



FACULTÉ DES SCIENCES

Réponses à un stress environnemental induit
par le cadmium chez un crustacé euryhalin,
Eriocheir sinensis.

Approche intégrative incluant une analyse du
protéome

Dissertation présentée par

Frédéric SILVESTRE

en vue de l'obtention du grade
de Docteur en Sciences

Composition du jury :

P. Devos (Promoteur, FUNDP)

M. Raes (Présidente du jury, FUNDP)

R. Blust (Ecophysiology & Biochemistry, UIA)

P. Kestemont (FUNDP)

A. Péqueux (Physiologie animale, ULg)

© Presses universitaires de Namur & Frédéric Silvestre
Rempart de la Vierge, 13
B - 5000 Namur (Belgique)

Toute reproduction d'un extrait quelconque de ce livre,
hors des limites restrictives prévues par la loi,
par quelque procédé que ce soit, et notamment par photocopie ou scanner,
est strictement interdite pour tous pays.

Imprimé en Belgique
ISBN: 2-87037-492-5
Dépôt légal: D / 2005 / 1881 / 16

10. ANNEXES

10.1. Paramètres physico-chimiques de l'eau d'où proviennent les crabes chinois

Les crabes chinois utilisés lors de ce travail ont été prélevés dans des lacs dulcicoles situés près de Emden (nord de l'Allemagne) par un pêcheur/aquaculteur. Deux périodes de capture ont eu lieu chaque année : la première au printemps (mars-avril), la seconde en automne (octobre-novembre). Les paramètres physico-chimiques de l'eau sont présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Paramètres physico-chimiques de l'eau de lacs dulcicoles près de Emden (All.)

t°C (min-max)	pH	[O ₂] (mg l ⁻¹)	Conductivité (mS/cm)	Osmolalité (mOsm kg ⁻¹)	[Na ⁺] (mM)	[Ca ²⁺] (mg l ⁻¹)
4-14,6	7,9	11,8	2,2	20,3	26	162

10.2. La technique de perfusion de branchies

La figure 1 illustre le dispositif expérimental mis en place afin de perfuser des branchies de crabes. Les branchies sont prélevées en les sectionnant le plus près possible de leur point d'insertion. Elles sont ensuite immergées dans une solution de Ringer (de composition ionique proche de l'hémolymphe) et perfusées à l'aide d'un cathéter et d'une seringue afin d'enlever l'hémolymphe qui pourrait coaguler et boucher les conduits vasculaires. Ensuite, un cathéter est inséré dans le vaisseau afférent et maintenu en place à l'aide d'une pince. Un autre cathéter est inséré dans le vaisseau efférent. La branchie est placée dans un berlin de 25 ml rempli d'une solution reflétant le milieu environnant et appelé milieu OUT (3). Une arrivée d'air permet à la branchie de ne pas manquer d'oxygène (2). Le volume du berlin doit rester constant. Dans le cas contraire, cela traduirait une fuite de liquide et impliquerait l'arrêt de la perfusion. Le cathéter entrant dans le vaisseau afférent est relié par l'autre extrémité à une ampoule de 100 ml contenant du Ringer (1). Le liquide pénètre à l'intérieur de la branchie perfusée et entre en contact avec l'épithélium branchial. C'est à ce niveau que les échanges ioniques ont lieu. Le liquide circulant ressort par le cathéter provenant du vaisseau efférent et est recueilli dans des petites fioles (milieu IN) (4).

Différentes paramètres peuvent être mesurés à partir de ce dispositif expérimental. Ainsi, la différence de potentiel (ddp) peut être mesurée entre le milieu OUT et le milieu IN grâce à deux électrodes. Par convention, le signe est donné par le milieu IN. De la sorte, une ddp positive pour les branchies antérieures et une ddp négative pour les branchies postérieures ont été mises en évidence (voir chapitre 1.6.2). Des études de flux entrants et sortants de divers ions peuvent également être menées. Les premières nécessitent l'addition d'isotopes radioactifs (^{109}Cd , ^{22}Na , ^{36}Cl ,...) dans le milieu OUT. La radioactivité est ensuite mesurée dans le milieu IN. Les secondes demandent l'ajout d'isotopes radioactifs dans le milieu contenu par l'ampoule. La radioactivité est alors mesurée dans le milieu OUT.

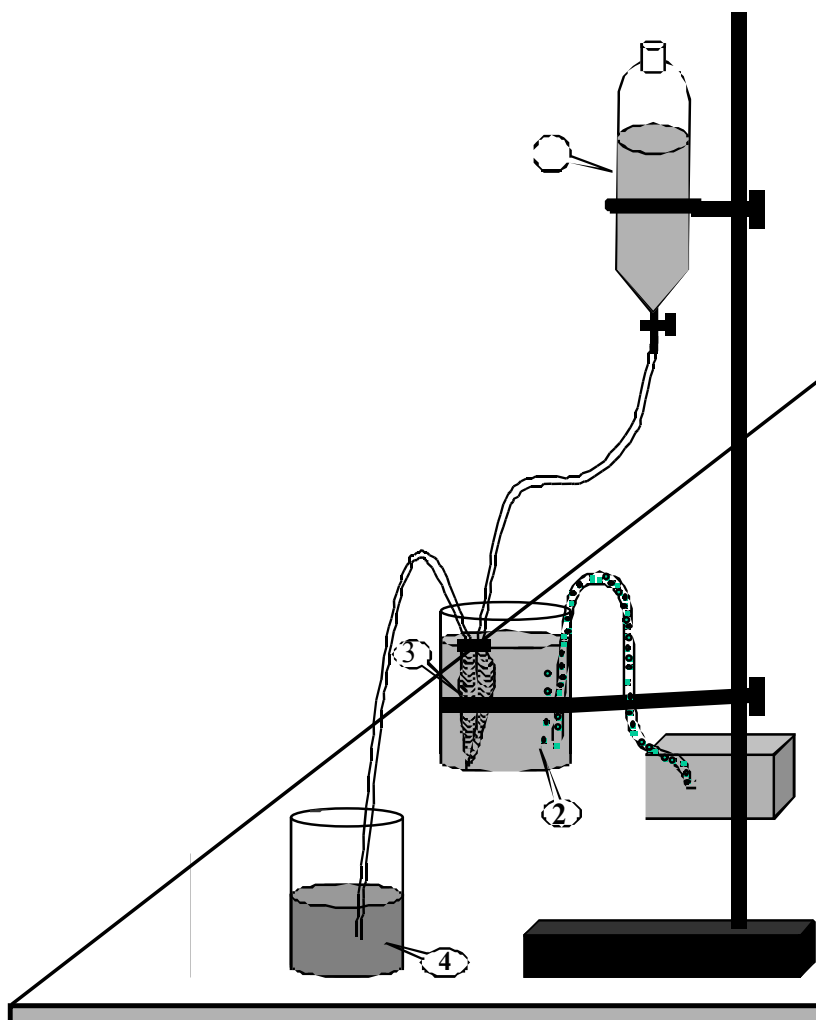


Fig. 1. Dispositif expérimental permettant de perfuser des branchies de crabes. (1) et (4) milieux IN; (2) arrivée d'air, (3) milieu OUT. D'après Mo (1999).

10.3. Exemple de slot blot

La technique du slot blot a été utilisée afin de mesurer le niveau d'expression de la HSP70 (voir chapitre 6). Après avoir testé si un anticorps primaire reconnaissait la protéine recherchée et n'interagissait pas avec d'autres protéines, on peut utiliser un slot blot. Cette technique ne fait pas appel à une séparation des protéines (électrophorèse) préalable à l'application de l'anticorps. Dans ce schéma, 36 puits sont chacun rempli avec 300 µl d'une solution contenant l'échantillon. Les puits 1 à 5 et 43 à 47 sont remplis avec une quantité décroissante d'un étalon. Les puits de la colonne 6 sont remplis avec une solution tampon et servent de blancs (Fig. 2.).

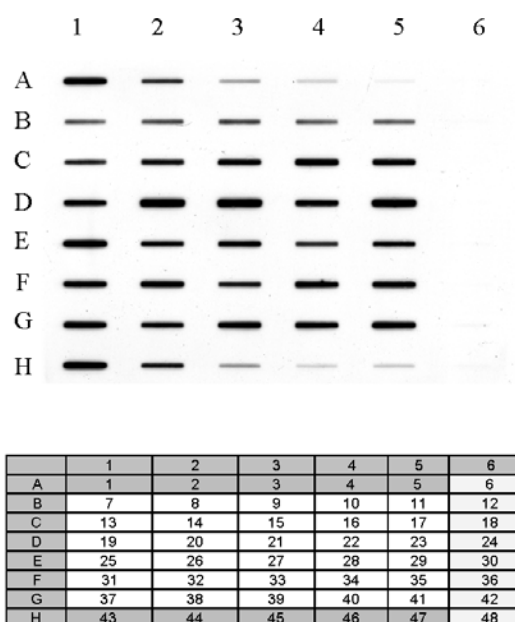


Fig. 2. Exemple d'image obtenue grâce à un slot blot (A) et tableau reprenant les numéros de puits (B)..

10.4. Suppléments à l'analyse protéomique

10.4.1. Gel à large gamme de pH.

Avant d'utiliser une gamme de pH plus étroite pour la migration des protéines en fonction de leur pI , et d'ainsi obtenir une meilleure résolution, nous avons tout d'abord réalisé un gel dans une gamme de pH 3-10 (Fig. 3.). Cet essai nous a permis d'observer que la majorité des protéines étaient comprises entre un pH de 4 et de 7.

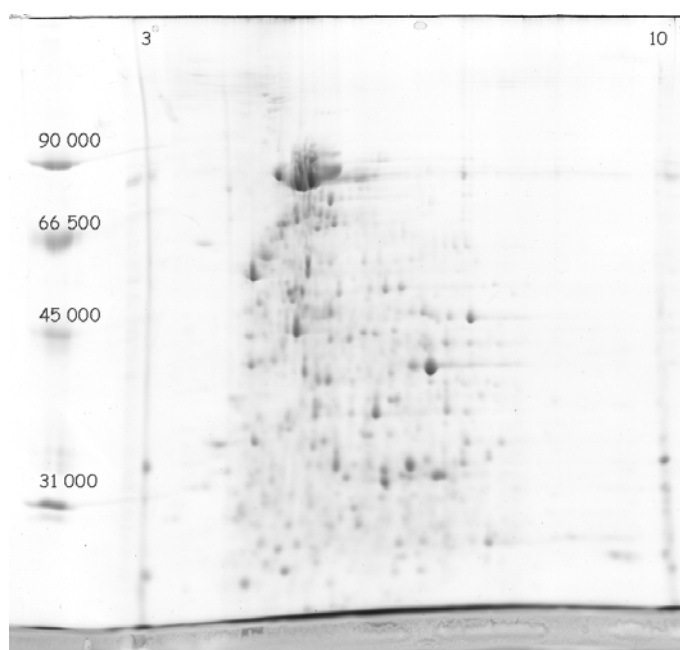


Fig. 3. Gel d'électrophorèse 2D obtenu à partir d'une branchie antérieure de crabe chinois *Eriocheir sinensis*. pH:3-10; %acrylamide: 12,5.

10.4.2. Volumes normalisés moyens

La figure 4 montre les volumes normalisés moyens obtenus dans chaque condition expérimentale. La soustraction du bruit de fond a été réalisée grâce au mode « *non-spot* ». La normalisation a été réalisée en divisant le volume calculé pour un spot, par la somme des volumes calculés pour tous les spots d'un même gel, et en le multipliant par la somme des aires de tous les spots d'un même gel. Cette méthodologie permet d'obtenir des résultats comparables entre gels.

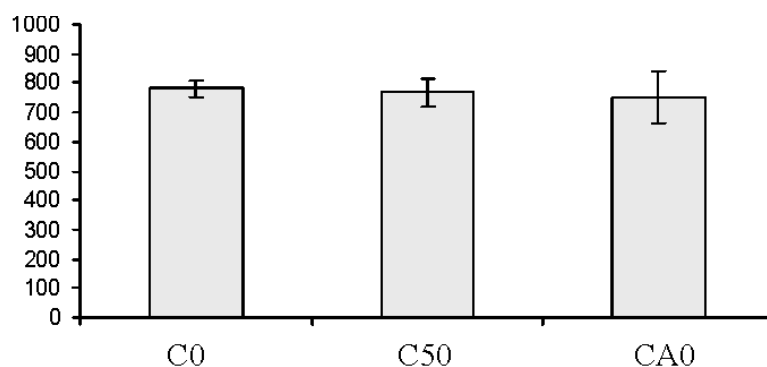


Fig. 4. *E. sinensis*. Volumes normalisés moyens obtenus pour chaque condition expérimentale. N=6 gels par condition.

10.4.3. Gels utilisés dans ce travail

Les figures 5, 6 et 7 présentent les 18 gels analysés pour ce travail (conditions C, C50 et CA0, respectivement).

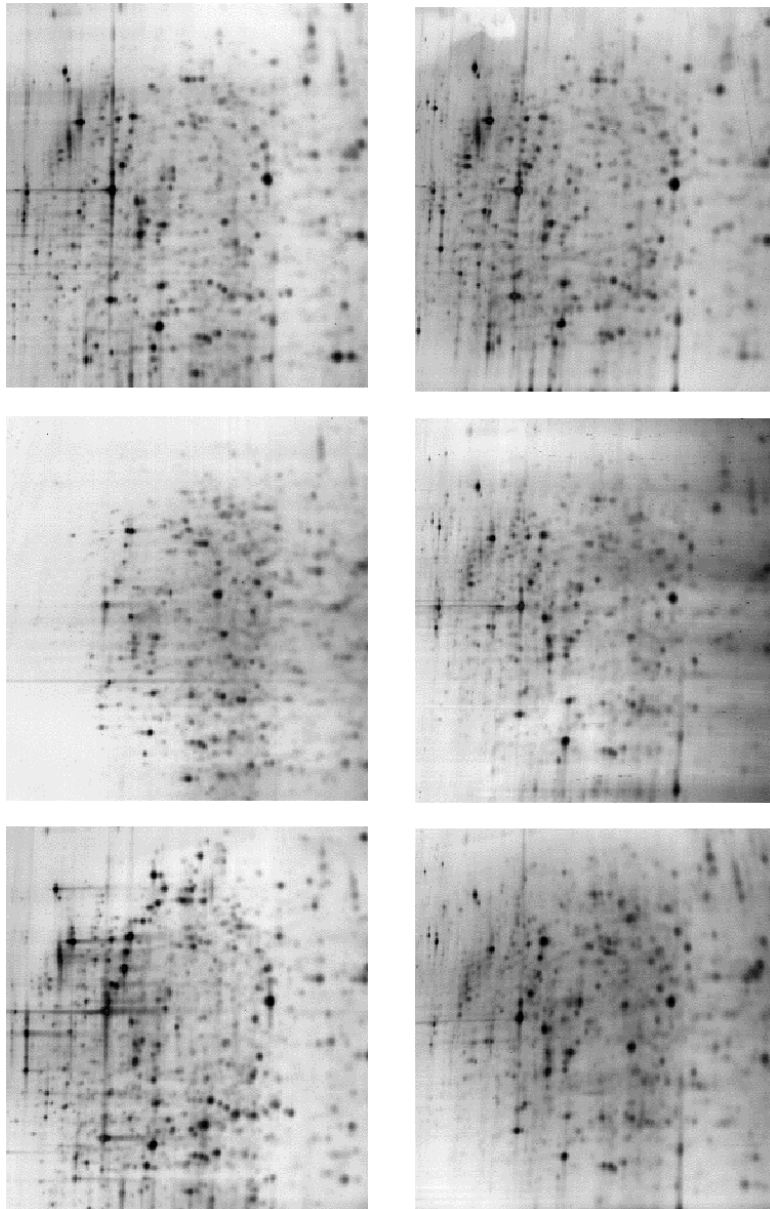


Fig. 5. 6 gels d'électrophorèse 2D obtenus à partir de branchies antérieures de crabes chinois *Eriocheir sinensis*.
Condition: témoins (C0).

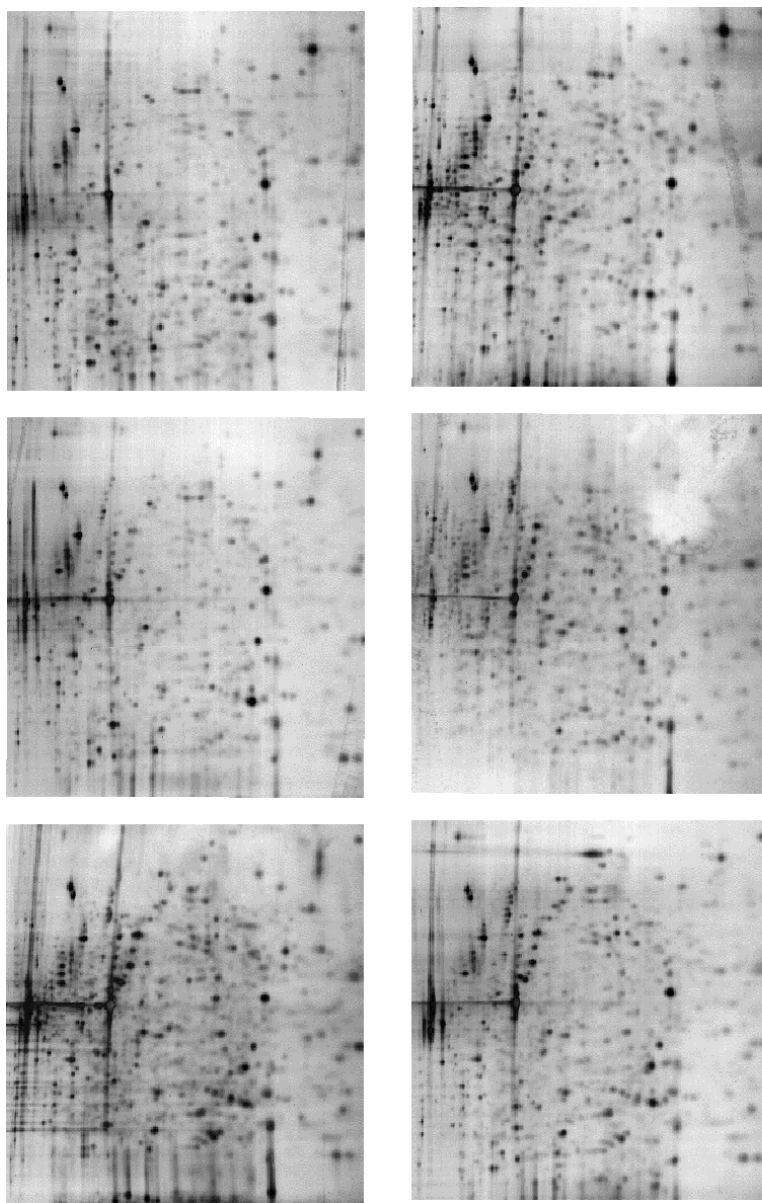


Fig. 6. 6 gels d'électrophorèse 2D obtenus à partir de branchies antérieures de crabes chinois *Eriocheir sinensis*.
Condition: 50 µg Cd l⁻¹ pendant 30 jours (C50).

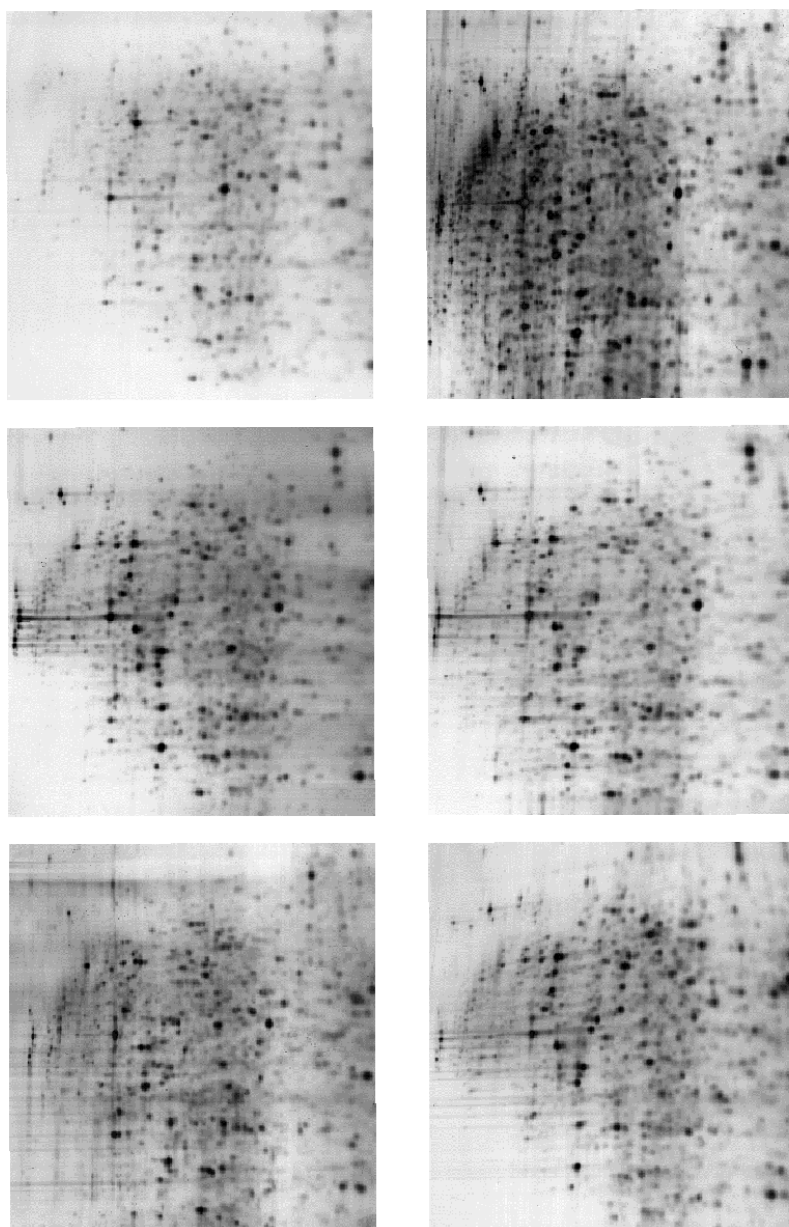


Fig. 7. 6 gels d'électrophorèse 2D obtenus à partir de branchies antérieures de crabes chinois *Eriocheir sinensis*. Condition: 500 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ pendant 3 jours (CA0).

Remerciements

Comme vous avez pu le constater, ce travail s'est voulu être le résultat d'une approche intégrée. D'abord au niveau des aspects de la biologie qui y ont été abordés, mais également au niveau des personnes ayant contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de six années de dur labeur.

C'est grâce, avant tout, à Pierre Devos que cette thèse a pu débuter et, surtout, arriver à son terme. Depuis un simple entretien d'embauche jusqu'au dépôt de ce manuscrit, je vous suis reconnaissant de la liberté dont j'ai pu bénéficier dans mes choix de recherche. C'est grâce à vous que j'ai pu développer ma créativité, qualité nécessaire mais parfois oubliée dans le monde scientifique.

Mais la créativité n'est rien sans une rigueur mêlée d'un scepticisme qui incitent à une remise en question continue du travail accompli. Gérard, tu es l'esprit critique de la biochimie, tellement nécessaire au bon fonctionnement du labo.

En plus de la créativité et de la rigueur, ce travail a pu bénéficier de l'expertise de deux techniciennes hors du commun. Fidèles de la première à la dernière heure, Marie-Claire et Martine, vous êtes un peu l'âme du grand labo du deuxième. Sa renommée dépend de vous, bien plus que de la couleur mauve de son mur.

Cela m'amène à avoir une pensée émue pour feu le laboratoire de physiologie et biochimie comparées. Anne, Anne-Marie, Dominique, Manu, Jiling, Olivier, vous m'avez accompagné au début de mon travail, et m'avez permis de m'acclimater rapidement aux facs.

Je ne peux aller plus loin sans mentionner mes « compagnons didactiques ». En effet, l'assistantat, c'est 50% de recherche, 50% d'enseignement (en théorie !). La moitié de mon temps s'est donc déroulée au côté d'étudiants. Des moments inoubliables aux TP de zoo et au stage de biologie marine seront toujours associés aux noms de Laurence, Luc, François, Patrick, Anne-Laure, Laurent et Lionel. Mais ces moments seront aussi associés aux « deuxième candi bio ». Vous m'avez fait découvrir l'enseignement de la meilleure façon qu'il soit.

Revenons un moment au sujet principal (et unique) abordé dans ce manuscrit : le travail scientifique. Il n'aurait pu être du même niveau sans les apports conjoints de plusieurs « spécialistes ». En effet, l'approche protéomique n'a été possible que grâce au soutien et à l'aide de membres de l'URBC, parmi lesquels Martine Raes, Valéry, Marc et Catherine. J'allais oublier celui sans qui le terme protéomique n'aurait plus de sens, et sans qui les gels 2D s'apparenteraient à une aventure homérique : Edouard. Enfin, Jean-Jean, tu as tenu dans ce travail une place digne d'Achille à la conquête de Troie. Sauf que toi, ton talon se transforme en talent lorsqu'il s'agit de réaliser des études de protéomique.

Les « spécialistes » de la microscopie électronique se reconnaîtront aisément sous les noms de Chantal, Marie-France et Yves. Alors que Pierre, « spécialiste » du labo du dessus, aura permis les analyses de Cd et de métallothionéines. Enfin, André, le « spécialiste » liégeois, m'a appris à perfuser des branchies de crabes, ainsi qu'à négocier en allemand l'achat répété de plusieurs dizaines de kilos de crabes chinois.

Je tiens également à mentionner l'importance qu'ont eu les membres de l'URBO tout au long de ces 6 années. Que ce soit autour d'une table au FacFood, à la cafet ou au labo, l'esprit « URBO » est entretenu au fil des années par (en vrac) Gersande, Nicolas, Virginie, Amélie, Giselle, Emilie, Sylvain, Rita, Robert, Jean-Claude Micha, Patricia, Caroline, Laetitia, Neila, Yves, Stéphanie, Laura, Marie-Astrid, Geoff, Tu, Bruno, Stéphane, André, David, Pierre, Laurent, Hugo, Claude, Véronique, Jean-Pierre Descy, Pierre-Denis, Gaël, Thierry, Sam. Sans oublier Delphine et Christelle, mes deux « compagnes » de fin de thèse.

J'exprime par ailleurs toute ma reconnaissance aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de prendre un peu de leur temps afin de me faire profiter de leur expérience.

Enfin, je terminerai en remerciant ma famille et mes meilleurs amis pour leur soutien et leur patience.

Merci à toi, Karin, d'être toujours à mes côtés, même dans les moments difficiles.