

I. Dosage de L'acétylcholinestérase (AChE)

I.1 Préparation des surnageants

Pour la préparation des surnageants nous avons préparé quatre tampons, le tampon Tris à 20 mM pour le dosage des protéines, du GSH, du GST et la CAT (**Bainy et al., 1996**) ; le tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton pour le dosage de l'AChE (**Ellman et al., 1961**) ; le tampon chlorure de potassium à 1,15 % pour le dosage de l'MDA (**Uchiyama et Mihara, 1978**) et le tampon d'homogénéisation à base de Tris et de saccharose pour le dosage de la MT (**Viarengo et al., 1997**). La composition et la préparation des tampons sont représentées dans l'**annexe 5**.

Le dosage des protéines, du GSH, du GST, de la CAT, de l'AChE et de l'MDA a été réalisé dans la fraction S9, pour cela nous avons broyé 1 g de la gonade dans 3 ml de tampon approprié. Après broyage, l'homogénat a été centrifugé à 9000 g pendant 20 min à 4 °C, les surnageants obtenus ont été aliquotés dans des tubes Eppendorf et conservés à - 25 °C jusqu'au moment de l'analyse (**Bainy et al., 1996**).

Pour la réalisation du dosage de la métallothionéine, il est nécessaire de récupérer la fraction cytosolique riche en MT, pour cela nous avons broyé 1 g de la chair des gonades dans 3 ml du tampon d'homogénéisation. Après broyage, l'homogénat a été centrifugé à 30000 g pendant 20 min à 4 °C (**Viarengo et al., 1997**). Les surnageants obtenus ont directement été utilisés pour le dosage de la MT.

III.1.4.2. Protéines

Les protéines ne sont pas un biomarqueur, leur dosage a été réalisé selon la méthode de **Bradford (1976)**, il s'agit d'une méthode de mesure très sensible basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et un colorant : le bleu brillant de Coomassie (G250). Ce réactif rouge/brun à l'état libre, prend une couleur bleue quand il est lié aux protéines. La composition et la préparation du réactif nécessaire au dosage des protéines sont représentées dans l'**annexe 6**.

La réalisation de ce dosage nécessite l'élaboration d'une gamme étalon de protéines standard sous forme d'albumine de sérum bovin (BSA), cette gamme comprend sept concentrations (0 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 et 1 mg /ml). Des dilutions préalables peuvent s'avérer nécessaires afin que les valeurs d'absorbance des échantillons soient comprises

dans l'intervalle des valeurs d'absorbance de la gamme étalon. Le dosage s'applique aux échantillons et à la gamme étalon dont les étapes sont comme suit :

- Prélever 100 µl de l'échantillon à doser ;
- Ajouter 5 ml du réactif protéique ;
- Mélanger au vortex puis laisser reposer 5 min ;
- Mesurer l'absorbance à une longueur d'onde $\lambda = 595 \text{ nm}$;
- Tracer la droite étalon : Absorbance = f (concentration en protéines) ;
- A partir des résultats obtenus sur la gamme étalon de BSA, chacun des échantillons est alors déduit en tenant compte du facteur de dilution initial.
- La quantité en protéines obtenues est exprimée mg/ml. La représentation graphique de la courbe d'étalonnage est représentée dans l'**annexe 6**.

III.1.4.6. Acétylcholinestérase

L'activité spécifique de l'acétylcholinestérase a été dosée selon la méthode décrite par **Ellman *et al.* (1961)**, c'est la méthode de dosage la plus courante, elle consiste à fournir à l'enzyme un substrat l'acétylméthionine (ASCh) dont l'hydrolyse catalysée libère de la thiocholine (SCh), la révélation de l'activité fait intervenir de l'acide 5, 5'-dithiobis - 2 - nitrobenzoïque qui se lie avec les groupements thiols de la SCh, provoquant l'apparition d'une couleur jaune dont l'intensité est fonction de l'activité spécifique de l'AChE (**Bocquené et Galgani, 2004**). La composition et la préparation des produits nécessaires au dosage sont représentées dans l'**annexe 10**. Les étapes du dosage de l'activité spécifique de l'AChE sont comme suit :

- Prélever 680 µl du tampon phosphate de sodium à 0,1 % de triton X 100 ;
- Ajouter 40 µl du réactif d'Ellman ;
- Prélever 20 µl du surnageant ;
- Ajouter 20 µl de l'acétylthiocholine ;
- La lecture se fait contre un blanc préparé dans les mêmes conditions avec du tampon phosphate de sodium à 0,1 % de triton X 100 remplaçant le surnageant, la densité optique est mesurée toutes les minutes durant 5 minutes à une longueur d'onde $\lambda = 412 \text{ nm}$;
- L'activité spécifique de l'AChE est exprimée en fonction de la concentration protéique de l'échantillon (nmol/min/mg de protéines). Elle est déterminée à l'aide de la formule suivante :

$$AS = \frac{(\Delta DO/min) \times Vt \times F}{\epsilon \times L \times Vs \times C \text{ protéines}}$$

AS : Activité spécifique (nmol d'ASCh hydrolysé /minute/mg de protéines).

$\Delta DO/min$: Différence de la densité optique obtenue après hydrolyse du substrat.

Vt : Volume total où est réalisée la mesure.

Vs : Volume du surnageant.

F : Facteur de dilution.

ϵ : Coefficient d'extinction molaire du DTNB ($\epsilon = 1,36 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$).

L : Longueur de la cuve utilisée ($L = 1 cm$).

Tampons d'homogénéisation

Tampon Tris à 20 mM (pH = 7,6)

Produits utilisés

- Hydroxyméthyl aminométhane (Tris).....20 mM
- Acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).....1 mM
- Saccharose.....0,5 M
- Chlorure de potassium (KCl).....0,15 M
- Dithiothréitol (DTT).....1 mM
- Fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF).....0,1 mM
 - o Solubiliser le PMSF dans de l'isopropanol à raison 200 mM ;
 - o Aliquoter dans des tubes Eppendorf à raison 50 µl ;
 - o Solution stable pendant 6 mois à - 20 °C.

Préparation

- Pour la préparation de 100 ml de tampon Tris, dissoudre dans 80 ml d'eau distillée 24 g de Tris ; 0,029 g d'EDTA ; 17,11 g de saccharose ; 1,11 g KCl ; 0,015 g DTT et le contenu d'un tube Eppendorf de PMSF ;
- Mélanger puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
- Tampon à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton

Produits utilisés

- Hydrogénophosphate de sodium (Na_2HPO_4).
- Dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4).
- Triton X 100.

Préparation

- Pour la préparation du tampon phosphate de sodium à 0,02 M (pH = 7).
 - o Dissoudre 2,83 g de Na_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A) ;
 - o Dissoudre 2,39 g de NaH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B) ;
 - o Ajuster le pH de la solution (A) à l'aide de la solution (B).
- Pour la préparation de tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton.
 - o Ajouter 0,1 ml de Triton X 100 à 99,9 ml tampon phosphate 0,02 M (pH = 7) ;
 - o Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C ;

Tampon chlorure de potassium à 1,15 %

Produits utilisés

- Chlorure de potassium (KCl).

Préparation

- Dissoudre 1,15 g de KCl dans 80 ml d'eau distillée ;
 - Mélanger puis compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.
 - Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.
-

Tampon d'homogénéisation de la MT

Produits utilisés

- Saccharose.....0,5 M
- β - mercaptoéthanol.....0,01 %
- Tampon Tris-HCl (pH = 8,6).....20 mM
 - Dissoudre 1,21 g du Tris dans 500 ml d'eau distillée ;
 - Mélanger puis ajuster le pH à 8,6 avec quelques gouttes d'HCl ;
 - Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.
- Leupeptine0,006 mM
 - Solubiliser la leupeptine dans de l'eau distillée à raison 8,9 mM ;
 - Aliquoter dans des tubes Eppendorf à raison 101 μ l.
 - Solution stable durant 6 mois à - 25 °C.
- Phenyl methyl sulphonyl fluoride (PMSF)0,5 mM
 - Solubiliser le PMSF dans de l'isopropanol à raison 200 mM ;
 - Aliquoter dans des tubes Eppendorf à raison 375 μ l.
 - Solution stable durant 6 mois à - 20 °C.

Préparation

- Pour la préparation de 150 ml de tampon d'homogénéisation, dissoudre dans 150 ml du tampon Tris : 25,67 g de saccharose, 15 μ l de β -mercaptoéthanol, un tube Eppendorf de leupeptine et de PMSF.
 - Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.
-

Protéines

○ Composition et préparation du réactif nécessaire au dosage

Réactif protéique

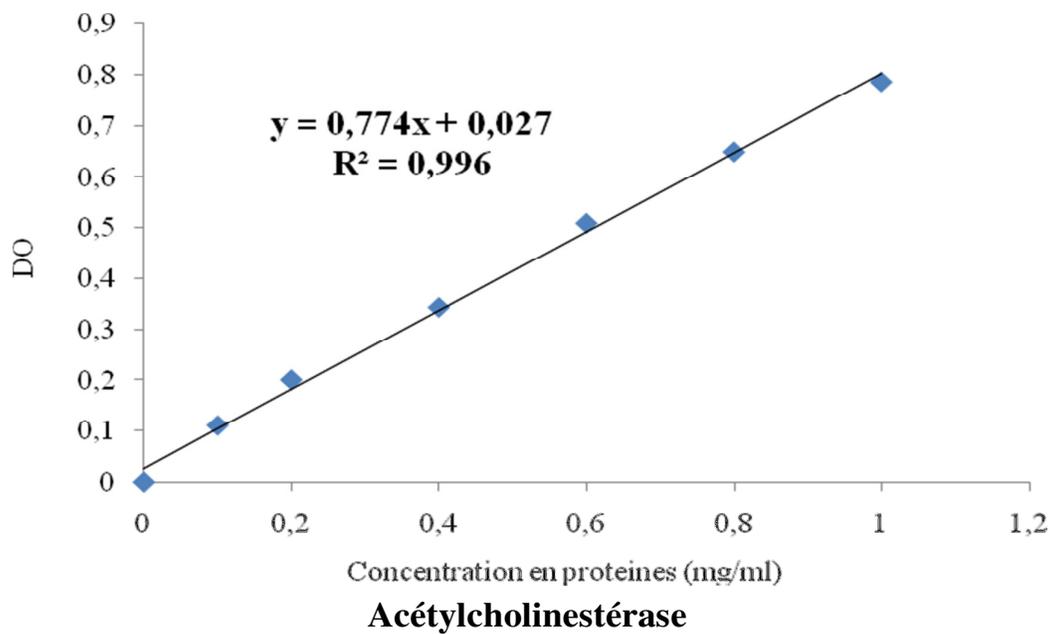
Produits utilisés

- Bleu brillant de Coomassie (G250).
- Éthanol.....95 %
- Acide phosphorique.....85 %

Préparation

- Dissoudre 100 mg du bleu brillant de Coomassie dans 50 ml d'éthanol ;
- Agiter 2 heures puis ajouter 100 ml d'acide phosphorique ;
- Mélanger puis ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 1000 ml ;
- Agiter puis filtrer sur papier filtre Whatman N°1.
- Solution stable pendant plusieurs semaines à l'obscurité et à 4 °C.

○ Représentation graphique de la courbe d'étalonnage des protéines



○ Composition et la préparation des produits nécessaires au dosage

Tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton

Produits utilisés

- Dihydrogénophosphate de potassium (KH_2PO_4).
- Hydrogénophosphate de potassium (K_2HPO_4).
- Triton X100.

Préparation

- Pour la préparation du tampon phosphate de sodium à 0,02 M (pH= 7).
 - Dissoudre 2,83 g de Na_2HPO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution A);
 - Dissoudre 2,39 g de NaH_2PO_4 dans 1000 ml d'eau distillée (Solution B) ;
 - Ajuster le pH de la solution A à l'aide de la solution B.
 - Solution stable pendant plusieurs semaines à 4 °C.
- Pour la préparation du tampon phosphate de sodium à 0,1 % de Triton.
 - Ajouter 0,1 ml de Triton X 100 à 99,9 ml tampon phosphate 0,02 M (pH = 7).
 - Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Réactif d'Ellman à 0,01 M

Produits à utiliser

- Acide 5, 5'- dithiobis - 2 - nitrobenzoïque (DTNB).
- Tampon phosphate (pH= 7).....0,02 M

Préparation

- Dissoudre 0,0396 g de DTNB dans 10 ml de tampon phosphate à 0,02 M.
- Solution instable à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

Solution d'acétylthiocoline à 0,1 M

Produits à utiliser

- Acétylthiocoline iodide.
- Eau distillée.

Préparation

- Dissoudre 0,144 g d'acétylthiocoline dans 10 ml d'eau distillée.
- Solution à préparer en quantité juste nécessaire à la série d'analyse.

