puits blancs « Non Specific Binding » est retranchée à tous les autres puits. Le pourcentage de liaison de l'anticorps est calculé comme suit :

$$\% \frac{Bi}{B0} = \left( \frac{\text{absorbance standard ou échantillon}}{\text{absorbance liaison maximale}} \right) \times 100$$

Une courbe d'étalonnage est modélisée selon une équation à 4 paramètres (Hill) en exprimant le  $\% \frac{Bi}{B0}$  en fonction de la concentration en spiggin standard.

### 5.1.12. Concentration en vitellogénine circulante (VTG)

D'après Sanchez et al. (2008)

#### Principe

Le dosage de vitellogénine (VTG) est basé sur un ELISA compétitif indirect (Figure 19). Il fait appel à un anticorps polyclonal spécifique de la vitellogénine d'épinoche et un standard de vitellogénine d'épinoche obtenu par purification chez des individus induits à l'éthinyl oestradiol.

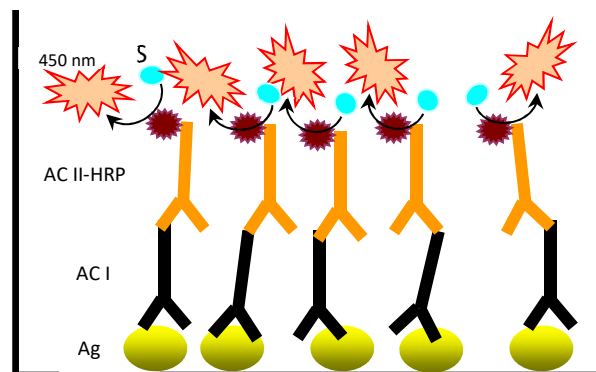


Figure 19: Schéma du principe de l'ELISA compétitif pour le dosage de la vitellogénine

#### Réactifs et tampons

- Tampon de coating carbonate pH 9,6 : Conserver à 4°C
- Tampon Phosphate-Buffered Saline Tampon (PBS) pH 7 : Conserver à 4°C
- Tampon de lavage : PBS/Tween 0,05 % : Conservation à 4°C.
- Tampon de dilution PBS/BSA 1 % : Conserver à 4°C.
- Tampon de saturation PBS/BSA 2 % : Conserver à 4°C.
- TMB substrat kit (Interchim) :
- Solution d'acide phosphorique H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M
- Anticorps primaire (GA306 Biosense Laboratories) dilué au 1/2000<sup>ème</sup> dans Tp de dilution PBS/BSA 1 %. Préparer pour une plaque complète.
- Anticorps secondaire (goat anti rabbit au 1/2000<sup>ème</sup> BioRad) dilué dans Tp de dilution PBS/BSA 1 % Préparer pour une plaque complète
- Standard de vitellogénine d'épinoche aliquoté à 1165 µg/mL
- Plaque Nunc Maxisorp 384 transparente

#### Protocole

Les échantillons sont testés sur 12 dilutions exécutées en série à partir d'une dilution initiale. Cette dilution initiale est choisie individuellement pour chaque échantillon. Elle dépend de la teneur en VTG attendue dans l'échantillon. En effet, des échantillons avec une teneur faible (mâles non exposés à un inducteur de VTG) pourront être dosés avec une dilution faible (type 1/5). À l'inverse, des échantillons



avec une forte teneur en VTG (ex : femelles ou mâles exposés à un inducteur fort type E2) devront être dosés avec une forte dilution initiale (type 1/100).

Le volume total de préincubation est de 180 µL. De cette préparation sera prélevé 75 µL (en duplicat soit 150 µL au total) pour dépôt dans un puits de plaque 384.

- Jour 1 :
  - Coating du standard de VTG par le robot : 75 µL par puits à 100 ng/mL dans du tampon de coating.
  - Mettre la plaque à agiter lentement à température ambiante pendant 30 min.
  - Incubation toute la nuit à 4°C.
  - Dilutions par le robot des échantillons et standard et préincubation avec l'anticorps primaire.
  
- Jour 2 :
  - Lavage de la plaque au PBS/Tween 0,05 % 4 fois avec un laveur de plaque (110 µL/puits)
  - Saturation au PBS/BSA 2 % : dépôt 115 µL/puits et incubation pendant 2h à 37°C
  - Lavage de la plaque au PBS/Tween 0,05 % 4 fois avec un laveur de plaque (110 µL/puits)
  - Transfert par le robot des échantillons préincubés en deepwell dans la microplaque avec 75 µL/puits (en duplicat)
  - Lavage de la plaque au PBS/Tween 0,05 % 4 fois avec un laveur de plaque (110 µL/puits)
  - Incubation avec l'anticorps secondaire couplé HRP dilué au 1/2000<sup>ème</sup> dans du tampon PBS/BSA 1 % à raison de 75 µL/puits et incubation 2 h à 37°C
  - Lavage de la plaque au PBS/Tween 0,05 % 5 fois avec un laveur de plaque (110 µL/puits)
  - Incubation avec le substrat TMB 75 µL/puits 30 min à température ambiante
  - Blocage de la réaction par ajout de 37,5 µl d'acide phosphorique par puits
  - Lecture à 450 nm au spectrophotomètre.

### Expression des résultats

- Soustraire la valeur moyenne de DO des puits « Non Specific Binding » à toutes les autres valeurs : (DO - NSB)
- Calculer le % d'inhibition de fixation de l'anticorps primaire à l'antigène fixé dans les puits pour les points de gamme et les échantillons selon
$$Bi/Bo = (DO-NSB)_{\text{blanc gamme}} - (DO-NSB)_{\text{échant}}$$
- Modéliser la courbe d'étalonnage  $Bi/Bo = f(\text{VTG})$  avec  $Bi/Bo$  en % et [VTG] en ng/ml selon une équation à 4 paramètres (équation de Hill).

- Calculer les teneurs en VTG des échantillons dans les puits à partir de leur Bi/Bo et de la courbe d'étalonnage uniquement lorsque  $20\% < (Bi/Bo)_{\text{échant}} < 80\%$
- Calculer la teneur en VTG des échantillons dans le plasma (ou homogénat) en tenant compte du facteur de dilution employé pour effectuer la mesure.

## **5.2. Cytométrie en flux**

Les suspensions leucocytaires obtenues à l'issue du broyage de la rate doivent être stockées au frais environ 12 h à  $4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  afin de laisser reposer les échantillons et limiter le stress lié au prélèvement. Après centrifugation (300 g,  $4\text{ °C}$ , 10 min), les échantillons sont remis en suspension dans 1 mL de milieu L15 complété. Un aliquot de 50  $\mu\text{L}$  de chacun des échantillons permettra de déterminer par cytométrie de flux (MACSQuantX<sup>®</sup> Miltenyi Biotec) la concentration leucocytaire. Pour ce faire, les leucocytes sont discriminés des érythrocytes fluorescents dans le violet. Ainsi, l'ensemble des échantillons est ajusté à  $10^6$  leucocytes/mL avec du milieu L15 complété pour permettre les autres analyses en cytométrie de flux.

### **5.2.1. Distribution et mortalité leucocytaire**

La distribution leucocytaire est obtenue par l'analyse de la complexité (Side Scatter, SSC) et de la taille (Forward Scatter, FSC) des cellules spléniques, permettant ainsi de différencier les lymphocytes plus petits et moins complexes des granulocytes-macrophages.

La mortalité cellulaire est déterminée grâce à un double marquage avec de l'iodure de propidium (Invitrogen, P3566,  $7,5\ \mu\text{M}$ ), un agent intercalant de l'ADN marquant spécifiquement les cellules nécrotiques ayant perdu leur intégrité membranaire (fluorescence rouge, FL3), et du YO-PRO-1 (Invitrogen, Y3603,  $5\ \mu\text{M}$ ), qui rentre dans les cellules apoptotiques via les récepteurs P2X7 et va émettre une fluorescence verte (FL1) après sa fixation sur l'ADN.

### **5.2.2. Activité de phagocytose**

L'activité de phagocytose est évaluée à partir de 200  $\mu\text{L}$  de cellules en suspension auquel 10  $\mu\text{L}$  d'une solution de billes fluorescentes (fluorosphères carboxylate-modified, 1  $\mu\text{m}$ , Invitrogen, P8823,  $2,7 \times 10^{10}$  particules/mL) diluées au  $1/10^{\text{ème}}$  dans du milieu L15 modifié. Les échantillons sont incubés pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante. L'efficacité de phagocytose, détectée en fluorescence verte (FL1), correspond à l'attachement et/ou à l'internalisation de trois billes ou plus et la capacité de phagocytose à l'attachement et/ou à l'internalisation d'une bille ou plus.

### **5.2.3. Flambée oxydative**

La flambée oxydative se mesure à l'aide d'un indice de stimulation (index) qui se traduit par le rapport entre la production intracellulaire d'ERO lorsque la cellule est stimulée (ERO Activé) et la production intracellulaire d'ERO basale (ERO basal). Pour déterminer le niveau d'ERO basal, 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon sont incubés avec 1,5  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>-DCFDA (Invitrogen, 590  $\mu\text{M}$ , solvant DMSO) pendant 30 minutes à l'obscurité et température ambiante. Pour le niveau d'ERO activé, 1,5  $\mu\text{L}$  de PMA (Phorbol-12-Myristate-13-acétate, Sigma-Aldrich, 0,16  $\mu\text{M}$ , solvant DMSO) est ajouté en plus, afin de stimuler la production de peroxyde d'hydrogène. L'oxydation de la molécule de H<sub>2</sub>-DCFDA en DCF (fluorescent dans le vert) par les ERO est quantifiée en moyenne d'intensité de fluorescence dans le vert (FL1).

### **5.2.4. Présence en lysosomes**

La présence en lysosomes est mesurée en incubant 200  $\mu\text{L}$  d'échantillon avec 3  $\mu\text{L}$  d'une solution d'acridine orange diluée au  $100^{\text{ème}}$  (C17H19N3, Sigma Aldrich, H<sub>2</sub>O comme solvant, 0,02 %) pendant 20 minutes à l'obscurité et à température ambiante. L'acridine orange va pénétrer dans les lysosomes et capter un proton ce qui va le bloquer à l'intérieur du lysosome. Les amas d'acridine orange vont

émettre une fluorescence rouge (FL3) lorsqu'ils sont stimulés par de la lumière bleue. Plus la moyenne de fluorescence est élevée, plus le nombre de lysosomes stables est élevé.

## RÉFÉRENCES

---

- Babo S, Vasseur P (1992) In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 22:61–68. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90036-M](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90036-M)
- Beers RF, Sizer IW (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133–140
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- De Kermoyan G, Pery A, Porcher J-M, Beaudouin R (2013) A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions. *Mathematical Biosciences* 244:148–153. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001>
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr. V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Flammarion P, Devaux A, Nehls S, et al (2002) Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol Environ Saf* 51:145–153. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2134>
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249:7130–7139
- Katsiadaki I, Scott AP, Hurst MR, et al (2002) Detection of environmental androgens: A novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210924>
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95:351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70:158–169. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:0022214367900765>
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* 154:536–541. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Sanchez W, Goin C, Brion F, et al (2008a) A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147:129–137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.08.007>
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, et al (2008b) Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. *Environment International* 34:490–498. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.11.003>
- Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, et al (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol Toxicol* 10:415–421. <https://doi.org/10.1007/BF00755791>

## Liste du matériel nécessaire à la récupération des épinoches

### Récupération des cages

- Gants latex ou nitrile
- Seaux et fût avec couvercle
- Epuisettes
- Bottes et waders
- Grand bac pouvant contenir une cage
- Sonde physicochimique
- Clé à cliquets et/ou pince coupante

### Dissection

- Tables pliantes
- Chaises
- Barnum
- Fiche de dissection + stylo
- 2 Trousses à dissection complètes
- 3 Planches dissections + épingles
- 2 balances (dont une de précision)
- 2 batteries chargées pour les balances
- Coupelles de pesées
- MS222 (Tricaine methanesulfonate) en poudre

### Divers

- Poubelle normale
- Poubelle dasri
- Poubelle déchets liquide
- Entonnoir

### Matériel spécifique aux dosages en cytométrie

- Tamis stériles (maille  $\varnothing 40\mu\text{m}$ )
- Boîtes de pétri
- Tubes à hémolyses
- Deepwell 96 puits
- Films pour deepwell
- Bouteille de L15 modifiée (voir 4.1)
- Pipette P1000 et les cônes correspondants

### Matériel spécifique aux dosages biochimiques

- Voyageur rempli d'azote liquide
- Héparine
- Pipette P10 et les cônes correspondants
- Pipette P1000 et les cônes correspondants
- Solution de PMSF 1M (voir 4.1)
- Minitubes 1,2mL et rack de maintien (voir 4.1)
- Solution de conservation PBS/glycérol 20%/Héparine 30% (voir 4.1)
- Tubes à bouchon vissant préremplis de billes en verre ( $\varnothing 1\text{mm}$ ) (voir 4.1)
- Solution de conservation tp phosphate (pH 7,8 - 0,1M) / glycérol 20% (voir 4.1)
- Tubes contenant les billes en verre et le tampon de dénaturation (voir 4.1)

### Matériel spécifique à l'histologie

- Pot contenant du formol (4%)
- Cassettes de prélèvement numérotées (voir 4.1)
- Mousses de biopsie pour cassettes d'histologie

