



HAL
open science

Mise au point de la quantification d'un marqueur précoce de stress cellulaire chez les larves aquatiques de *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera, Baetidae) collectées en région Méditerranéenne

Xavier Moreau, Laetitia de Jong, Emmanuel Wafo, Florence Chaspoul

► **To cite this version:**

Xavier Moreau, Laetitia de Jong, Emmanuel Wafo, Florence Chaspoul. Mise au point de la quantification d'un marqueur précoce de stress cellulaire chez les larves aquatiques de *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera, Baetidae) collectées en région Méditerranéenne. *Études vauclusiennes*, 2014, 82, pp.85-92. hal-01452766

HAL Id: hal-01452766

<https://hal.science/hal-01452766>

Submitted on 2 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at:
<https://www.researchgate.net/publication/309154262>

Mise au point de la quantification d'un marqueur précoce de stress cellulaire chez les larves aquatiques de Cloeon...

Article *in* Etudes vauclusiennes · January 2014

CITATIONS

0

READS

11

4 authors, including:



[Xavier Moreau](#)

Aix-Marseille Université

46 PUBLICATIONS 315 CITATIONS

SEE PROFILE

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Effect of pollutants on cell differentiation, epithelial patterning and animal fertility [View project](#)

Mise au point de la quantification d'un marqueur précoce de stress cellulaire chez les larves aquatiques de *Cloeon dipterum* (Ephemeroptera, Baetidae) collectées en région Méditerranéenne

Xavier MOREAU¹, Laetitia DE JONG¹, Emmanuel WAFO² & Florence CHASPOUL²

1. Aix Marseille Université CNRS IRD, Avignon Univ. IMBE UMR 7263, Campus Saint Charles, Case 73, 3 place Victor Hugo, 13331 Marseille cedex 3, France
xavier.moreau@imbe.fr ; laetitia.dejong-moreau@imbe.fr

2. Aix Marseille Université CNRS IRD, Avignon Univ. IMBE UMR 7263, Faculté de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385, Marseille cedex 5
emmanuel.wafo@univ-amu.fr ; florence.chaspoul@imbe.fr

Résumé : L'objectif de cette étude est de calibrer un biomarqueur de stress cellulaire, l'induction des protéines de choc thermique HSP₇₀, chez des invertébrés aquatiques prélevés dans une roubine méditerranéenne, pour une utilisation comme outil de diagnostic précoce du risque écologique. Les premiers prélèvements permettent de retenir les larves de l'éphéméroptère *Cloeon dipterum* (L., 1761) comme modèle d'étude car elles sont les seules à y être présentes toute l'année et en quantité suffisante. La mise au point de la quantification du biomarqueur permet de sélectionner les larves de stade 5 et au-delà pour cette calibration. Les taux de HSP₇₀ mesurés correspondent à des concentrations basales car obtenues chez des larves en absence de stress thermique naturel et dans un milieu où les polluants ne dépassent pas le « PEC » (Probable Effect Concentration), seuil au dessus duquel il est probable d'observer des effets toxiques (Mac Donald et al., 2000).

Mots-clefs : Biomarqueur, *Cloeon dipterum*, risque écologique, immuno-dosage ELISA, protéines de choc thermique

Abstract : The aim of this study is to calibrate a biomarker of cellular stress, the heat shock protein (HSP₇₀) induction, in aquatic invertebrates collected in a little Mediterranean run-off, as a tool for early ecological risk assessment. Larvae of the Ephemeroptera *Cloeon dipterum* (L., 1761), present all over the year and in a suitable amount, are chosen as biological model. The development of the biomarker quantification allows choosing the stage 5 and older larvae for this calibration. As the larvae are obtained in absence of natural thermal stress and from a run-off where sediment pollutant concentrations do not exceed the threshold above which adverse effects frequently occurred, the « Consensus-based PEC » (Probable Effect Concentration) (Mac Donald et al., 2000), the measured HSP₇₀ concentrations reflect a basal level.

Key-words : Biomarker, *Cloeon dipterum*, ecological risk, ELISA immunoassay, heat shock proteins

Introduction

Il est considéré qu'un biomarqueur toxicologique constitue une réponse biologique (moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui donne une mesure d'exposition et/ou d'effets produits par un ou plusieurs xénobiotiques (Lagadic et al. 1997 ; Wirth et al., 2003). Ces biomarqueurs sont des outils importants pour améliorer l'évaluation du risque d'altérations cellulaires et la connaissance des mécanismes de défense/résistance des organismes exposés. Parmi ces mécanismes, les protéines de stress appelées protéines de choc thermique HSP₇₀ (*Heat Shock Proteins*) sont des protéines chaperonnes qui permettent de maintenir la conformation tridimensionnelle des autres protéines cellulaires qui auraient pu être altérées suite à une exposition à des xénobiotiques. Ceci leur confère un rôle fondamental dans le fonctionnement cellulaire de base. Suite à un stress cellulaire, leur induction, autrement dit l'augmentation de la concentration cellulaire via une néosynthèse cellulaire, favorise la réparation des protéines endommagées. Leur induction rapide et leurs fonctions introduisent une relation directe entre le niveau d'expression de ces protéines et les dommages protéiques intracellulaires (Gupta et al., 2010). Elles agissent donc de manière précoce en atténuant l'effet de la perturbation environnementale

subie par l'organisme. L'induction des HSP₇₀ peut être observée suite à une multitude de perturbations environnementales : choc thermique, choc osmotique ou exposition à de nombreux xénobiotiques tels que les éléments traces métalliques (Morimoto, 1998 ; Cimino et al., 2002 ; De Jong et al., 2006, 2008 ; Gupta et al., 2010 ; Morales et al., 2011).

Afin d'utiliser ce biomarqueur comme outil de diagnostic du risque écologique, il est nécessaire de connaître les facteurs biotiques, c'est-à-dire liés à l'organisme étudié, mais aussi les facteurs abiotiques autres que les xénobiotiques, qui pourraient influencer cette induction.

Les travaux présentés ici concernent les premières étapes d'un suivi à long terme, de dix années (2009-2019), de marqueurs précoces de stress cellulaires. Notre objectif est d'étudier l'induction des HSP₇₀ en tant que biomarqueur chez des invertébrés aquatiques collectés dans une roubine méditerranéenne servant de site-refuge durant la saison estivale et permettant un suivi annuel des populations. Ainsi, après avoir identifié les populations présentes tout au long de l'année, nous avons mis au point une méthode de quantification des HSP₇₀ pour suivre leur induction chez les invertébrés sélectionnés. En parallèle, un suivi physico-chimique de la roubine donne un

premier diagnostic de l'état de contamination actuel et permettra de suivre son évolution au cours des 10 années du suivi.

Les résultats préliminaires obtenus au début de l'étude sont présentés ici et donnent des éléments de réponse aux points suivants :

- Quels invertébrés seront pris comme modèle ?
- Quel est l'état de contamination des sédiments ?
- Quantifier l'induction des HSP₇₀ chez le ou les invertébrés par dosage immuno-enzymatique (technique ELISA –*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) ;
- Quelles sont les variations biotiques, spécifiques à l'organisme choisi, influençant l'induction du biomarqueur ?

Matériel et méthodes

1.Site de prélèvement [Fig. 1]

Les prélèvements ont été effectués dans une roubine située à proximité d'une plate-forme logistique de stockage, située dans le sud de la plaine de Crau (Camargue, France), juste après sa mise en place (latitude : 43 ; 28 ; 16,9 et longitude : 4 ; 52 ; 37,1).



Figure 1 : Vue du site de prélèvement dans une roubine de la plaine de la Crau (Camargue, France).

2. Prélèvements et paramètres limnologiques

Dans le présent article, sept prélèvements ont été effectués, cinq en 2009 à deux mois d'intervalle puis deux en janvier et mars 2012. Les prélèvements de 2009 ont servi à choisir l'invertébré modèle pour l'étude du biomarqueur et ceux de 2012 ont servi à la mise au point de la quantification du biomarqueur. Les prélèvements sont réalisés à l'aide d'un filet à plancton de maille 125 μm . Le matériel biologique est immédiatement fixé dans un Tampon Phosphate (0,1 M ; pH 7,2) contenant 1 % de paraformaldéhyde (PFA 1 %) (TP-PFA) et conservé à 4°C jusqu'aux expérimentations. Une fois au laboratoire, les organismes sont triés sous loupe binoculaire dans le tampon phosphate froid. En 2012, les invertébrés

vivants sont également rapportés et triés au laboratoire dans l'eau de prélèvement puis conservés dans une glacière à 10°C pendant une nuit.

Sur le terrain, les paramètres limnologiques suivants sont systématiquement mesurés : température, salinité, concentration en O₂ dissous (mg.L⁻¹) et pourcentage de saturation en O₂, pH, conductivité (C₂₅ en $\mu\text{S.cm}^{-1}$). Ces paramètres abiotiques pouvant influencer la réponse biomarqueur, il est important de les considérer.

3. Dosages des contaminants des sédiments

Pour chaque échantillonnage biologique, est réalisé un prélèvement de la surface des sédiments à l'aide d'une drague manuelle en vue d'un dosage des contaminants majeurs de l'environnement : hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), polychlorobiphényles (PCBs), éléments traces métalliques (ETMs) et pesticides. Le choix de ces contaminants s'explique par le fait que la roubine est localisée à proximité de la plateforme métallique de stockage, qu'un trafic routier important est amené à se développer et enfin que cette roubine est située sous les vents dominants, non loin des vergers, du sud de la plaine de la Crau.

3.1. HAPs

Les échantillons de sédiments sont préalablement homogénéisés, puis séchés à 37°C pendant au moins 72 h, puis ils sont tamisés. Les fractions < 2 mm sont finement broyées et mises en pots.

Seize HAPs, considérés comme prioritaires par l'USEPA (*United States Environment Protection Agency*), sont recherchés. Après extraction et purification des sédiments (Sarrazin *et al.*, 2006), 25 μL d'extrait ou de solution de calibration sont analysés (identification et quantification) par chromatographie liquide haute performance (Waters 2475 Alliance, Milford, MA, USA), couplée à un détecteur de fluorescence (Waters 2475) et d'ultraviolets après étalonnage préalable.

3.2. PCBs et pesticides

L'analyse quantitative permet la détermination de plus de 40 congénères dont les sept congénères privilégiés par le Bureau Communautaire de Référence (Organisation Scientifique de la Communauté Européenne) : CB28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153 et CB180. Ces congénères donnent une représentation de l'empreinte des PCBs

dans la nature. Ils ont été choisis selon différents critères tels que leur toxicité, leur degré de chloration et leur persistance dans l'environnement (Wafo, 1996). L'analyse procède par étapes successives. Le protocole utilisé est celui décrit par Wafo et al. (2006). Brièvement, 2 g de sédiment sont extraits au Soxhlet avec 140 mL d'hexane pendant 16 h. Après désulfuration avec du tétrabutyl ammonium hydrogène sulfate - sulfite de sodium (Jensen et al., 1977), on procède à la purification de la solution avec de l'acide sulfurique concentré (Murphy, 1972). Le volume de l'extrait est réduit à 1 mL et fractionné sur colonne silice-alumine (Wells et al., 1985), pour séparer les PCBs et les différents pesticides. Aux différentes fractions, on ajoute du mirex et OCN comme étalons internes et l'on analyse les différentes fractions par chromatographie en phase gazeuse (CPG) avec un détecteur à capture d'électron (ECD), après étalonnage préalable. Les résultats sont confirmés par CPG couplée à la Spectrométrie de masse (MSD). Les résultats sont exprimés ($\mu\text{g.Kg}^{-1}$ matière sèche, MS) par congénère et sous forme des PCBs totaux (PCB_{tot}) selon la formule :

$$\text{PCB}_{\text{tot}} = (\text{CB118} + \text{CB138} + \text{CB153} + \text{CB180}) \times 100 / 41$$

Pour les pesticides, un organophosphate (Diazinon) et 12 organochlorés (Lindane, Heptachlor, Endosulfan I et II, Aldrine, Heptachlor-époxyde A et B, pp'-DDE, pp'-DDD, pp'-DDT, Endrine et Dieldrine) ont été recherchés.

3.3 ETMs

Les sédiments sont minéralisés selon la norme française NF 13346. Les métaux sont quantifiés par les méthodes : NF EN ISO 11969 pour l'arsenic (As), NF ISO 16772 pour le mercure (Hg) et par la méthode ISO 11047 pour le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn). Les minéralisats sont conservés à l'abri de la lumière avant analyse par spectrométrie à absorption atomique (Atomic absorption spectrometer 220FS spectrAA).

4. Localisation par immuno-histo-chimie et quantification par ELISA des HSP₇₀

Pour la mise au point de la quantification des HSP₇₀ par immuno-dosage (technique ELISA), des collectes d'invertébrés vivants ont été réalisées les 26/01 et 22/03/2012. Afin de pouvoir quantifier les HSP₇₀ chez les invertébrés, il a été nécessaire de localiser ces protéines dans les tissus. Pour cela, nous avons réalisé une induction expérimentale des HSP₇₀ en provoquant un choc thermique sur les invertébrés

récoltés vivants en janvier et mars 2012. Les espèces ont été triées et séparées. Les lots d'organismes ramenés vivants et conservés à 10°C ont ensuite été placés dans de l'eau prélevée sur le site et chauffée à 30°C pendant 1 h puis remis dans l'eau à 10°C pendant une nuit (selon un protocole adapté de Cimino et al., 2002). Ils ont ensuite été fixés au TP-PFA et conservés à 4°C.

4.1. Localisation des HSP₇₀ en immuno-histo-chimie

La détection de la présence des HSP₇₀ a été réalisée selon le protocole publié par De Jong et al. (2006). Brièvement, après avoir fixé les invertébrés au TP-PFA puis les avoir rincés dans du tampon phosphate salin (TPS ; 0,1 M, pH 7,2) contenant 10 mM de Dithiothréitol (DTT) et 0,01% de fluorure de phénylmethanesulfonyl (PMSF), un inhibiteur de protéases, les invertébrés ont été incubés avec une solution d'anticorps (1/2000ème dans le TPS contenant 0,6% de triton X₁₀₀, 2% d'albumine sérique de bœuf et 10% de sérum de chèvre ; Sigma®, Saint Quentin-Fallavier, France) anti-HSP₇₀ de lapin (Interchim®, Montluçon, France). Après rinçage, les organismes ont été incubés avec une solution d'anticorps anti-immunoglobuline de lapin (1/200ème dans le TPS contenant 0,6% de triton X₁₀₀, 2% d'albumine sérique de bœuf et 10% de sérum de chèvre) couplés à un fluorochrome (Fluoprobes® 488 ; Interchim®). Les préparations ont ensuite été montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage (CFM-1 Plus®, Euromedex, Mundolsheim, France) en microscopie confocale (microscope confocal biphoton LM710 NLO, Zeiss®) équipé d'un laser argon (excitation laser : 495 nm, bande passante d'émission : 520 nm).

4.2. Mise au point de la quantification des HSP₇₀ par immuno-dosage (ELISA)

Les invertébrés ont été fixés au TP-PFA 1% puis ont été rincés et broyés dans du tampon phosphate salin (0,1 M, pH 7,2) contenant 10 mM de Dithiothréitol (DTT) et 0,01% de fluorure de phénylmethanesulfonyl (PMSF), un inhibiteur de protéases. Ce protocole a été adapté de Cimino et al., (2002). Après broyage et centrifugation à 15000g à 4°C, le surnageant de chaque homogénat dilué dans du tampon Carbonate/Bicarbonate (pH 9,2) est déposé dans les puits d'une microplaque et incubé une nuit à 34°C. Après saturation des sites non spécifiques en incubant avec un TPS contenant 0,6 % de triton x100 et 2% de sérum albumine bovine (TPS-T-SAB) pendant une heure à 37°C et séchage pendant 2 h à 34°C, chaque puits est incubé (60 min à 22°C) avec un anticorps primaire anti-HSP₇₀ de souris (1 : 2000

dans du PBS-T-BSA). Après rinçage, chaque puits est incubé (60 min à 22°C) avec un anticorps secondaire de lapin anti-Immoglobuline G de souris (1 : 2000) couplé à la phosphatase alcaline. Après révélation par le paranitrophényl phosphate (pNPP), l'absorbance est mesurée à 405 nm (Spectrophotomètre Epoch, Biotek®, Colmar, France). La concentration en HSP₇₀ (µg.g⁻¹ de protéines) a été calculée par transformation logarithmique selon l'équation de la droite donnée par la courbe étalon de concentrations connues en HSP₇₀ réalisée en parallèle. Elle est rapportée à la quantité totale de protéines présente dans l'échantillon. Ces protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford (1976). La comparaison entre les conditions expérimentales a été faite par le test non-paramétrique de Krukall-Wallis.

Les comparaisons entre 2 conditions ont été réalisées par le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Résultats et Discussion

1. Choix des invertébrés modèles

Le tri qualitatif des cinq premiers prélèvements, réalisés en 2009, a révélé l'absence ou la faible présence de la majorité des invertébrés aquatiques en période estivale [Tabl. I]. Les résultats de ces tris ont permis d'orienter les travaux sur les larves aquatiques de l'éphéméroptère *Cloeon dipterum* (L., 1761) (Ephemeroptera, Baetidae) [Fig. 2], présentes dans la roubine toute l'année en quantité suffisante pour réaliser la quantification des protéines de choc thermique, HSP₇₀ [Tabl. I].

Tableau I : Principaux groupes taxonomiques présents en quantité suffisante pour quantifier les HSP70 par la technique ELISA dans les différents prélèvements (≥ 150 mg d'organismes en poids frais).

Principaux groupes taxonomiques			30/05/09	06/07/09	11/11/09	07/05/10	13/12/10
Gastéropodes		Prosobranches			+		+
		Pulmonés	+		+		+
Arachnides		Acarions				+	
Crustacés	Cladocères	Daphnidiées	+	+	+		+
		Eurycercidées	+		+	+	+
	Copépodes	Calanoïdes	+				+
		Cyclopoïdes	+	+		+	+
Larves d'insectes	Trichoptères		+				
	Anisoptères		+				
	Diptères	Chrinomes	+			+	
	Ephéméroptères	<i>Cloeon dipterum</i>	+	+	+	+	+

Notez l'absence de nombreux taxons en période estivale et la présence des larves de l'insecte *C. dipterum* toute l'année (en gras).

Depuis les années 1970, de nombreuses études environnementales ont été réalisées en utilisant les larves d'éphéméroptères (De Jong *et al.*, 2006, pour revue). En effet, les larves d'éphéméroptères sont considérées comme des espèces clés des écosystèmes aquatiques et comme des indicateurs importants des milieux oligotrophes à mésotrophes. En particulier, l'éphéméroptère *C. dipterum*, l'une des espèces de larves aquatiques d'insectes les plus communes d'Europe de l'Ouest, est un consommateur primaire et joue un rôle important dans les réseaux trophiques des écosystèmes d'eau douce (Merritt *et al.*, 1984). Bien que cette larve aquatique soit utilisée en routine comme bioindicateur, par exemple dans la détermination de l'IBGN (Indice Biologique Global Normalisé) pour la surveillance de la qualité des eaux

douces, la recherche de marqueurs biochimiques pour le diagnostic écologique précoce a été largement négligée chez les éphéméroptères. Pour toutes ces raisons, la larve de *C. dipterum* a été choisie pour étudier l'induction des HSP₇₀ et mettre au point la quantification par ELISA.

2. Paramètres abiotiques

2.1 Limnologie

Dans cette étude, seuls les paramètres limnologiques correspondant aux deux prélèvements utilisés pour la mise au point de la quantification des HSP70 sont présentés en **Tableau II**.

Tableau II : Paramètres limnologiques caractérisant la roubine au moment des prélèvements d'invertébrés aquatiques qui ont servi à la mise au point du biomarqueur.

Paramètres limnologiques	26/01/12	22/03/12
T° extérieure (°C)	16	16
T° de l'eau (°C)	9,13	10,9
Oxygène dissous (mg.L ⁻¹)/saturation (%)	4,94/42,8	4,52/39
Conductivité (C ₂₅ , μS.cm-1)	1159	967
pH	7,42	7,84

Ces paramètres sont semblables entre les deux prélèvements. Ceci nous permet donc de ne pas tenir compte, ici de ces facteurs pour expliquer des variations éventuelles de la réponse biomarqueur chez les invertébrés récoltés lors de ces deux prélèvements. Il sera par contre indispensable de vérifier si l'induction des HSP₇₀ chez *C. dipterum* peut être dépendante des facteurs abiotiques en réalisant cette quantification au cours d'un suivi saisonnier pendant au moins une année.

2.2. Etat de contamination en polluants organiques et ETMs des sédiments

Pour caractériser l'état de contamination des sédiments [Tabl. III], nous avons utilisé deux seuils de toxicité reconnus, le « Consensus-based TEC » (« Threshold Effect Concentration ») en dessous duquel des effets toxiques ne sont observés que rarement, et le « Consensus-based PEC » (« Probable Effect Concentration »), au dessus duquel il est probable d'observer des effets toxiques (Mac Donald *et al.*, 2000). Ces seuils prennent en compte différents indices basés sur la survie, la croissance, la reproduction et les malformations de différents invertébrés (amphipodes, éphéméroptères, chironomes...) ainsi que la luminescence des bactéries (test Microtox®). Nos résultats montrent qu'aucun contaminant dosé dans les sédiments n'atteint ces seuils. Seule la dieldrine présente une concentration légèrement supérieure au « Consensus-based TEC » et uniquement pour le prélèvement du 22 mars 2012. En l'état actuel de nos connaissances, les contaminants dans les sédiments de la roubine, pris individuellement, ne présentent pas de taux susceptibles d'exercer des effets toxiques sur la macrofaune aquatique. Il est toutefois à noter que ces seuils ne prennent pas en compte les effets des mélanges de faibles concentrations qui, à l'heure actuelle, sont peu documentés (Perobelli *et al.*, 2010).

Tableau III : Concentrations en polluants (organiques et ETMs) caractérisant l'état de contamination de la roubine au moment des prélèvements d'invertébrés aquatiques.

	26/01/12	22/03/12	TEC	PEC
HAPs (μg. Kg⁻¹ MS)				
Phénanthrène	5,80	15,53	204	1170
Fluoranthène	2,86	44,84	423	536
Pyrène	2,48	6,39	195	1520
Benzo(a) anthracène	1,04	6,55	108	1050
Chrysène	1,46	7,15	166	1290
Benzo(a) pyrène	0,73	9,54	150	1450
HAPs tot (μg. gK-1 sec)	18,89	107,59	1616	22800
PCBs totaux (μg.Kg-1 MS)	4,22	13,56	59,8	676
Pesticides (μgKg⁻¹MS)				
Lindane	0,09	0,96	2,37	4,99
Heptachlore-Epoxyde	0,13	1,96		
Dieldrine	0,03	1,98	1,9	61,8
Endrine	0,05	0,05	2,22	207
pp'-DDE	< 0,01	< 0,01	3,16	31,3
pp'-DDD	< 0,01	< 0,01	4,88	28
pp'-DDT	< 0,01	< 0,01	4,16	62,9
Eléments Trace Métalliques (mg.Kg⁻¹ MS)				
Arsenic (As)	5,9	6	9,79	33
Cadmium (Cd)	Non détecté	Non détecté	0,99	4,98
Chrome (Cr)	11,8	8,8	43,4	111
Cuivre (Cu)	10	6	31,6	149
Zinc (Zn)	34,1	34	121	459
Nickel (Ni)	11,8	7,7	22,7	48,6
Plomb (Pb)	17,3	13,7	35,8	128

Seules sont présentées les concentrations en contaminants dont les seuils de toxicité sont connus (Mac Donald *et al.*, 2000). TEC : « Consensus-based TEC » (« Threshold Effect Concentration »), seuil en dessous duquel des effets toxiques ne sont observés que rarement ; PEC : « Consensus-based PEC » (« Probable Effect Concentration »), seuil au dessus duquel il est probable d'observer des effets toxiques. En gras, valeur supérieure au TEC.

3. Mise au point de la quantification de l'induction des HSP₇₀ chez les larves de *C. dipterum*

3.1. Etape préliminaire : détection de la présence de HSP₇₀

Les observations en microscopie confocale révèlent la présence des protéines HSP₇₀ dans les cellules chloracogènes localisées sur le corps et les trachéo-branchies des larves de *C. dipterum* issues de la roubine [Fig. 2]. Ces observations sont en accord avec celles de De Jong *et al.* (2006) et permettent de passer à la quantification de ces protéines par la technique ELISA sur les larves entières.



Figure 2 : a) Vue *in toto* d'une larve de *Cloeon dipterum* (stage 5). b) Détail des trachéo-branchies. c) Localisation des protéines HSP70 par immuno-histo-chimie confocale dans les trachéo-branchies d'une larve de *C. dipterum*.

3.2. Quantification de l'induction des HSP₇₀ et interprétation de la réponse biomarqueur

Il est connu que l'âge d'un organisme peut influencer la réponse biomarqueur (Lagadic *et al.*, 1997). Ainsi, pour évaluer l'effet de ce paramètre biotique, les larves de chaque prélèvement sont triées et réparties en trois groupes en fonction de leur stade de développement larvaire (< stade 5, stade 5, > stade 5). En effet, le stade 5 correspond à un changement morphologique important avec l'apparition des fourreaux alaires et l'identification spécifique devient possible dès ce stade (Macan, 1970). La figure 3 présente la concentration en protéines HSP₇₀ chez les larves de *C. dipterum* qui ont subi une élévation expérimentale de température et chez celles fixées sur le terrain immédiatement après récolte.

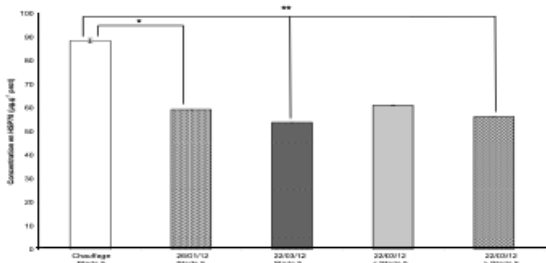


Figure 3 : Concentration en HSP70 chez les larves de *Cloeon dipterum* ayant subi un choc thermique (chauffage) et chez celles prélevées sur le terrain en janvier 2012 et en mars 2012. Les larves du prélèvement de mars 2012 sont séparées en fonction de leur stade larvaire. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$: significativement différent du groupe ayant subi un choc thermique, test de Kruskal-Wallis, $n = 10$ par groupe)

Les résultats montrent que les concentrations en HSP₇₀ chez les larves de stades 5 ayant séjourné une heure dans l'eau chauffée à 30°C sont plus importantes que chez celles provenant directement de la roubine, c'est-à-dire celles vivant en conditions naturelles. Par conséquent, le choc thermique a induit l'expression des HSP₇₀ chez les larves de stade 5. Par ailleurs, cela signifie également qu'il est possible de quantifier les HSP₇₀ chez les larves récoltées sur le terrain même si la température du milieu n'est pas élevée. Ces larves présentent donc un niveau de base quantifiable en protéines HSP₇₀ et sont capables d'induire leur synthèse en cas de stress. La sensibilité de ce biomarqueur à une élévation de température nous incite à ne pas récolter les invertébrés pendant la période estivale pour l'étude du biomarqueur au cours du suivi à long terme.

En effet, pendant la saison chaude, il pourrait être difficile de différencier une induction des HSP₇₀ liée à une élévation de température de celle résultant d'une éventuelle contamination. Pour vérifier cette hypothèse, il sera indispensable de vérifier si l'induction des HSP₇₀ chez *C. dipterum* peut être dépendante des variations de la température du milieu en réalisant cette quantification lors d'un suivi saisonnier au cours d'au moins une année. Etant donné qu'un niveau de base en HSP₇₀ a été mesuré, un suivi de ce biomarqueur sur la période de 10 ans pourra donc révéler d'éventuels stress subis par ces populations de Baetidae et pourra traduire le risque écologique pour les organismes dans le milieu naturel en cas de contamination de l'écosystème. Bien que les prélèvements de sédiments effectués en mars 2012 montrent des concentrations en dieldrine juste au dessus du 1^{er} seuil de toxicité (« consensus-based TEC ») par rapport à celles de janvier 2012, on n'observe pas de différence de concentrations en HSP₇₀ chez les larves de stade 5 à ces deux dates. Ce résultat va dans le sens d'une faible contamination du milieu.

Concernant les paramètres biotiques, nos résultats suggèrent qu'il est nécessaire de considérer l'âge des larves dans l'utilisation du biomarqueur (Figure 3). Nos résultats montrent que la concentration en HSP₇₀ n'est statistiquement pas différente chez les larves les plus jeunes (< Stade 5) par rapport à celle mesurée chez les larves ayant subi le choc thermique. Par contre, les concentrations de HSP₇₀ des larves dont le stade de développement est plus avancé (stade ≥ 5) sont significativement plus faibles que celles observées chez les larves ayant subi le choc thermique [Fig. 3]. Même s'ils restent à confirmer, ces résultats suggèrent qu'il y a eu une induction du biomarqueur chez les larves les plus jeunes vivant en conditions naturelles. Ceci traduit peut-être une plus grande sensibilité de ces larves aux paramètres environnementaux. Ces données nous incitent donc à ne pas retenir les larves les plus jeunes

(< Stade 5) dans la suite de notre étude. Cependant, cette hypothèse sera à vérifier lors d'un suivi saisonnier au cours d'au moins une année. Dans les études futures, l'induction des protéines de choc thermique HSP₇₀ chez les larves aquatiques de *C. dipterum* de stade 5 et stades supérieurs pourrait donc être utilisée comme outil de diagnostic précoce du risque écologique.

Conclusion

A l'instar de nombreux travaux attestant l'intérêt de l'utilisation des protéines de stress, HSP₇₀, comme biomarqueur du risque écologique (De Jong *et al.*, 2006 ; Gupta *et al.*, 2010), notre étude montre que les larves aquatiques de l'invertébré *Cloeon dipterum* pourraient constituer un modèle de choix pour le suivi de l'induction des HSP₇₀ comme révélateur de perturbations biologiques. Ils s'inscrivent dans le cadre d'une meilleure connaissance de la physiologie des organismes *in situ*, de la variabilité naturelle des biomarqueurs ainsi que dans la mise en place d'outils de surveillance de la qualité de l'environnement.

Références

- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **7** : 248-254.
- Cimino E.J., Owens L., Bromage E. & Anderson T.A., 2002. A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of HSP86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **132A** : 591-598.
- De Jong L., Moreau X., Jean S., Scher O. & Thiéry A., 2006. Expression of the heat shock protein Hsp70 in chloride target cells of mayfly larvae from motorway retention pond : A biomarker of osmotic shock. *Sciences of the Total Environment*, **366** : 164-173.
- De Jong L., Moreau X. & Thiéry A., 2008. Expression of heat shock proteins as biomarker tool in aquatic invertebrates : actual knowledge and ongoing developments for the early detection of environmental changes and ecological risks. *In* : " Heat-Shock Proteins : New Research ", Morel E & Vincent C (Eds), Nova Science Publishers, Chapter : XX, pp. 375-392.
- Gupta S.C., Sharma A., Mishra M., Mishra R.K. & Chowdhuria D.K., 2010. Heat shock proteins in toxicology : How close and how far ? *Life Sciences*, **86** : 377-384.
- Jensen S., Renberg L. Reutergardh L., 1977. Residues analysis of sediment and sewage sludge for organochlorines in the presence of elemental sulfur. *Analytical Chemistry*, **49** : 316-318.
- Lagadic L., Caquet T. & Amiard J.-C., 1997. Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement. *In* : Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (Eds). Masson, pp. 393-406.
- Macan T.T., 1970. A key to the nymphs of British species of Ephemeroptera with notes on their ecology. *In* : Freshwater Biological Association (Ed), Scientific publication, **20**. Ambleside : The Ferry House. 68 pp.
- MacDonald D.D., Ingersoll C.G. & Berger T.A., 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39** : 20-31.
- Merritt R.W., Cummins K.W. & Burton T.M., 1984. The role of aquatic insects in the processing and cycling of nutrients. *In* : Resh VH, Rosenberg DM (Eds), The ecology of aquatic insects. New York : Praeger ; p. 134-163.
- Morales M., Planelló R., Martínez-Paz P., Herrero O., Cortés E., Martínez-Guitarte J.L. & Morcillo G., 2011. Characterization of Hsp₇₀ gene in *Chironomus riparius* : Expression in response to endocrine disrupting pollutants as a marker of ecotoxicological stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **153C** : 150-158.
- Morimoto R.I., 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response : cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development*, **12** : 3788-3796.
- Murphy P.G., 1972. Sulfuric acid for the clean-up of animal tissues for analysis of acid-stable chlorinated hydrocarbons residues. *Associated off analytical chemistry*, **55** : 1360-1362
- Perobelli J.E., Martinez M.F., da Silva Franchi C.A., Fernandez C.D., Camargo J.L. & Kempinas Wde G., 2010. Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *Journal of Toxicology and Environmental Health- Part A- Current Issues*, **73** : 991-1002.
- Sarrazin L., Diana C., Wafo E., Pichard-Lagadec V., Schembri T. & Monod J.-L., 2006. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in marine, brackish, and river sediments by HPLC, following ultrasonic extraction. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **29** : 69-85.
- Wafo E., 1996. Déchloration catalytique des PCBs polychlorobiphényles : Optimisation et approche mécanistique de la réaction. Thèse de la faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée Aix-Marseille III. 135 pp.

- Wafo E., Sarrazin L., Diana C., Schembri T., Lagadec V. & Monod J.-L., 2006. Polychlorinated biphenyls and DDT residues distribution in sediment of Cortiou (Marseille, France). *Marine Pollution Bulletin*, 52 : 104-120.
- Wells D.E., Cowan A.A. & Christie A.E.G., 1985. Separation of organochlorine residues by adsorption chromatography prior to capillary gas chromatography. *Journal of chromatography*, 328 : 372-377.
- Wirth D., Christian E.S., Drion P.V., Dessy-Doize C. & Gustin P., 2003. Les protéines de choc thermique (heat shock protein-Hsps) II. Hsp70 : Biomarqueur et acteur du stress cellulaire. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 147 : 127-144.

