

# Guide des gestionnaires

Méthodologie d'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide de la dreissène encagée (*Dreissena polymorpha*)

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)



Wallonie



## **Avant-propos**

Le développement de ce guide méthodologique visant l'évaluation de la qualité des masses d'eau à l'aide d'un mollusque bivalve, *Dreissena polymorpha*, 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 principale de ce guide ont été réalisées par Fanny BASTIEN, ingénieur d'étude sur le projet DIADeM et supervisées par Alain GEFFARD.

Ce guide a également bénéficié de la contribution de plusieurs membres de l'UMR-I 02 SEBIO vis-à-vis de leur expertise respective sur les différentes réponses biologiques étudiées : Aurélie BIGOT-CLIVOT, Isabelle BONNARD, Marc BONNARD, Elise DAVID, Laurence DELAHAUT, Odile DEDOURGE-GEFFARD, Younes HANI, Mélissa PALOS-LADEIRO, Sophie PRUD'HOMME. Des remerciements à Iris BARJHOUX pour la production des fiches terrain.

## Table des matières

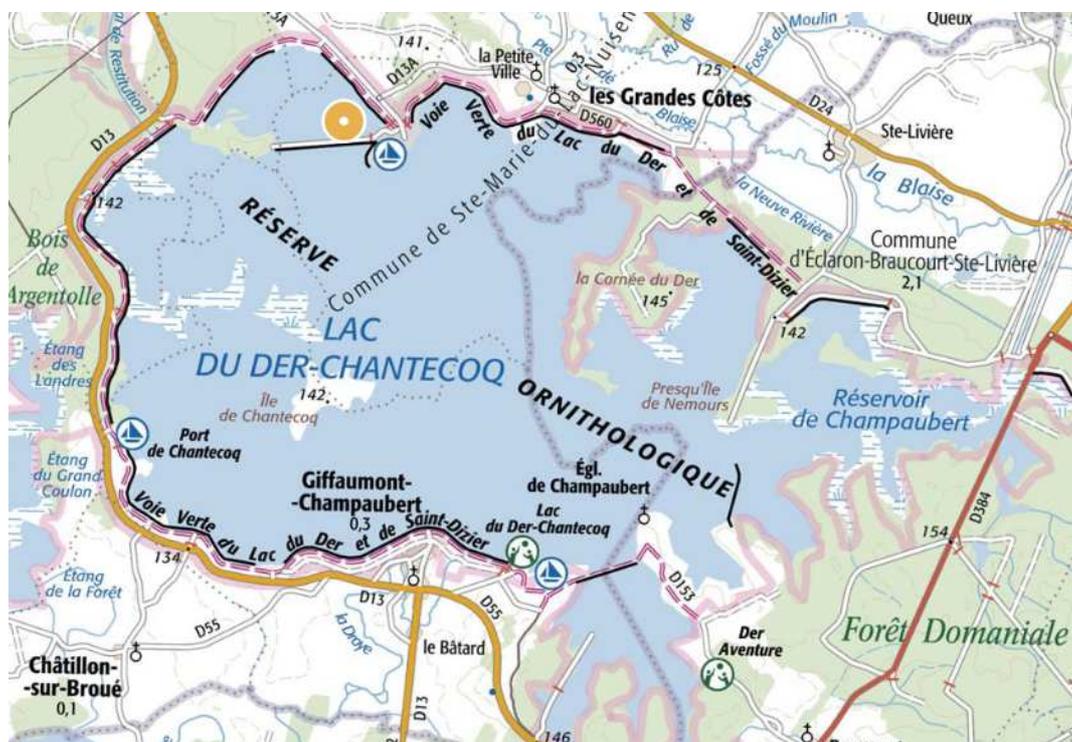
1	Origine des dreissènes et conditions de stabulation .....	5 -
1.1	Site de récupération.....	5 -
1.2	Condition de transport et de stabulation .....	5 -
1.3	Tri des organismes selon utilisation.....	5 -
2	Méthodologie d'encagement .....	6 -
2.1	Fabrication des cages.....	6 -
2.2	Déploiement terrain .....	7 -
2.2.1	Préparation des cages.....	7 -
2.2.2	Fiche terrain .....	7 -
2.2.3	Mise en place des cages sur les sites .....	9 -
2.3	Récupération des cages .....	10 -
2.4	Retour au laboratoire et analyses.....	10 -
3	Fiches protocoles pour les différentes mesures.....	12 -
3.1	Protocole du stress en situation anoxique .....	12 -
3.2	Protocole de mesure de l'indice de condition chez <i>D. polymorpha</i> .....	13 -
3.3	Protocole du prélèvement de l'hémolymphe de <i>D. polymorpha</i> dans le muscle postérieur. -	14 -
3.4	Génotoxicité sur hémocytes de dreissène par le test des comètes <i>Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE)</i> .....	15 -
3.5	Protocole de détermination de l'Indice de Maturité Sexuelle des mâles .....	17 -
3.6	Protocole de mesure de paramètres cytotoxiques et immunotoxiques sur les hémocytes de <i>Dreissena polymorpha</i> par triple-marquage.....	18 -
3.7	Protocole de mesure de paramètres cytotoxiques et immunotoxiques sur les hémocytes de <i>D. polymorpha</i> : épreuve de <i>stress on stress</i> .....	21 -
3.8	Analyses biochimiques (Activité ETS et Réserves énergétiques).....	23 -
3.8.1	Protocole de broyage des tissus de <i>D. polymorpha</i> pour les analyses de réserves et de l'activité du système de transport des électrons (ETS).....	23 -
3.8.2	Protocole de dosage de l'activité ETS (Electron Transport System) dans l'ensemble des tissus mous de <i>D. Polymorpha</i> .....	25 -
3.8.3	Protocole de dosage des protéines totales de l'ensemble des tissus mous de <i>D. polymorpha</i> .....	26 -
3.8.4	Protocole d'extraction des lipides et sucres dans l'ensemble des tissus mous de <i>D. polymorpha</i> .....	27 -
3.8.5	Protocole de dosage des lipides dans l'ensemble des tissus mous de <i>D. polymorpha</i> ..-	28 -
3.8.6	Protocole de dosage du glycogène dans l'ensemble des tissus mous de <i>D. polymorpha</i> -	30 -

3.8.7	Protocole de dosage des sucres libres dans l'ensemble des tissus mous de <i>D. polymorpha</i>	- 32 -
3.8.8	Protocole de dosage des protéines cytosoliques, des activités amylase, LDH – PAL - PAC dans la glande digestive de <i>D. polymorpha</i>	- 34 -
3.9	Extraction des métabolites polaires pour approche métabolomique par Résonance Magnétique Nucléaire chez <i>Dreissena polymorpha</i>	- 35 -
3.10	Protocole de mesure de l'expression de gènes chez <i>D. polymorpha</i>	- 37 -
3.11	Protocole d'extraction et de détection des protozoaires <i>T. gondii</i> , <i>C. parvum</i> et <i>G. duodenalis</i> dans les tissus de <i>D. polymorpha</i>	- 39 -
3.12	Protocole de mesure de la phénoloxydase dans le plasma de <i>D. polymorpha</i>	- 41 -
3.13	Protocole d'évaluation de la croissance chez des « juvéniles » de <i>D. polymorpha</i>	- 43 -
4	Annexes	- 45 -
4.1	Annexe 1 : liste du matériel pour le déploiement	- 45 -
4.2	Annexe 2 : liste du matériel pour la récupération	- 46 -

# 1 Origine des dreissènes et conditions de stabulation

## 1.1 Site de récupération

Les dreissènes sont pêchées sur le site témoin du Lac du Der au niveau du Port de Nuisement (Marne, Champagne-Ardenne : 48°36'07.8"N 4°44'37.3"E).



**Figure 1 :** Cartographie du site du lac du Der-Chantecoq avec le point de pêche de coordonnées GPS 48°36'07.8"N, 4°44'37.3"E (Point orange)

Sur site, la température de l'eau et les paramètres physico-chimiques (conductivité, oxygène dissout et pH) sont mesurés à l'aide d'une sonde multiparamétriques.

## 1.2 Condition de transport et de stabulation

Les dreissènes sont ramenées en laboratoire dans des seaux d'eau du site oxygénée. Arrivées au laboratoire, elles sont réparties pour une nuit dans des aquariums oxygénés de 50L avec un mélange 50% d'eau du site de prélèvement et 50% d'eau Cristaline Aurèle (source Jandun, France). Puis dès le lendemain, après nettoyage et tri, elles sont mises en cage, puis transférées dans un aquarium de 170L d'eau Cristaline Aurèle oxygénée. Durant toute la stabulation, elles sont à l'obscurité et la température des chambres froides est préalablement ajustée à la température mesurée sur site. Durant cette phase de stabulation, l'eau est renouvelée 1 fois par semaine et les individus sont nourris 2 fois par semaine à hauteur de 2 millions de cellules algales fraîches/individu/jour, d'un mélange 50% *Chlorella vulgaris* et 50% *Scenedesmus obliquus*.

## 1.3 Tri des organismes selon utilisation

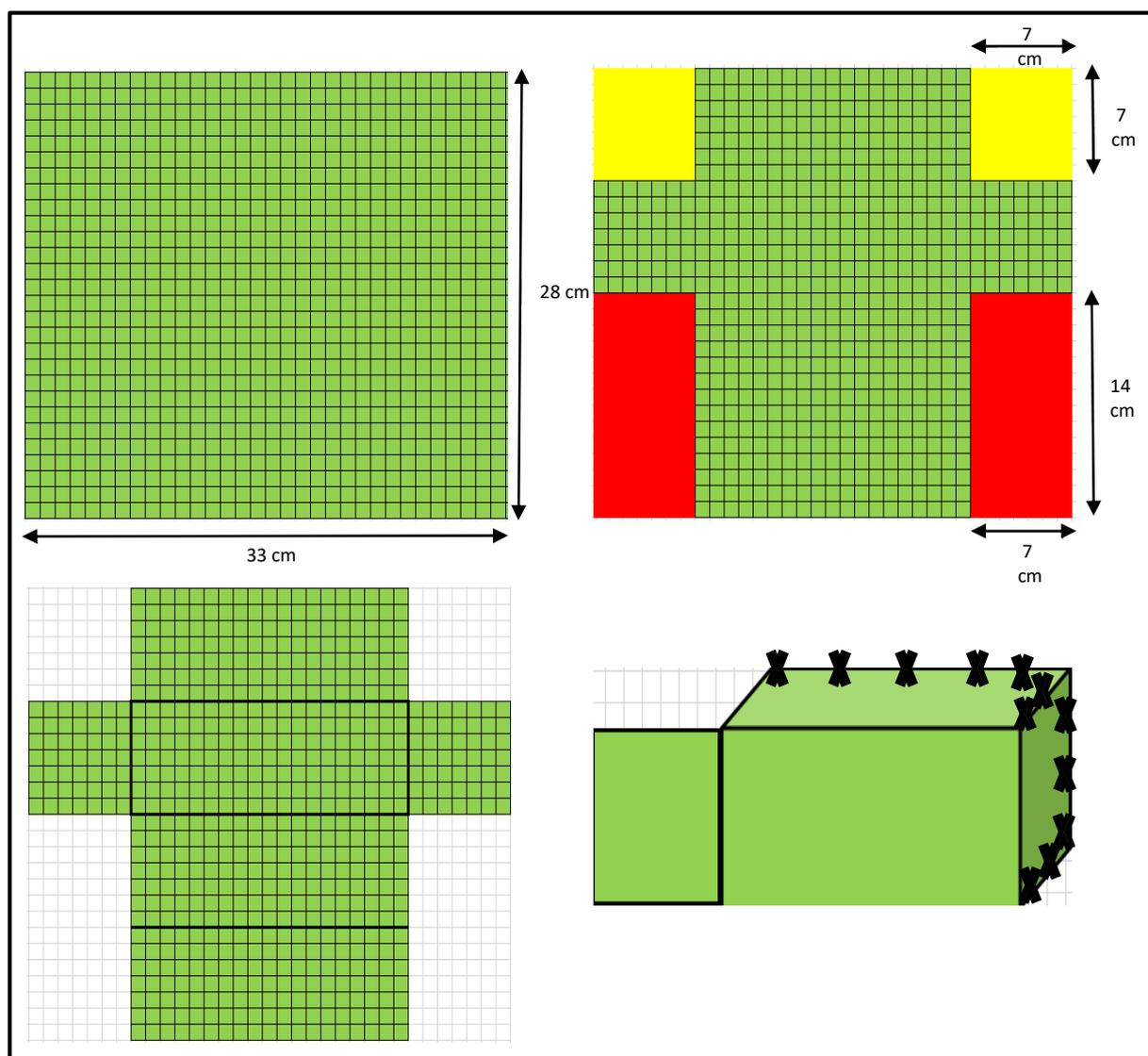
Lors du nettoyage, les dreissènes sont triées en trois classes d'individus ; des organismes ayant une longueur comprise entre 8 et 12mm pour la mesure de croissance des jeunes individus, des organismes d'une longueur comprise entre 20 et 25mm pour les réponses biologiques (la biométrie, l'Indice de Condition, le stress en situation d'anoxie, les mesures de

l'AcétylCholinEstérase, de la Gluthation-S-Transférerase et de la Phénol Oxydase, l'immunologie, la génotoxicité, l'Indice de Maturité Sexuelle, la métabolomique, les activités des enzymes digestives et le système de transfert d'électron (ETS, de la chaîne de Transport des Electrons) et des organismes d'une longueur comprise entre 25 et 30mm pour les analyses chimiques (métaux, médicaments, HAPs et composés organiques).

## 2 Méthodologie d'encagement

### 2.1 Fabrication des cages

Des cages de 7x7x19cm sont confectionnées afin de recevoir 200 individus. Les cages sont réalisées à l'aide de grillage vert en polyéthylène de maille 5x5mm. Un rectangle de grillage de 33x28cm est découpé, puis de chaque côté un carré de 7x7cm (en jaune) et un carré de 7x14cm (en rouge) sont retirés. La cage est ensuite pliée selon les traits en gras et des Serflex sont mis pour fermer la cage.



**Figure 2 :** Descriptif de la confection d'une cage de 7x7x19 cm à partir d'un rectangle de grillage en polyéthylène de 28x33 cm

En parallèle, autant de petite cage de 7x7x9cm sont réalisées pour accueillir les juvéniles dédiés à la mesure de la croissance.

## 2.2 Déploiement terrain

### 2.2.1 Préparation des cages

Dans chacune des grandes cages, 200 dreissènes sont disposées. Les cages sont fermées à l'aide de Serflex et repositionnées en aquarium pour une nouvelle phase de stabulation d'au minimum 10 jours permettant la fixation des individus entre eux.

Dans le cas de l'étude d'individus de petites tailles (8-12mm), on disposera 35 juvéniles et 80 individus de taille moyenne dans chacune des petites cages. Il est nécessaire de prendre soin de mettre les juvéniles au centre et d'entourer les cages de gaze avec un élastique pour éviter qu'elles ne sortent le temps de leur fixation durant la stabulation.

La veille de chaque journée d'implantation sur le terrain, les cages nécessaires pour le lendemain sont vérifiées en remplaçant les dreissènes mortes. Les cages sont également numérotées en doublon à l'aide d'étiquettes plastifiées (une dans la cage et une sur un serflex) afin qu'elles puissent être facilement identifiées au retour des 2 mois d'exposition sur les sites. Pour les cages contenant les individus juvéniles, le groupe d'individus est pesé et les organismes sont photographiés sur du papier millimétré plastifié afin de pouvoir les mesurer individuellement (Cf 3.13).

### 2.2.2 Fiche terrain

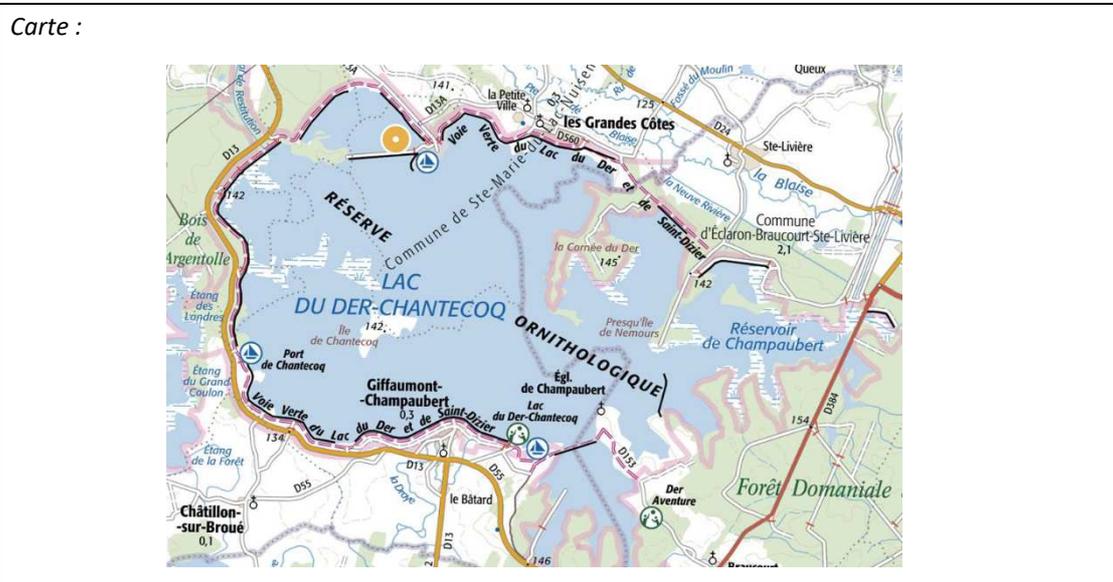
Pour chacun des sites est réalisé au préalable une fiche terrain (ci-dessous, réalisation par Iris Barjhoux) comportant toutes les informations nécessaires à l'accès au point de déploiement et au dépôt des cages. L'ensemble des informations sera complété au moment du dépôt et au moment de la récupération des cages avec la date, les personnes présentes sur site, les coordonnées GPS des points de dépôt, les numéros des cages déposées et les paramètres physico-chimique de l'eau.

Nom du site :	Bassin Nord.....
Commune (+ CP)	Sainte Marie du Lac Nuisement (51290) .....

Coordonnées GPS Standard	Sexagésimal		Décimal	
	Long.	Lat.	Long.	Lat.
Point station proposé	<b>E 04°44'37.3"</b>	<b>N 48°36'07.8"</b>	<b>04.743694</b>	<b>48.602167</b>

**Détails d'accès :**

- Prendre la direction Sainte-Marie-du-lac-Nuisement (D13a). Aller en direction du poste de secours de la plage de Nuisement.
- Au 1<sup>er</sup> rond-point, aller tout droit, puis au second rond-point prendre la 1<sup>ère</sup> à droite.
- Au niveau du petit parking sur la droite, soulever la barrière et passer. Juste après il y a un bâtiment sur la gauche pour les pêcheurs, et la mise à l'eau se fait sur la droite avant la digue.



DEPLOIEMENT			Date :	...../...../.....
Coordonnées GPS Standard	Sexagésimal		Décimal	
	Long.	Lat.	Long.	Lat.
Point déploiement 1	E .....° ..... ' ....."	N .....° ..... ' ....."	.....	.....
<i>Numéro de cage :</i>	<i>Petite :</i>	.....	<i>Grande :</i>	.....
Point déploiement 2	E .....° ..... ' ....."	N .....° ..... ' ....."	.....	.....
<i>Numéro de cage :</i>	<i>Petite :</i>	.....	<i>Grande :</i>	.....

**Personnes présentes :**

Paramètre physico-chimique			
T°	Conductimétrie / Salinité	pH	Oxygène

**Remarque / commentaire**

**Figure 3 : Fiche de suivi terrain**

### 2.2.3 Mise en place des cages sur les sites

Lors du départ, les cages de dreissènes sont mises dans des bidons remplis d'eau Cristaline oxygénée à l'aide de bulleur à pile, dans des glacières thermo-statées à une température proche de celle des sites de transplantation. Une fois sur site, s'il y a plusieurs cages, celles-ci sont attachées les unes aux autres à l'aide de Serflex (Cf Figure 4). Chaque cage ou association de cages est lesté avec un poids de plongée de 2 Kg. Pour assurer une meilleure récupération des cages, le lest est accroché de façon à ce qu'il ne se prenne pas dans des rochers, branches ou autre, et qu'un point de tension permette une cassure du fil après la cage. Il est également important de traverser la cage de part en part avec le fil de fer et de ne pas l'accrocher en prenant seulement 2 ou 3 mailles, car si le courant d'eau est trop fort, le grillage en plastique sera plus facilement arraché. Enfin il ne faut pas utiliser un fil de fer de diamètre inférieur à 1,2mm pour éviter qu'il ne se casse. Un enregistreur de température (sonde Tidbit) sera associé aux cages afin d'avoir un suivi sur l'ensemble de l'exposition. De plus au moment du déploiement, différents paramètres physico-chimiques ( $O_2$ , conductivité, pH) sont mesurés à l'aide d'une sonde multiparamétrique et inscrits sur la fiche de suivi terrain.



**Figure 4 :** Descriptif de l'association de cages (a) entre elles et de l'attache du poids de plongée (b) et c))

Pour l'implantation des cages sur le terrain, il est préférable de les accrocher à des branches d'arbres, mais en faisant attention que le fil de fer soit le plus discret possible. Les cages seront ensuite jetées dans la colonne d'eau à une profondeur dépendant de la taille de la structure aquatique. A l'exception des systèmes canalisés et profonds, il est important que les cages soient positionnées à l'écart du bord du cours d'eau, au risque que l'eau soit stagnante et donc non représentative du cours d'eau et que les cages s'ensavent rapidement.

Sur certains sites, on sera contraint d'utiliser des sardines pour accrocher les cages directement sur la berge. Cette seconde méthode est moins recommandée, car les fils de fer sont plus visibles, et l'éventuelle montée des niveaux d'eau empêchera très rapidement l'accès au pont de fixation pour la récupération des cages.

Sur chacun des sites, des cages sont positionnées sur 2 stations espacées de quelques mètres afin d'assurer la récupération de l'un des 2 systèmes en cas de vandalisme ou de mauvais positionnement (pris dans des rochers, ensablement très rapide...). Les cages déposées sur chaque point seront bien identifiées à l'aide de la fiche terrain. Des photos seront prises à chaque déploiement pour repérer les lieux et insérées dans la fiche terrain de suivi. Ceci permettra de reconnaître plus facilement les emplacements des cages après le temps d'exposition (en général de 2 mois ; changement de végétation selon les saisons), et permettra éventuellement à des personnes qui ne sont pas venues pour le dépôt d'assurer tout de même la récupération des cages. Les points GPS des emplacements seront également notés sur la fiche de suivi.

Une liste précise du matériel nécessaire au déploiement est présentée en annexe 1.

## 2.3 Récupération des cages

Pour la récupération des cages de dreissènes, se référer aux points GPS pris lors du déploiement. Les paramètres physico-chimiques de l'eau sont de nouveau mesurés (O<sub>2</sub>, conductivité, pH) et l'enregistreur de température Tidbit est récupéré. Sur chacun des sites, 3 bidons de 2L d'eau sont prélevés et serviront au laboratoire à la stabulation des organismes pendant une nuit avant traitement.

Pour la majorité des réponses (mortalité, activités enzymatiques...) les organismes sont traités après une nuit de stabulation dans l'eau de leur site. Sur le terrain, les grandes cages sont ouvertes, les organismes d'une même cage sont récupérés et positionnés dans un bidon rempli d'eau du site. Les 2 petites cages sont positionnées dans un troisième bidon, mais en les laissant fermées. De façon particulière pour les analyses de métabolomique, les échantillons doivent être congelés sur site. Après avoir vérifié visuellement, on choisit la grande cage ayant le meilleur taux de survie. L'ensemble des autres analyses seront réalisées sur cette même cage. Dès que la cage est sortie de l'eau et ouverte, 20 individus de taille comprise entre 20 et 25mm sont sélectionnés et mis, avec la coquille, dans une bonbonne d'azote à sec préalablement refroidie à l'azote liquide au laboratoire. Pour permettre le prélèvement de plusieurs sites, après minimum 30 minutes, les individus congelés sont récupérés, placés dans un sachet zip identifié et stockés dans une boîte contenant de la carboglace (Cf 3.9).

A l'aide d'une sonde terrain, la température de l'eau du site sera prise pour mettre les glacières à une température similaire pour éviter un stress thermique aux dreissènes. Le transport des organismes se fera comme pour le déploiement dans des glacières thermo-statéées, et l'eau sera oxygénée à l'aide de bulleur à pile.

Une liste précise du matériel nécessaire à la récupération est présentée en annexe 2.

## 2.4 Retour au laboratoire et analyses

De retour au laboratoire :

- Tous les organismes seront mis dans de l'eau du site oxygénée dans une chambre thermo-statéée réglée au plus près de la température du terrain. Les individus des grandes cages sont mis dans un aquarium (4,5L pour 200 individus) avec la petite cage fermée, associée au lot.
- Pour le stress anoxique, 30 individus de taille comprise entre 20 et 25mm sont disposés sur les fiches spécifiques (Cf 3.1).

Le lendemain, après la nuit de stabulation :

- Les tissus mous de 27 dreissènes sont disséqués et congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C jusqu'aux traitements et analyses biochimiques des réserves énergétiques et de l'activité de Electron Transport System (Cf 3.8.1 à 3.8.7).
- De la même façon, le prélèvement de 27 glandes digestives et la congélation dans l'azote liquide sont réalisés pour les analyses des enzymes digestives (Cf 3.8.8)
- Pour les analyses génotoxiques par le test des comètes (Cf 3.4), l'hémolymphe est prélevée sur 15 individus (Cf 3.3). Sur ces mêmes individus, seront prélevé et mis dans l'éthanol 70° les gonades pour déterminer l'Indice de Maturité Sexuelle sur les organismes mâles (Cf 3.5). Ces organes pourront être stockés à -20°C jusqu'à analyse.
- En ce qui concerne les mesures des paramètres cytotoxiques et immunotoxiques (Cf 3.6), là encore il est nécessaire de travailler sur les organismes frais en faisant des prélèvements d'hémolymphe sur 10 organismes (Cf 3.3). Les analyses du stress on stress à l'aide d'un contaminant chimique (Cadmium) (Cf 3.7) sont conduites sur un pool

d'hémolymphe de 6 dreissènes. Pour la mesure de l'expression de gènes (*Cf 3.10*), le corps mou ou certains organes cibles (glande digestive et branchies) de 10 individus sont disséqués, congelés à l'azote liquide puis conservés à -80°C

- Pour la recherche de protozoaires, les tissus mous de 20 dreissènes (10 pools de 2) sont disséqués et congelés à -80°C (*Cf 3.11*).

- Sur 27 organismes, l'hémolymphe sera prélevée pour mesurer la phénoloxydase (*Cf 3.12*).

- Pour les analyses chimiques, les tissus mous de 3 individus sont poolés (3 répliquas) pour la mesure des éléments traces métalliques et 3 pools de 2-3 g de tissus mous sont réalisés pour l'analyse des contaminants organiques et 3 pools de 2-3g sont également prévus pour l'analyse des médicaments

Lors des différents prélèvements ci-dessus, les mesures biométriques et celles nécessaires au calcul de l'indice de condition seront prises sur le maximum d'organismes (*Cf 3.2*).

Enfin, sur la petite cage associée à la grande, les 35 jeunes individus seront récupérés afin de réaliser la pesée et la photographie pour mesurer leur croissance (*Cf 3.13*).

### 3 Fiches protocoles pour les différentes mesures

#### 3.1 Protocole du stress en situation anoxique

➤ **Objectifs :**

Déterminer la résistance des dreissènes à un stress anoxique après avoir été déployées sur différents sites.

➤ **Description du protocole :**

- Préparer des fiches A4 avec 30 cases numérotées de 1 à 30 pour placer les dreissènes

Lieu:		Lac du Der			
Date arrivée:	01/12/2017	Date début stress: Heure:		Nb dreissènes posées:	
	1	2	3	4	5
	6	7	8	9	10
	11	12	13	14	15
	16	17	18	19	20
	21	22	23	24	25
	26	27	28	29	30

Mettre sur cette fiche :

- Site :
- Numéro de cage :
- Date du début de l'expérience :
- Heure de début de l'expérience :
- Nombre de dreissènes étudiées :

- Plastifier le nombre de fiches nécessaire à l'expérience (1/site)
- Au début de l'expérience, renseigner les cases de chaque fiche au marqueur
- Placer les dreissènes sur chaque fiche
- 2 fois par jour, en respectant un délai de 12h entre chaque observation, venir compter et éliminer les dreissènes mortes



Attention, la plupart des dreissènes s'ouvrent lorsqu'elles meurent, mais certaines peuvent rester fermées et sécher et donc passer pour vivantes. Pour chaque dreissène, il faut essayer d'ouvrir les valves. Si elles se referment, la dreissène est replacée sur la fiche plastifiée.

➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- Fiches plastifiées

## 3.2 Protocole de mesure de l'indice de condition chez *D.polymorpha*

### ➤ Objectifs :

Déterminer l'indice de condition permettant d'évaluer la condition de l'organisme (croissance, reproduction).

### ➤ Description du protocole :

- Mettre la dreissène entière sur du sopalin et l'essuyer
- Peser l'individu entier (coquille + tissus mous) = A
- Disséquer l'organisme et récupérer l'ensemble des tissus mous
- Les poser sur du sopalin et enlever le byssus
- Peser les tissus mous (sans byssus) = B
- Calculer l'indice de condition =  $B / A$ , c'est-à-dire :  
Indice de condition = poids frais des tissus mous / poids frais total.

### ➤ Liste du matériel :

- Dreissènes du lot attiré à l'expérimentation
- Balance de précision (Ohaus®, Adventurer™, **Réf. AR0640**)
- Sopalin
- Tubes Eppendorf® 2mL ou 1.5mL
- 1 scalpel, des ciseaux, 1 pince à dissection

### 3.3 Protocole du prélèvement de l'hémolymphe de *D. polymorpha* dans le muscle postérieur

#### ➤ **Objectifs :**

Prélever l'hémolymphe de dreissène dans le muscle postérieur de *D. polymorpha* dans le but de réaliser des analyses génotoxiques, immunologiques, et des dosages de la phénoloxydase.

#### ➤ **Description du protocole :**

En fonction de l'objectif de l'étude, le prélèvement peut être réalisé de façon individuel ou en pool. Mais attention, les cellules hématocytaires ont tendance à s'agglomérer entre elles et le travail en pool augmente ce phénomène d'agrégation.

- Solution mère à conserver 1 mois à 4°C : sous PSM, préparer du milieu L15 (L15 medium (15% v/v), H<sub>2</sub>Od (85% v/v)), HEPES (2.38g/L), Rouge de Phenol (10mg/L), puis ajuster le pH à 7,5
- Sous PSM, filtrer le milieu sur unité de filtration 0,20µm dans une bouteille en verre autoclavée
- Solution d'utilisation à préparer extemporanément : supplémenté la quantité utile à l'expérimentation de la SM par 1% d'ATB et 1% de GLU sous PSM → « L15-15% + »
- Mettre les aliquots de « L15-15% + » et les Eppendorfs de 2mL **sur glace**
- Coater la seringue avec « L15-15% + » (50µL)
- Introduire environ 50µl de « L15-15% + » dans la seringue pour **limiter le stress cellulaire** au moment du prélèvement
- A l'aide d'une seringue, prélever l'hémolymphe du muscle postérieur de la dreissène et déposer dans les Eppendorf 2mL **sur glace**
- Noter le volume d'hémolymphe prélevé



Rincer la seringue entre chaque prélèvement d'un même pool et prendre une nouvelle seringue pour chaque nouveau pool ou nouvel individu si on travaille en individuel.

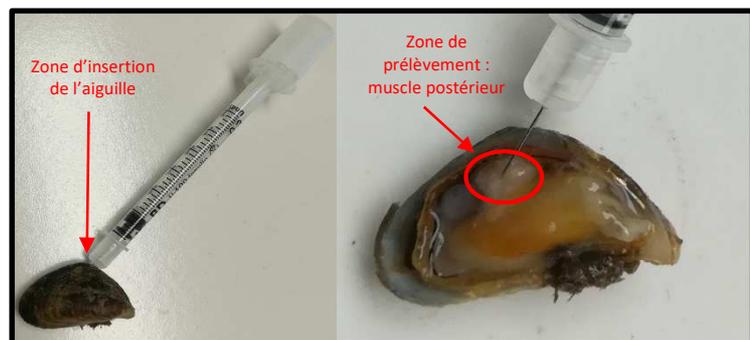


Figure 5 : Identification de la zone de prélèvement (muscle postérieur) de l'hémolymphe chez *D. polymorpha*

#### ➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- Seringues 0.3mL BD Micro-Fine™ Demi (0.30mm (30G) x 8mm)
- 1 scalpel
- Lot de Micropipettes
- Tubes Eppendorf® 2mL
- 1 bac polystyrène + glace
- Milieu L15 (Leibovitz's L-15 medium, Sigma-Aldrich, **Réf L1518**)
- HEPES (Sigma-Aldrich, **Réf. H3375**)
- Rouge de Phénol (Phénol Red, Sigma-Aldrich, **Réf. P3532**)
- Unité de filtration 0.20µm (Steritop GP Millipore)
- Glutamine (GLU) : solution commerciale prête à l'emploi de L-Glutamine (L-Glutamine (200mM), Sigma-Aldrich, **Réf. G7513**)
- Antibiotiques (ATB) : solution commerciale prête à l'emploi de Pénicilline-Streptomycine (Penicillin (10 000U/mL) - Streptomycin (10mg/mL), Sigma-Aldrich, **Réf. P4333**)

### 3.4 Génotoxicité sur hémocytes de dreissène par le test des comètes *Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE)*

#### ➤ **Objectifs :**

Evaluation par le test des comètes en condition standard alcaline de l'intégrité de l'ADN des hémocytes avec la mise en évidence des cassures simple brins (Single Strand Breaks - SSBs), double brins (Double Strand Breaks – DSBs) et des sites alcali-labiles (Alkali-labile Sites - ALS).

#### ➤ **Description du protocole :**

- **Prélèvement des hémocytes de l'hémolymphe (Cf 3.3).**

Pour le test réalisé, il est préférable de prélever individu par individu. Il est également possible de travailler avec du L15-15% non supplémenté.

Maintenance en eppendorf de 1.5mL dans la glace et à l'obscurité dans du milieu L15-15% (**pour éviter les atteintes à l'ADN**).

NB : Si exposition supplémentaire des hémocytes à un agent chimique (ex : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) – principe du *Stress on Stress* – utilisation de tampon PBS 10mM sans Ca ni Mg, pH 7.4 à la place du L15-15%.

- **Vérification de la mortalité et de la concentration cellulaire**

- a. par marquage au Bleu Trypan 0.4% w/v (dilution 2/3 suspension cellulaire + 1/3 solution de bleu trypan 0.4%) et comptage microscopique sous lame Kova®
- b. ou par marquage à l'iodure de propidium et analyse en cytométrie en flux (Cf 3.6)

Analyse en individuel. Echantillon d'hémocytes considéré comme acceptable pour un test comet si le taux de mortalité est < à 20% (NB : pas de consensus au niveau (inter)national).

- **Dépôt des cellules sur lame microscopique**

Sous lumière inactinique. Au préalable, lame « superfrost » coaté avec un agarose point de fusion Low EEO Type I (*Normal Melting Point-NMP*, 0.8% w/v dans PBS 10mM sans Ca ni Mg, pH 7.4). Mélange de la suspension hémocytaire avec un agarose Bas Point de Fusion, type VII, maintenue à 37°C (*Low Melting Point-LMP*, 1% w/v dans PBS 10mM sans Ca ni Mg, pH 7.4).

- a. Si test des comètes en condition « *bas débit* » (2 gels/lame) : dépôt sur la même lame de 2x30µL pour un individu (analyse en duplicat) d'un mélange à volume égal de la suspension hémocytaire (rétablie à 6x10<sup>5</sup> cellules/mL) et de l'agarose bas point de fusion-1%. Rajouter une lamelle couvre-objet (22x22mm) et déposer la lame microscopique sur un plateau congelé (et sur lit de glace) durant 15 minutes pour solidification des gels. Retirer délicatement la lamelle couvre-objet.
- b. Si test des comètes en condition « *moyen débit* » (10 minigels/lame). Pour 2 minigels/individu (analyse en duplicat), dépôt de 2x8µL d'un mélange de suspension cellulaire (20µL de la suspension à 10<sup>5</sup> cellules/mL) dans 80µL d'agarose bas point de fusion (*Low Melting Point-LMP*, 0.7% w/v dans PBS 10mM sans Ca ni Mg, pH 7.4). Laisser sur un plateau congelé (et sur lit de glace) les dispositifs durant 15 minutes pour solidification des minigels.

- **Lyse cellulaire.**

Conditions : 1h., 4°C, obscurité. Composition de la solution-mère (2.5M NaCl, 100mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, 10mM TrizmaBase, pH ajusté à 10) à laquelle sont rajoutés extemporanément 10% DMSO et 1% Triton X-100.

- **Dénaturation ADN.**

Conditions : 30min., 4°C, obscurité. Composition de la solution de dénaturation dans eau déminéralisée (300mM NaOH, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O, pH > 13).

- **Electrophorèse des fragments d'ADN.**

Conditions établies à 20V (0.83V.cm<sup>-1</sup>), 300 mA, 24 min., 4°C, obscurité. Tampon similaire au tampon de dénaturation de l'ADN.

- **Neutralisation de l'ADN.**

Conditions : 2 x 10min., 4°C, obscurité. Composition de la solution de neutralisation dans eau déminéralisée (TRIS 0.4M, pH ajusté à 7.5).

- **Déshydratation de l'ADN (étape facultative)**

Conditions : 5 min., température ambiante, obscurité. Ethanol absolu. Stockage des lames à l'obscurité, abri de la poussière.

- **Coloration de l'ADN**

Marquage à l'obscurité des nucléoïdes avec une solution de SYBR Green I suivant les recommandations du fournisseur (1µL de solution SYBR Green 10.000X dans DMSO + 10mL de Tampon TRIS-EDTA (TE) : 10mM TRIS, 1mM EDTA, pH 7.5). Dépôt de 30µL sur gel en condition « *bas débit* » (2 gels/lame) ; 8µL par minigel en conditions « *moyen débit* » (10 minigels/lame). Recouvrir avec une lamelle couvre-objet 24x60mm.

- **Acquisition et expression des résultats**

Analyse en lumière tamisée par microscopie à épifluorescence couplée à un logiciel d'analyse d'images. Analyse de 50 nucléoïdes par gels minimum. Paramètre : % Tail Intensity (Pourcentage d'ADN endommagé). Considérer pour un gel la valeur médiane (MED) ou l'Espace InterQuartile (EIQ) des nucléoïdes.

➤ **Liste du matériel :**

- Matériel nécessaire au prélèvement d'hémolymphe (Cf 3.3)
- Lot de Micropipettes
- Lames de microscopie, SuperFrost®, Menzel Glaser (i.e. **Réf 631-1575** - VWR)
- Lames de numération Kova® slide (i.e. **Réf 050126** – Dutscher)
- Lamelles couvre-objets 22x22mm (i.e. **Réf 631-1570**-VWR) et 24x60 mm (i.e. **Réf 631-1575** - VWR)
- Bains de coloration de type Coplin (i.e. **Réf 631-2509** - VWR)
- Standard Comet Assay Tank (i.e. Comet 20-system, **Réf CSL-COM20** - Cleaver Scientific)
- Microscope épifluorescence (i.e. Leica)
- Comet assay IV™ (live video measurement system for the comet assay, i.e. Perceptive Instruments)
- Agarose Type I, low EEO. CAS Number 9012-36-6 (i.e. **Réf A6013** – Sigma-Aldrich)
- Agarose low gelling temperature Type VII-A, synonym **2-Hydroxyethyl agarose**. CAS Number: 39346-81-1 (i.e. **Réf A6013** – Sigma-Aldrich)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO). CAS Number 67-68-5 (i.e. **Réf D8418** – Sigma-Aldrich)
- Ethanol. CAS Number 64-17-5 (i.e. **Réf 51976** – Sigma-Aldrich)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). CAS Number 60-00-4 (i.e. **Réf E9884** – Sigma-Aldrich)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, dihydrate (Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O). CAS Number 6381-92-6 (i.e. **Réf E5134** – Sigma-Aldrich)
- L-15 Medium (Leibovitz) (i.e. **Réf L5520** – Sigma-Aldrich)
- Potassium Chloride (KCl). CAS Number 7447-40-7 (i.e. **Réf P9541** – Sigma-Aldrich)
- Potassium phosphate monobasic anhydrous (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). CAS Number 7778-77-0 (i.e. **Réf P9791** – Sigma-Aldrich)
- Sodium chloride (NaCl). CAS Number 7647-14-5 (i.e. **Réf S3014** – Sigma-Aldrich)
- Sodium hydroxide (NaOH). CAS Number 1310-73-2 (i.e. **Réf 795429** – Sigma-Aldrich)
- Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). CAS Number 7558-79-4 (i.e. **Réf S3264** – Sigma-Aldrich)
- SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO. CAS Number 163795-75-3 (i.e. **Réf S9430** – Sigma-Aldrich)
- Triton™ X-100. CAS Number 9002-93-1 (i.e. **Réf T8787** – Sigma-Aldrich)
- Trizma®base, Tris(hydroxymethyl)aminomethane. CAS Number 77-86-1 (i.e. **Réf T1503** – Sigma-Aldrich)
- Trypan Blue Solution. CAS Number 72-57-1 (i.e. **Réf 93595** – Sigma-Aldrich)

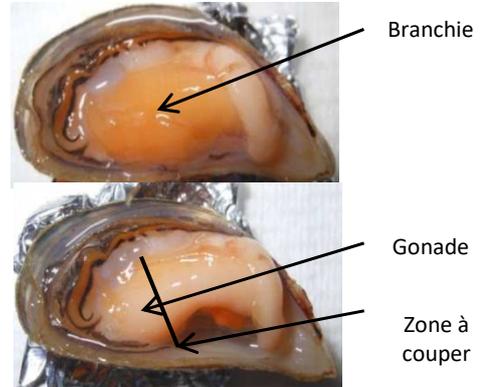
### 3.5 Protocole de détermination de l'Indice de Maturité Sexuelle des mâles<sup>1</sup>

#### ➤ **Objectifs :**

Déterminer à quel stade de développement gonadique se trouvent les dreissènes (repos sexuel, prolifération, maturation, pré-ponte ou post-ponte).

#### ➤ **Description du protocole :**

- Ouvrir la dreissène à l'aide d'un scalpel
- Retirer la branchie visible au premier plan à l'aide d'une pince
- Aux ciseaux, couper la pointe de la gonade et placer l'échantillon dans un Eppendorf 1.5mL contenant 500µL d'éthanol à 70°
- Conserver au congélateur -20°C
- Annoter 2 séries de tubes identiques à ceux contenant les échantillons, mettre 250µL d'éthanol 70° dans une des 2 séries
- Récupérer les échantillons au congélateur
- Couper la gonade en 2 et conserver une moitié dans le tube d'origine et le remettre au congélateur
- Mettre la seconde moitié dans les tubes contenant de l'éthanol
- Dilacérer le tissu avec des ciseaux et écraser les morceaux au Potter
- Faire toute la série et laisser décanter
- Prélever le maximum de surnageant et le mettre dans les Eppendorf préparés
- Remettre 500µL d'éthanol 70° dans les tubes d'échantillon (pour conserver les morceaux en cas de besoin)
- Centrifuger le surnageant pendant 1 minute à 4000rpm
- Oter le surnageant en retournant le tube au-dessus d'un bécher « poubelle »
- Utiliser le kit « DNA prep Reagent » :
  - mettre 50µL de perméabilisant dans chaque tube
  - emballer le portoir à tubes dans de l'aluminium et mettre 500µL de solution IP
- Fermer l'aluminium et attendre 15 minutes
- Placer les tubes dans le portoir du cytomètre et les lire avec un filtre de longueur d'onde 585/40nm



#### ➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attiré à l'expérimentation
- Lot de Micropipettes
- Kit « DNA prep Reagent », kit 100 tests, référence 6607055 de chez Beckman Coulter
- Trousse à dissection
- Ethanol 70°
- Tubes Eppendorf® 1.5mL + Potter
- Cytomètre en flux BD Accuri™ C6 UV (Accuri® Cytometers, Inc.)
- Centrifugeuse
- Aluminium

<sup>1</sup> Magniez G, Franco A, Geffard A, Rioult D, Bonnard I, Delahaut L, Joachim S, Daniele G, Vulliet E, Porcher JM, Bonnard M. 2018. Determination of a new index of sexual maturity (ISM) in zebra mussel using flow cytometry: interest in ecotoxicology. Environmental Science and Pollution Research, 25, 11252-11263.

### 3.6 Protocole de mesure de paramètres cytotoxiques et immunotoxiques sur les hémocytes de *Dreissena polymorpha* par triple-marquage<sup>2</sup>

#### ➤ **Objectifs :**

Evaluation des paramètres de cytotoxicité (mortalité cellulaire) et immunitaires (processus de phagocytose : capacité, efficacité et avidité) des hémocytes de *Dreissena polymorpha* à l'aide de la cytométrie en flux.

#### ➤ **Description du protocole :**

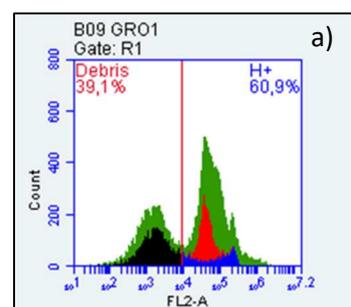
Le prélèvement d'hémolymphes est détaillé dans le protocole 3.3.

- **Comptage cellulaire**
  - Numération cellulaire sur lame de type Kova® ou Malassez®
  - Ajuster la concentration cellulaire à  $75 \cdot 10^3$  cellules/puits
- **Dépôt des cellules sur plaque**
  - Ajouter le volume de « L15-15 + » pour atteindre un volume final de 200 µl/puits
  - Ajouter 1.5µl de billes d1/2 et flusher les puits à l'aide de la pipette multicanaux
  - Incuber les échantillons à 16 °C pdt 4h
- **Décollement Trypsine**
  - 20min avant la fin de l'incubation, récupérer la plaque et transvaser les échantillons sur une nouvelle plaque de lecture
  - Ajouter 100µl de trypsine-EDTA 1X dans les puits
  - Incubation 10min à T°C ambiante
  - Flush et transférer le contenu des puits dans les échantillons précédents (Vf = 300µl)
- **Marquage Hoescht**
  - Ajouter 1% de Hoescht à 500µM (Cf = 5µM) = 3µl
  - Incubation 10min
- **Marquage IP**
  - Ajouter 1% IP = 3µl sur les 5 premiers échantillons (Lecture 5 par 5 pour permettre de remettre en suspension les cellules en limitant le temps de contact avec l'IP).
- **Lecture au cytomètre**

La lecture se fait à l'aide d'un filtre 427/10 pour la détermination des cellules, d'un filtre 533/30 90% pour les mesures de phagocytose et d'un filtre 670/LP pour la mesure de mortalité cellulaire.

#### a) Identifier les cellules

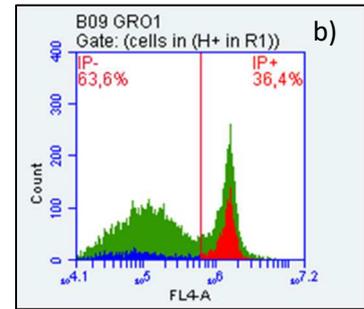
Déterminer avec le marquage Hoescht les cellules présentes dans l'échantillon => pic de fluorescence plus important dû à l'intégration du Hoescht sur les cellules. Caler une région sur ces événements « H+ » et nommer cette population cellulaire. Dans l'exemple = « H+ » vs. « Debris »



<sup>2</sup> Barjhoux I, Rioult D, Geffard A, Palos Ladeiro M. 2020. A new protocol for the simultaneous flow cytometric analysis of cytotoxicity and immunotoxicity on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. Fish and Shellfish Immunology, 98, 224-235

b) Détermination de la mortalité cellulaire

Au sein de la région « H+ » déterminée ci-dessus, identifier les cellules mortes qui présentent une fluorescence positive à l'IP. Caler un marqueur (vertical) sur cette région H+,IP+ pour définir le niveau de mortalité dans l'échantillon (ici « IP+ »). En opposition, les cellules vivantes ont intégré le Hoescht mais pas l'IP (IP-).



c) Détermination des taux de phagocytose

A. Au sein de la région « Cells in H+ », identifier les cellules ayant phagocyté des billes (Dot verts) qui présentent une fluorescence dans le vert plus importante due à l'internalisation des billes dans les cellules vivantes. Caler un marqueur de type cadrant délimitant :

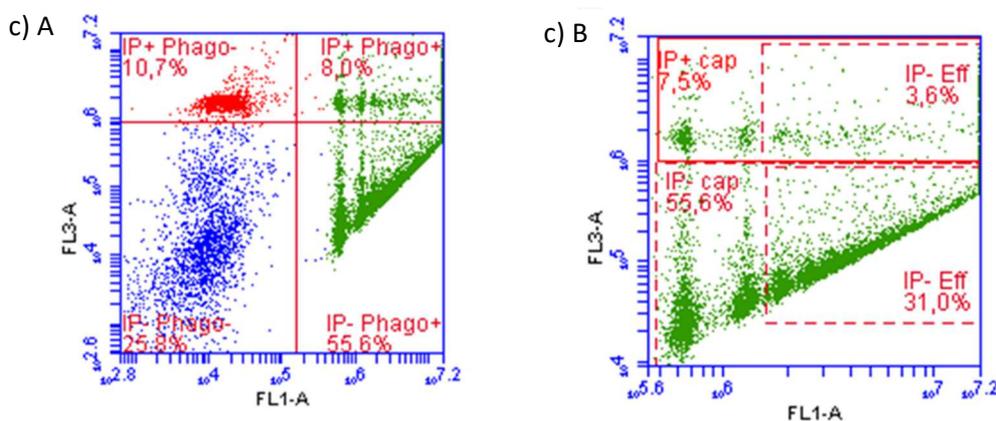
- \_ les cellules mortes n'ayant pas phagocyté (rouge)
- \_ les cellules vivantes n'ayant pas phagocyté (bleue)
- \_ les cellules mortes ayant phagocyté dans les 4h d'expo (dot verts du haut)
- \_ les cellules vivantes ayant phagocyté (dot verts du bas)

B. Au sein des cellules phagocytantes mortes ET des cellules phagocytantes vivantes, identifier celles ayant phagocyté 1 (1<sup>er</sup> pic), 2 (2<sup>e</sup> pic) ou au moins 3 billes (tous les autres pics) permettant de calculer les principaux paramètres de phagocytose :

=> *Capacité* : nombre total de cellules phagocytantes

=> *Efficacité* : nombre de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes

=> *Avidité* : nombre de billes ingérées par cellule = moyenne de fluorescence de la capacité / moyenne de fluorescence du 1<sup>er</sup> pic



➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attiré à l'expérimentation
- Matériel nécessaire au prélèvement d'hémolymphe (Cf protocole 3.3)
- Lot de Micropipettes et pipette multicanaux 200µL
- Lame de comptage cellulaire (type Malassez® ou Kova®)
- Microscope inversé Zeiss Primo Vert
- Cytomètre en flux BD Accuri™ C6 UV (Accuri® Cytometers, Inc.)
- CellStar® 96 Well Cell Culture Plate (Greiner Bio-One)
- « L15-15% + » (voir protocole 3.3 de prélèvement de l'hémolymphe)
- Billes de 2µm diluée au ½ avec H<sub>2</sub>O distillée filtrée à 0.2µm = Ratio 50 :1 (Polysciences Europe, **Réf. 09847-5**)
- Trypsine-EDTA: SM 4X à diluer au ¼ avec dH<sub>2</sub>O et laisser à T°C ambiante (Sigma-Aldrich, **Réf. T3924**)
- Hoescht : SM à 1mM à diluer au ½ avec L15-15% (Sf à 500 µM) (ThermoFisher, **Réf. 62249**)
- Iodure de propidium 1mg/ml (Sigma-Aldrich, **Réf. P4864**)

### 3.7 Protocole de mesure de paramètres cytotoxiques et immunotoxiques sur les hémocytes de *D. polymorpha* : épreuve de *stress on stress*

#### ➤ **Objectifs :**

Évaluation des paramètres de cytotoxicité (mortalité cellulaire) et d'immunotoxicité (processus de phagocytose : capacité, efficacité et avidité) des hémocytes de *Dreissena polymorpha* suite à un challenge chimique (caféine).

#### ➤ **Description du protocole :**

Le prélèvement d'hémolymphes est détaillé dans le protocole 3.3.

Pour ce test, il est impératif de travailler en pool afin d'atteindre une quantité de matière suffisante.

- **Comptage cellulaire**
  - Numération cellulaire sur lame de type Kova® ou Malassez® pour chacun des pools : minimum de  $9 \cdot 10^5$  cellules (12 dépôts)
  - Ajuster la concentration cellulaire à  $75 \cdot 10^3$  cellules/puits
- **Dépôt des cellules sur plaque et sédimentation**
  - Déposer le volume d'échantillon équivalent à  $75 \cdot 10^3$  cellules/puits sur la plaque d'exposition. Pour chacun des pools, on fera 5 dépôts Témoin, 5 dépôts exposés caféine, 1 T0 cellules et 1 T0 IP
  - Laisser sédimenter 20 minutes à 16°C pour laisser adhérer les cellules vivantes à la  $\mu$ -plaque
  - Retirer délicatement le surnageant pour éliminer les cellules mortes non adhérentes
- **Exposition à la caféine**
  - Ajouter ensuite sur la plaque d'exposition :
    - Témoin : 200 $\mu$ L de L15-15% +
    - Exposé caféine : 100 $\mu$ L de L15-15% ++ et 100 $\mu$ L de Caféine 20mM
  - Ajouter 1.5 $\mu$ L de billes d1/2 et flusher les puits à l'aide de la pipette multicanaux
  - Incuber les échantillons à 16 °C pdt 4h
- **Lecture des T0**
  - En parallèle sur la plaque de lecture, pour les T0 cellules et les T0 IP :
    - Ajouter 100 $\mu$ L de Trypsine-EDTA 1X
    - Laisser incuber 10 minutes à T°C ambiante
    - Récupérer le surnageant et le transférer sur une seconde plaque de lecture
    - Ajouter 200 $\mu$ L de L15-15% et flusher
    - Ajouter 3 $\mu$ L d'IP, flusher et passer en lecture en cytométrie
- **Décollement Trypsine**
  - 10 min avant la fin des 4h d'incubation, récupérer la plaque d'exposition et transvaser les échantillons sur la plaque de lecture
  - Ajouter 100 $\mu$ L de trypsine-EDTA 1X dans les puits de la plaque d'exposition
  - Incubation 10min à T°C ambiante
  - Flush et transférer le contenu des puits dans les échantillons précédents de la plaque de lecture (Vf = 300 $\mu$ L)
- **Marquage IP**
  - Ajouter 1% IP = 3 $\mu$ L sur les 5 premiers échantillons, flusher et passer en lecture 5 par 5 pour permettre de remettre en suspension les cellules en limitant le temps de contact avec l'IP
- **Lecture au cytomètre**

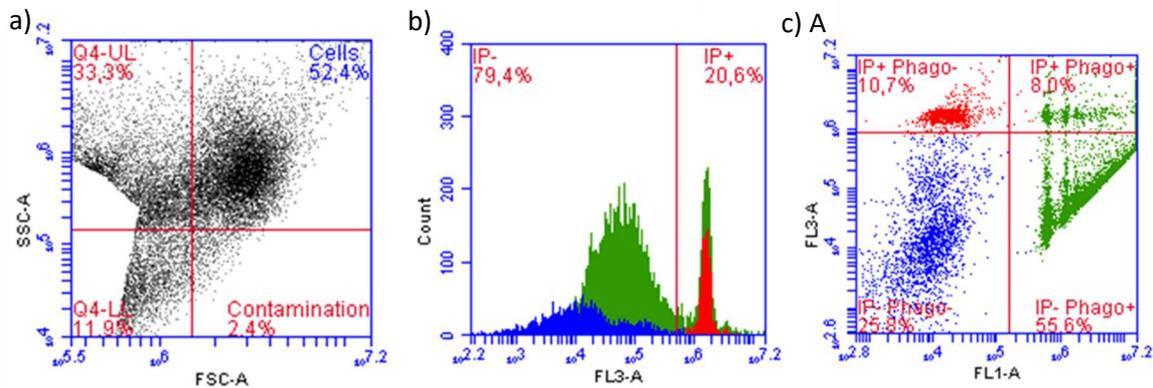
La lecture se fait à l'aide d'un filtre 533/30 pour les mesures de phagocytose et d'un filtre 670/LP pour la mesure de mortalité cellulaire.

a) Identifier les cellules

Déterminer les cellules présentes dans l'échantillon. Caler une région sur ces événements « Cells » et nommer cette population cellulaire. Dans l'exemple = « Cells » vs. « Contamination »

b) Détermination de la mortalité cellulaire

Au sein de la région « Cells » déterminée ci-dessus, identifier les cellules mortes qui présentent une fluorescence positive à l'IP. Caler un marqueur (vertical) sur cette région Cells+, IP+ pour définir le niveau de mortalité dans l'échantillon (ici « IP+ »). En opposition, les cellules vivantes n'ont pas intégrés l'IP (IP-).



c) Détermination des taux de phagocytose

A. Au sein de la région « Cells in R1», identifier les cellules ayant phagocyté des billes (Dot verts) qui présentent une fluorescence dans le vert plus importante due à l'internalisation des billes dans les cellules vivantes. Caler un marqueur de type cadrant délimitant :

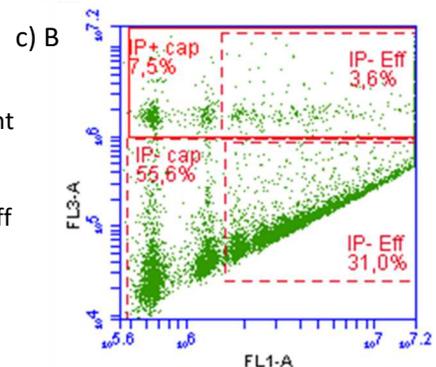
- \_ les cellules mortes n'ayant pas phagocyté (IP+ Phago- en rouge)
- \_ les cellules vivantes n'ayant pas phagocyté (IP- Phago- en bleue)
- \_ les cellules mortes ayant phagocyté dans les 4h d'expo (IP+ Phago + dot verts du haut)
- \_ les cellules vivantes ayant phagocyté (IP- Phago+ dot verts du bas)

B. Au sein des cellules phagocytantes mortes ET des cellules phagocytantes vivantes, identifier celles ayant phagocyté 1 bille et plus (à partir du 1<sup>er</sup> pic) ou au moins 3 billes (à partir du 3<sup>e</sup> pics) permettant de calculer les principaux paramètres de phagocytose :

- => *Capacité* : nombre total de cellules phagocytantes (IP+ cap ou IP- cap)
- => *Efficacité* : nombre de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes (IP+ eff ou IP- eff)
- => *Avidité* : nombre de billes ingérées par cellule = moyenne de fluorescence de la capacité / moyenne de fluorescence du 1<sup>er</sup> pic

➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- Matériel nécessaire au prélèvement d'hémolymphe (Cf protocole 3.3)
- Lot de Micropipettes et pipette multicanaux 200µL
- Lame de comptage cellulaire (type Malassez® ou Kova®)
- Microscope inversé Zeiss Primo Vert
- Cytomètre en flux BD Accuri™ C6 UV (Accuri® Cytometers, Inc.)
- CellStar® 96 Well Cell Culture Plate (Greiner Bio-One)
- « L15-15% + » (voir protocole 3.3 de prélèvement de l'hémolymphe)
- « L15-15% ++ » : double concentration de GLU et ATB car que 100 µL dans le puits pour les exposés caféine
- Billes de 2µm diluée au ½ avec H<sub>2</sub>O distillée filtrée à 0.2µm = Ratio 50 :1 (Polysciences Europe, **Réf. 09847-5**)
- Trypsine-EDTA: SM 4X à diluer au ¼ avec dH<sub>2</sub>O et laisser à T°C ambiante (Sigma-Aldrich, **Réf. T3924**)
- Iodure de propidium 1mg/ml : Sigma-Aldrich, **Réf. P4864**
- Caféine 20mM dans du L15-15% : Alfa Aesar®, Caffeine 99%, **Réf A10431**



### 3.8 Analyses biochimiques (Activité ETS et Réserves énergétiques)

#### 3.8.1 Protocole de broyage des tissus de *D. polymorpha* pour les analyses de réserves et de l'activité du système de transport des électrons (ETS)

##### ➤ **Objectifs :**

Prélever les tissus et les broyer pour doser les réserves énergétiques et l'activité ETS, sur un même individu ou sur un même pool d'individus. L'objectif est de calculer le CEA (Cellular Energy Allocation).

##### ➤ **Description du protocole :**

En fonction des expérimentations, il est préférable de prélever individu par individu ou alors de faire des pools d'individus pour s'affranchir de la variabilité individuelle.

##### • **Dissections**

Prélever l'ensemble des tissus mous, en enlevant le byssus (le couper à sa base). Mettre dans un eppendorf de 2mL puis dans l'azote liquide et stocker à -80°C.

##### • **Broyage**

Selon les gammes de poids on coupe la dreissène ou non, en 2 ou 3 morceaux :

Entière si  $P < 0.1g$  ; coupée en 2 si  $0.1g < P < 0.14g$  ; coupée en 3 si  $P > 0.14g$ .

Faire la dissection éventuelle dans un support de boîte de pétri en verre, posé sur la glace.

Peser chaque morceau et les mettre individuellement dans un eppendorf de 2mL.

Ajouter du tampon de broyage à raison de  $5\mu\text{l}/\text{mg}$ .

Ajouter 3 petites billes en inox dans les tubes Eppendorf de 2mL.

Broyer 3 minutes à 30Hz.

**Toujours remettre les eppendorfs avec les échantillons dans la glace**

**Garder de la solution de broyage pour faire les témoins des protéines ainsi que les témoins ETS**

Retirer les billes et les mettre dans un bécher avec de l'alcool 70°C. A la fin des broyages, bien agiter les billes dans l'alcool. Vider l'alcool et rincer plusieurs fois à l'eau distillée. Puis mettre le bécher à l'étuve. Une fois sèches, remettre les billes où elles ont été prises.

##### • **Récupération de l'homogénat et répartition**

Regrouper les broyats d'un individu (ou des pools de 3 individus) dans des eppendorfs de 2 ou 5mL en fonction du volume. S'il reste des morceaux, les enlever et les jeter (car problème pour pipeter).

Bien homogénéiser, vortexer avant de faire les distributions ci-dessous :

- 20 $\mu\text{L}$  de broyat pour le dosage des protéines dans un eppendorf de 1.5mL et stocker à -80°C
- 50 $\mu\text{L}$  de broyat pour le dosage glycogène / lipides dans un eppendorf de 2mL et stocker à -80°C
- 200 $\mu\text{L}$  de broyat pour surplus dans un eppendorf de 1.5mL, au cas il y ait besoin de repasser un échantillon et stocker à -80°C

Centrifuger le reste du broyat à 3000g, 10 minutes, 4°C : pour le dosage ETS

Récupérer l'ensemble du surnageant et le mettre dans un eppendorf suffisant.

Bien homogénéiser, vortexer avant de prélever ci-dessous :

- 200 $\mu\text{L}$  du surnageant et le mettre dans un eppendorf de 1.5mL pour l'ETS, et stocker à -80°C
- Garder le reste du surnageant et stocker à -80°C.

##### • **Solutions**

##### Tampon de broyage phosphate

Peut se conserver au réfrigérateur à 4°C

❖ Solution mère de phosphate à 0.2M (pour 200mL) :

100mL H<sub>2</sub>Od + 16.6mL A- (4) + 83.4mL AH (3)

Avec : - solution 4 : 1.7418g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0.017532g NaCl (qsp 25mL avec H<sub>2</sub>Od)

- solution 3 : 5.4436g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 0.070128g NaCl (qsp 100mL avec H<sub>2</sub>Od)

❖ Solution fille phosphate à 50mM, pH8 avec Triton X-100 (pour 100mL):  
Peser 0.2g Triton X-100 et ajouter 25 mL de solution mère.  
Mettre en agitation douce et attendre que ce soit dissout.  
Ajouter : 0.15 g PVP + 3.771144 mg MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O et qsp avec H<sub>2</sub>O.  
Ajuster le pH = 8

➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- 1 scalpel, des ciseaux, 1 pince à dissection
- Lot de Micropipettes
- Azote liquide + bombonne
- Tubes Eppendorf® 2 mL, 1.5 mL, 5 mL
- 1 bac polystyrène + glace
- 1 support de boîte de pétri en verre
- Balance de précision (Ohaus®, Adventurer™, **Réf. AR0640**)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : VWR®Prolabo® GPR RECTAPUR, di-Potassium hydrogen phosphate, **Réf. 26930.293**
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : VWR® Prolabo® RECTAPUR, Potassium dihydrogen phosphate, **Réf. 26925.2935**
- NaCl : Sigma-Aldrich®, Sodium chloride, **Réf. S9888-500G**
- PVP : Sigma®, Polyvinylpyrrolidone, **Réf. PVP-40**
- MgSO<sub>4</sub>,7H<sub>2</sub>O : VWR®PROLABO® NORMAPUR, Magnésium sulphate, **Réf. 25165.292**
- Triton X-100 : Sigma-Aldrich®, Triton®X-100, **Réf. X100-1L**
- Billes en inox (VWR, Billes de broyage pour MM 200 et MM 400, Acier inoxydable, 3mm, **Réf 412-2918**)
- Broyeur à billes Retsch® 400MM.
- Centrifugeuse
- 1 vortex

### 3.8.2 Protocole de dosage de l'activité ETS (Electron Transport System) dans l'ensemble des tissus mous de *D. Polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Le dosage de l'activité ETS Réflète la consommation d'énergie et pourra être utilisée, avec les réserves énergétiques, à calculer le CEA (Cellular Energy Allocation).

#### ➤ **Description du protocole :**

##### ● **Validation de 3 blancs :**

Dans 3 eppendorfs de 1.5mL : 200µL de tampon de broyage + 600µL de BSS + 200µL NAD(P)H + 400µL INT.  
Vortexer et transférer dans des microcuvettes spectrophotométriques.

Suivre la cinétique (cycle 0.2 min) de l'absorbance à 490nm (coloration rougeâtre) pendant 5min à 20°C au CARY 50.  
Si les pentes (autour de 0.03) et  $r^2$  sont corrects, on lance les échantillons (par série de 6).

##### ● **Passage des échantillons :**

Sortir 6 surnageants (200µL) obtenus après broyage et centrifugation (Cf 3.8.1).

Les laisser décongeler puis les mettre dans la glace.

Ajouter 600µL de BSS, puis ajouter 200µL NAD(P)H.

Vortexer puis transférer les 6 échantillons dans des microcuvettes spectrophotométriques.

Mettre les cuvettes dans le passeur du spectrophotomètre CARY.

Ajouter 400µL INT (2mM), homogénéiser rapidement par des allers-retours à la pipette.

Suivre la cinétique (cycle 0.2 min) de l'absorbance à 490nm (coloration rougeâtre) pendant 5min à 20°C.

##### ● **Solutions :**

BSS (conservation en aliquot à -20°C, long à décongeler) : Tris-HCl (0.1M, **pH 8.5**), Triton X-100 (0.2 %), qsp H<sub>2</sub>O, puis ajuster le **pH à 8.5**

NAD(P)H (le jour J, 0-4°C) : NADH (1.7 mmol/L) et NADPH (0.25mmol/L), qsp BSS

INT (2mM) (conservation en aliquot à -20°C) : qsp H<sub>2</sub>O

#### ➤ **Liste du matériel :**

- 1 bac polystyrène + glace
- Tampon de broyage (Cf 3.5.1)
- Lot de Micropipettes
- Tris-HCl : Sigma®, Trizma®hydrochloride, **Réf. T6666-250G**
- Triton X-100 : Sigma-Aldrich®, Triton®X-100, **Réf. X100-1L**
- NADH : Sigma®, β-Nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt hydrate, **Réf. N8129-1G**
- NAD(P)H : Sigma®, β-Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate, **Réf. N1630-50MG**
- INT : Sigma-Aldrich®, Iodonitrotetrazolium chloride, **Réf. I8377-1G**
- Spectrophotomètre VARIAN CARY 50
- Microcuvettes Ratiolab® (Dutscher, **Réf. 2712120**)
- 1 vortex

### 3.8.3 Protocole de dosage des protéines totales de l'ensemble des tissus mous de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Doser les protéines totales qui reflètent une partie des réserves énergétiques, et ainsi avoir une vision de l'état de santé global de l'organisme.

#### ➤ **Description du protocole :**

La méthode utilise le réactif de Bradford. Mettre des gants pour les dosages. Verser le volume nécessaire de Bradford dans un Falcon, l'entourer d'aluminium et laisser à T°C ambiante.

##### ● **Gamme étalon :**

Préparer 3 gammes étalon, chaque jour de dosage.

Prendre les tubes de BSA (mg/mL) 0.125 ; 0.250 ; 0.500 ; 0.750 et 1 et les mettre dans la glace.

Prélever 20µL de chacun des tubes et mettre dans un eppendorf de 1.5mL mis dans la glace préalablement.

Ajouter 1mL de réactif de Bradford et homogénéiser.

Mettre les tubes sur un portoir hors glace, à l'obscurité et attendre 20min.

Après 20min, homogénéisation rapide et mettre dans des microcuves spectrophotométriques.

Lecture de la DO à 595nm sur le CARY 50 (coloration bleue).

Faire la moyenne des 3 gammes, tracer le graphique, vérifier  $r^2$  + équation de la droite.

Si les gammes étalon sont OK on passe les échantillons.

##### ● **Passage des échantillons :**

Sortir les échantillons de -80°C, (20µL d'homogénat mis de côté lors du broyage) par série de 18 et les mettre sur un portoir hors glace.

Dès qu'ils sont décongelés, les mettre dans de la glace.

Remarque : avant de lancer les séries de 18, tester une première dilution (1/4 ou 1/15) sur quelques échantillons.

Exemple pour dilution au 1/15 :

- Ajouter 280µL d'eau distillée au 20µL d'échantillon
- Faire des allers-retours avec la pipette pour homogénéiser
- Prendre 20µL de cette dilution et mettre dans un eppendorf 1.5mL, préalablement mis dans la glace
- Ajouter 1mL de réactif de Bradford et homogénéiser
- Mettre les tubes sur un portoir hors glace, à l'obscurité et attendre 20min
- Après 20min, homogénéisation rapide et mettre dans des microcuves spectrophotométriques
- Lecture de la DO à 595nm sur le CARY 50

Selon les résultats, ajuster la dilution (1/15, 1/20, 1/30 parfois)

Penser à faire des Témoins : faire trois blancs avec la solution de tampon de broyage (Cf 3.8.1), diluée comme pour les échantillons.

**Les contenus des cuves et des eppendorfs sont jetés dans des poubelles adaptées !!**

#### ➤ **Liste du matériel :**

- Réactif de Bradford : Bio Rad, Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, **Réf 5000205**
- Gamme BSA : Bio Rad, Quick Start™ Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set, **Réf. 500-0207**
- Tubes Eppendorf® 1.5mL
- Lot de Micropipettes
- 1 bac polystyrène + glace
- Spectrophotomètre VARIAN CARY 50
- Microcuves Ratiolab® (Dutscher, **Réf. 2712120**)
- 1 vortex

### 3.8.4 Protocole d'extraction des lipides et sucres dans l'ensemble des tissus mous de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Extraire les composés lipides, glycogène-glucose qui reflètent une partie des réserves énergétiques, pour ensuite les doser et ainsi avoir une vision de l'état de santé global de l'organisme.

#### ➤ **Description du protocole :**

Sortir les 50µL d'homogénat du -80°C, mis de côté lors du broyage (Cf 3.8.1), par séries de 20

Mettre les eppendorfs sur un portoir sous la hotte, en attendant quelques minutes qu'ils décongèlent

- Ajouter 25µL de sulfate de sodium pour précipiter les sucres
- Ajouter 675µL de chloroforme/méthanol pour extraire les lipides
- Vortexer puis mettre les échantillons dans la glace
- Incuber 1h

Après une heure d'incubation, un culot s'est formé. **Ne pas vortexer !**

- Centrifuger à 3000g, 4°C, 10 minutes

Sous hotte :

- Récupérer tout le **surageant**, le mettre dans un eppendorf 1.5mL, l'homogénéiser et le mettre à -80°C → il servira au dosage des lipides
- **Culot** : mettre les eppendorfs ouverts, sur le bain à sec à 95° sous hotte, pendant 4 minutes. Puis mettre les échantillons dans la glace et les stocker à -80°C → ils serviront au dosage du glycogène

Sulfate de sodium 2% (m:v) stocker à 4°C, se conserve bien plusieurs mois : qsp H<sub>2</sub>O.

Chloroforme/méthanol (1:2, v:v) à préparer le jour même.

#### ➤ **Liste du matériel :**

- 1 bac polystyrène + glace
- Hotte
- Lot de Micropipettes
- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : Sigma-Aldrich®, Sodium sulfate, **Réf. S9627-500G**
- Chloroforme : VWR®Prolabo® RECTAPUR, Chloroform, **Réf. 22706.292**
- Méthanol : Sigma-Aldrich®, Methanol Anhydrous 99,8%, **Réf. 322415-1L**
- Centrifugeuse
- Tubes Eppendorf® 1,5 mL
- Bain à sec avec portoirs métalliques eppendorf et thermomètre
- 1 vortex

### 3.8.5 Protocole de dosage des lipides dans l'ensemble des tissus mous de *D. polymorpha*

#### ➤ Objectifs :

Doser les lipides qui Réflètent une partie des réserves énergétiques, et ainsi avoir une vision de l'état de santé global de l'organisme.

#### ➤ Description du protocole :

##### • **Gamme étalon :**

Avant de lancer les dosages d'échantillons, faire 3 gammes étalons avec une solution d'huile d'olive (1g/L avec chloroforme). Refaire chaque jour de dosage.

Dans des tubes pyrex réservés aux dosages des réserves, faire les 15 tubes, avec des gants, sous hotte :

µl SM 1g/L	50	37.5	25	12.5	0
µl chloroforme	0	12.5	25	37.5	50
	Vortexer puis mettre au bain à sec sous hotte, à 95°C, 10min <b>sans bouchon</b>				
	Sortir les tubes, les mettre sur un portoir à côté, et ajouter 100µL d'acide sulfurique 95%				
	Mettre les bouchons des tubes, vortexer rapidement puis replacer à 95°C, 10min				
	Sortir les tubes et les mettre sur un portoir qui est dans un bain d'eau glacée pendant 5min				
	Sortir le portoir du bain glacé, ajouter sous hotte, 2400µL de vanilline, vortexer				
Recouvrir le portoir d'une boîte (obscurité) sous hotte, et attendre 10 minutes à T°C ambiante. <b>Vortexer très bien</b> avant la lecture → Coloration rose, stable 30min. Faire la lecture de suite à 525nm au CARY, dans des microcuvettes spectrophotométriques					

Vérifier  $r^2$  et pente avec DO en fonction des µg de lipide (à calculer selon la pesée d'huile d'olive).

Si les gammes sont OK, on peut lancer les mesures sur les échantillons.

##### • **Passage des échantillons (séries de 10-15) :**

Sortir le surnageant du -80°C (liquide) mis de côté lors de l'extraction, le vortexer et le mettre dans la glace.

Sous hotte, avec des gants, mettre 50µL du surnageant dans un tube en pyrex sur un portoir.

Placer les tubes dans un bain à sec à 95°C sous hotte, 10 minutes, sans bouchons.

Sortir les tubes, les mettre sur le portoir à côté, et ajouter 100µL d'acide sulfurique 95%.

Mettre les bouchons des tubes, vortexer rapidement puis replacer à 95°C, 10 minutes.

Sortir les tubes et les mettre sur un portoir qui est dans un bain d'eau glacée pendant 5 minutes.

Sortir le portoir du bain glacé, ajouter sous hotte, 2400µL de vanilline, puis vortexer.

Recouvrir le portoir d'une boîte (obscurité) sous hotte, et attendre 10 minutes à t°C ambiante.

**Vortexer très bien** avant la lecture.

Faire la lecture de suite à 525nm au CARY, dans des microcuvettes spectrophotométriques.

**Les contenus des cuves et les cuves spectrophotométriques sont jetés dans des poubelles adaptées !!**

##### • **Solutions :**

Solution d'huile d'olive (stocker à 4°C, se conserve bien) : 1g/L dans chloroforme

Vanilline (stocker à 4°C, photosensible, conservation une semaine) :

Exemple pour 1L : sous hotte avec des gants (attention perte d'environ 8% du volume préparé)

- Mettre 200mL d'H<sub>2</sub>O dans un flacon sur un agitateur chauffant (environ 50°C)
- Ajouter 1.2g de vanilline
- Puis mettre le flacon dans une bassine avec de la glace et cette bassine sur l'agitateur
- Ajouter progressivement 800mL d'acide ortho-phosphorique 85%

##### • **Vaisselle des tubes Pyrex :**

1. Rincer les tubes à l'eau du robinet plusieurs fois
2. Dans une bassine, mettre de l'eau du robinet avec environ 5ml de RBS. Y mettre tous les tubes. Bien mousser et frotter avec goupillon.
3. Rincer plusieurs fois les tubes avec de l'eau du robinet
4. Faire ensuite 3 bains successifs d'eau distillée

5. Vider les tubes, les retourner sur leur portoir et les mettre à l'étuve à 50°C. Pour les bouchons, les mettre les uns à côté des autres dans un cristalliseur, l'ouverture vers le haut. Les placer également à l'étuve.

➤ **Liste du matériel :**

- Tubes pyrex avec bouchons
- Portoir pour tubes pyrex
- Lot de Micropipettes
- Hotte
- Bain à sec avec portoirs métalliques pour tubes, et thermomètre
- 1 bac polystyrène + glace
- 1 bain d'eau glacée
- Chloroforme : VWR®Prolabo® RECTAPUR, Chloroform, **Réf. 22706.292**
- Huile d'olive : Sigma®, Olive oil, **Réf. O1514-100ML**
- Acide sulfurique 95% : Sigma-Aldrich®, Sulfuric acid, **Réf. 258105-2.5L-PC**
- Vanilline : Sigma-Aldrich®, Vanillin, **Réf. V1104-100G**
- Acide ortho-phosphorique 85% : Sigma®, Orthophosphoric-acid ≥85%, **Réf. 79617-1L**
- 1 vortex
- Spectrophotomètre VARIAN CARY 50
- Microcuves Ratiolab® (Dutscher, **Réf. 2712120**)

### 3.8.6 Protocole de dosage du glycogène dans l'ensemble des tissus mous de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Doser le glycogène qui reflète une partie des réserves énergétiques, et ainsi avoir une vision de l'état de santé global de l'organisme.

#### ➤ **Description du protocole :**

##### ● **Gamme étalon :**

Avant de lancer les dosages d'échantillons, faire 3 gammes étalons avec une solution de glucose à 1g/L. Refaire chaque jour de dosage.

Dans des tubes pyrex réservés aux dosages des réserves, faire les 15 tubes, avec des gants, sous hotte :

Vol SM 1g/L	50	37.5	25	12.5	0
µl Eau distillée	0	12.5	25	37.5	50
µl Anthrone	2450µL				
	Boucher, vortexer puis mettre au bain à sec 17min à 95°C				
Sortir les tubes et les mettre sur un portoir qui est dans un bain d'eau glacée pendant 5min Puis sortir le portoir du bain glacé <b>Vortexer très bien</b> avant la lecture → Coloration verte, stable 30min. Faire la lecture de suite à 630nm au CARY, dans des microcuvettes spectrophotométriques					

Vérifier  $r^2$ , les témoins 0.06-0.07 (valeurs brutes), et la pente avec DO en fonction des µg de glucose (à calculer selon la pesée de glucose).

Si les gammes sont OK, on peut lancer les mesures sur les échantillons.

##### ● **Passage des échantillons (séries de 10-15) :**

Sortir du -80°C les eppendorfs contenant les culots et les mettre sur un portoir, hors glace.

Ajouter 400µL d'eau distillée au culot, bien vortexer pour décoller le culot.

Mettre les tubes dans la glace, attendre environ 15min.

Ajouter 3 billes de broyage, et passer au broyeur à bille 4min à 30Hz.

Vérifier que le culot est dissout.

Remettre les échantillons dans la glace.

Vortexer avant de prélever 50µL du mélange et mettre dans un tube en pyrex, sous hotte avec des gants.

Ajouter 2.45mL de réactif anthrone.

Boucher puis vortexer.

Mettre au bain à sec à 95°C pendant 17 minutes.

Sortir les tubes et les mettre sur un portoir qui est dans un bain d'eau glacée pendant 5 minutes.

Sortir le portoir du bain glacé.

**Vortexer très bien** avant la lecture.

Faire la lecture de suite à 630nm au CARY, dans des microcuvettes spectrophotométriques.

**Les contenus des cuvettes et les cuvettes spectrophotométriques sont jetés dans des poubelles adaptées !!**

##### ● **Solutions :**

Solution de glucose (stocker à 4°C, se conserve bien) : 1g/L dans eau distillée

Anthrone (stocker à 4°C, photosensible, conservation une semaine) :

Exemple pour 150 ml : sous hotte avec des gants (attention perte d'environ 8% du volume préparé)

- Ajouter 16.875mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> dans un flacon
- Mettre le flacon dans une bassine avec de la glace sur un agitateur (agitation doucement)
- Ajouter progressivement 40.125mL d'acide sulfurique
- Changer la glace régulièrement
- Ajouter 0.211875g d'anthrone (solution devient jaune)
- Ajouter 15mL d'H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (solution blanchit)

- Ajouter progressivement 78mL d'acide sulfurique (solution devient jaune)

- **Vaisselle des tubes Pyrex :**

1. Rincer les tubes à l'eau du robinet plusieurs fois
2. Dans une bassine, mettre de l'eau du robinet avec environ 5ml de RBS. Y mettre tous les tubes. Bien mousser et frotter avec goupillon.
3. Rincer plusieurs fois les tubes avec de l'eau du robinet
4. Faire ensuite 3 bains successifs d'eau distillée
5. Vider les tubes, les retourner sur leur portoir et les mettre à l'étuve à 50°C. Pour les bouchons, les mettre les uns à côté des autres dans un cristalliseur, l'ouverture vers le haut. Les placer également à l'étuve.

➤ **Liste du matériel :**

- Tubes pyrex avec bouchons
- Portoir pour tubes pyrex
- Lot de Micropipettes
- Hotte
- Billes en inox (VWR, Billes de broyage pour MM 200 et MM 400, Acier inoxydable, 3mm, **Réf 412-2918**)
- Broyeur à billes Retsch® 400MM.
- Bain à sec avec portoirs métalliques pour tubes, et thermomètre
- 1 bac polystyrène + glace
- 1 bain d'eau glacée
- Glucose : Sigma®, D-(+)-Glucose, **Réf. G8270-100G**
- Anthrone : Sigma-Aldrich®, Anthrone, **Réf. 319899-25G**
- Acide sulfurique : Sigma-Aldrich®, Sulfuric acid, **Réf. 258105-2.5L-PC**
- 1 vortex
- Spectrophotomètre VARIAN CARY 50
- Microcuvettes Ratiolab® (Dutscher, **Réf. 2712120**)

### 3.8.7 Protocole de dosage des sucres libres dans l'ensemble des tissus mous de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Doser les sucres libres qui reflètent une partie des réserves énergétiques, et ainsi avoir une vision de l'état de santé global de l'organisme.

#### ➤ **Description du protocole :**

##### • **Gamme étalon :**

Avant de lancer les dosages d'échantillons, faire 3 gammes étalons avec une solution de glucose à 1g/L. Refaire chaque jour de dosage.

Dans des tubes pyrex réservés aux dosages des réserves, faire les 15 tubes, avec des gants, sous hotte :

Vol SM 1g/L	50	37.5	25	12.5	0
µl Eau distillée	0	12.5	25	37.5	50
µl Anthrone	2450µL				
	Boucher, vortexer puis mettre au bain à sec 17min à 95°C				
Sortir les tubes et les mettre sur un portoir qui est dans un bain d'eau glacée pendant 5min Puis sortir le portoir du bain glacé <b>Vortexer très bien</b> avant la lecture → Coloration verte, stable 30min. Faire la lecture de suite à 630 nm au CARY, dans des microcuvettes spectrophotométriques					

Vérifier  $r^2$ , les témoins 0.06-0.07 (valeurs brutes), et la pente avec DO en fonction des µg de glucose (à calculer selon la pesée de glucose).

Si les gammes sont OK, on peut lancer les mesures sur les échantillons.

##### • **Passage des échantillons (séries de 10-15) :**

Sortir du -80°C les eppendorfs contenant les surnageants destinés aux dosages lipides et les mettre sur un portoir, hors glace.

Vortexer avant de prélever 50µL du mélange et mettre dans un tube en pyrex, sous hotte avec des gants.

Ajouter 2.45mL de réactif anthrone.

Boucher puis vortexer.

Mettre au bain à sec à 95°C pendant 17 minutes.

Sortir les tubes et les mettre sur un portoir qui est dans un bain d'eau glacée pendant 5 minutes.

Sortir le portoir du bain glacé.

**Vortexer très bien** avant la lecture.

Faire la lecture de suite à 630nm au CARY, dans des microcuvettes spectrophotométriques.

**Les contenus des cuves et les cuves spectrophotométriques sont jetés dans des poubelles adaptées !!**

##### • **Solutions :**

Cf 3.8.6

##### • **Vaisselle des tubes Pyrex :**

Cf 3.8.6

#### ➤ **Liste du matériel :**

- Tubes pyrex avec bouchons
- Portoir pour tubes pyrex
- Lot de Micropipettes
- Hotte
- Bain à sec avec portoirs métalliques pour tubes, et thermomètre
- 1 bac polystyrène + glace
- 1 bain d'eau glacée

- Glucose : Sigma®, D-(+)-Glucose, **Réf. G8270-100G**
- Anthrone : Sigma-Aldrich®, Anthrone, **Réf. 319899-25G**
- Acide sulphurique : Sigma-Aldrich®, Sulfuric acid, **Réf. 258105-2.5L-PC**
- 1 vortex
- Spectrophotomètre VARIAN CARY 50
- Microcuvettes Ratiolab® (Dutscher, **Réf. 2712120**)

### 3.8.8 Protocole de dosage des protéines cytosoliques, des activités amylase, LDH – PAL - PAC dans la glande digestive de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Mesurer diverses activités enzymatiques digestives et mettre en relation avec le métabolisme énergétique dans les glandes digestives de *D. polymorpha*.

#### ➤ **Description du protocole :**

En fonction des expérimentations, il est préférable de prélever individuellement les glandes digestives ou alors de faire des pools pour s'affranchir de la variabilité individuelle.

##### • **Dissections**

Prélever les glandes digestives, les poser sur du sopalin (égoutter eau) et les peser. Mettre dans un eppendorf de 2mL puis dans l'azote liquide et stocker à -80°C.

##### • **Broyage des glandes digestives**

Du tampon phosphate (0.01 M, pH 6.5) est ajouté aux échantillons à raison de 10µL/mg de glande digestive. Puis trois billes en inox (3mm de diamètre) sont ajoutées et un broyage de trois minutes à 30Hz est effectué à l'aide d'un broyeur à bille Retsch® 400MM. Suite à une centrifugation (15 000g, 30 minutes, 4°C), le surnageant est récupéré, aliquoté en 300µL et stocké à -80°C pour les différents dosages.

##### • **Dosage des différents paramètres à l'automate Gallery**

Les protéines cytosoliques, les activités amylase - LDH – PAL - PAC sont dosées au spectromètre automatique Gallery™ suivant les protocoles indiqués par Thermo Fisher Scientific®.

##### • **Solutions**

###### Tampon de broyage phosphate

Peut se conserver au réfrigérateur à 4°C

❖ Solution mère de phosphate à 0.2M (pour 50mL) :

25mL H<sub>2</sub>Od + 4.15mL A- (4) + 20.85 mL AH (3) → Ajuster le pH à 6.5

Avec : - solution 4 : 1.7418g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 0.017532g NaCl (qsp 25mL avec H<sub>2</sub>Od)

- solution 3 : 1.3609g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 0.017532g NaCl (qsp 25 mL avec H<sub>2</sub>Od)

❖ Solution fille phosphate à 0.01mM, pH6.5 (pour 500mL):

Prélever 25mL de solution mère, puis qsp 500mL avec H<sub>2</sub>Od.

Ajuster le pH à 6.5.

#### ➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- 1 scalpel, des ciseaux, 1 pince à dissection
- Lot de Micropipettes
- Azote liquide + bombonne
- Tubes Eppendorf® 2 mL, 1.5 mL, 5 mL (si pool)
- 1 bac polystyrène + glace
- Balance de précision (Ohaus®, Adventurer™, **Réf. AR0640**)
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : VWR® Prolabo® GPR RECTAPUR, di-Potassium hydrogen phosphate, **Réf. 26930.293**
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : VWR® Prolabo® RECTAPUR, Potassium dihydrogen phosphate, **Réf. 26925.2935**
- NaCl : Sigma-Aldrich®, Sodium chloride, **Réf. S9888-500G**
- Billes en inox (VWR, Billes de broyage pour MM 200 et MM 400, Acier inoxydable, 3mm, **Réf 412-2918**)
- Broyeur à billes Retsch® 400MM.
- Centrifugeuse
- 1 vortex
- Automate Gallery™ et les différents réactifs Thermo Fisher Scientific®

### 3.9 Extraction des métabolites polaires pour approche métabolomique par Résonance Magnétique Nucléaire chez *Dreissena polymorpha*

#### ➤ Objectifs :

Extraire les métabolites polaires de *D. polymorpha* dans le but de réaliser une étude métabolomique par RMN.

#### ➤ Description du protocole :

##### • **Echantillonnage des individus :**

Pour limiter les variations du métabolome, congeler le plus vite possible après prélèvement les **moules entières** dans de l'azote liquide ou en bombonne sèche refroidie. Si les moules sont placées directement dans l'azote liquide, les placer dans des tubes Eppendorf 5mL individuels, car les moules ont tendance à se briser en deux lorsqu'elles sont placées en contact direct avec l'azote liquide.

##### • **Préparation des échantillons :**

- Séparer le « tissu mou » de la coquille à l'aide d'un scalpel. **Les moules doivent rester congelées durant toute l'opération !** Généralement, il faut attendre que l'interface coquille-corps dégèle légèrement pour que le corps se détache facilement de la coquille. Placer le tissu mou dans un tube Eppendorf de 5mL (ou 2mL si les individus sont petits), et recongeler immédiatement en azote liquide.
- Lyophiliser les corps mous durant **24h**. Pour cela, ouvrir le bouchon des tubes et recouvrir l'ouverture avec du parafilm et le percer de quelques trous.
- Transférer les corps lyophilisés dans des tubes Eppendorf de 2ml (s'ils n'y sont pas déjà). Placer 2 billes de broyage (3mm de diamètre) dans chaque tube. Broyer les lyophilisats à l'aide d'un broyeur à billes à **30Hz** durant **4min**. Les blocs blancs de calage doivent être placés à -80°C afin de maintenir les échantillons froids. Stocker les broyats à -80°C jusqu'à extraction.

##### • **Extraction des échantillons :**

L'extraction se fait en tubes en verre, à partir de 10mg de broyat lyophilisé.

Le méthanol (MeOH) et le chloroforme (CHCl<sub>3</sub>) utilisés pour l'extraction doivent être stockés à -20°C. L'eau ultrapure doit être stockée à 4°C.

- Peser 10mg de lyophilisat dans un tube conique en verre centrifugeable (cf Réf).
- Ajouter 320µL de MeOH et 128µL d'eau ultrapure dans chaque tube. Vortexer pendant 30 secondes et laisser reposer 5 minutes sur glace.
- Ajouter 320µL de CHCl<sub>3</sub> et 160µL d'eau ultrapure. Vortexer pendant 30 secondes et laisser reposer 10 minutes sur glace.
- Centrifuger les tubes à 4°C durant 5 minutes à 2000g
- Transférer 450µL de phase polaire (phase supérieure) dans un tube à essai en verre
- Evaporer la phase polaire (52% MeOH/48% H<sub>2</sub>O) au Genevac – Programme : High & Low BP mix2 – 1h une fois la pression abaissée (20min + 60min)
- *Remarque : on peut également prélever 200µL de phase apolaire pour étudier les métabolites hydrophobe. Il faudra alors évaporer le CHCl<sub>3</sub> sous flux d'azote.*

Conserver les échantillons secs à -80°C jusqu'à analyse.

##### • **Préparation des échantillons pour le passage en RMN :**

2h maximum avant l'analyse RMN, resuspendre les échantillons (phase polaire) dans 600µL de tampon RMN.

Vortexer. Transférer les 600µL dans un tube RMN à l'aide d'une pipette Pasteur.

##### • **Tampon RMN pH7 0.1M :**

0.5236g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 1.0701g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 6.5mg NaN<sub>3</sub> + 8.6mg TSP, complété à 100mL de D<sub>2</sub>O.

Si stockage > 1 mois, conserver à -20°C. **Afin d'éviter de contaminer le tampon avec du H<sub>2</sub>O, n'ouvrir les tubes de tampon que lorsque celui-ci est à température ambiante.**

➤ **Liste du matériel :**

- Pied à coulisses
- Lyophilisateur
- Lot de Micropipettes
- Balance de précision (Ohaus®, Adventurer™, **Réf. AR0640**)
- Genevac HT Series 3, *SP Scientific*
- Tubes Eppendorf® 5mL
- Broyeur à billes : *Retsch® 400MM*
- Billes en inox (VWR, Billes de broyage pour MM 200 et MM 400, Acier inoxydable, 3mm, **Réf. 412-2918**)
- Pipettes Pasteur
- Tubes en verre pour extraction : Sigma-Aldrich PYREX® Disposable Glass Conical Centrifuge Tubes 10ml, **Réf. CLS9950210-125EA** (125 pièces/boîte)
- Bouchons correspondants : Sigma-Aldrich Corning® phenolic cap with white rubber liner - thread 15-415, **Réf. CLS9999152-288EA** (288 pièces/boîte)
- Tubes RMN 5mm : *Eurisotop*, **Réf. 502-7HT-PLUS-50T** (lots de 50 tubes)
- Methanol : VWR® Prolabo® HiPerSolv CHROMANORM super grad., **Réf. 85681.290E** (1 L)
- Eau ultrapure : *Sigma-Aldrich* CAS 7732-18-5, **Réf. 1012620500** (500ml)
- Chloroforme : VWR® Prolabo® RECTAPUR, **Réf. 22 706.292**
- D2O : *Eurisotop* deuterium oxide 99.90%+D, **Réf. D214H** (100 ml)

### 3.10 Protocole de mesure de l'expression de gènes chez *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Evaluer le niveau d'expression de différents gènes d'intérêt.

#### ➤ **Description du protocole :**

**Utiliser du matériel autoclavé. Port des gants obligatoire pendant toute la manipulation. Sauf précision, les différentes étapes doivent se dérouler sur glace.**

##### • **Dissections**

Disséquer si possible sur le terrain les organes cibles puis les stocker à -80°C jusqu'aux analyses.

##### • **Extraction des ARN totaux**

- Broyer 50 à 100mg de tissu dans 1mL de TRI Reagent, dans un tube Eppendorf 2mL au broyeur à billes (1 grosse bille inox autoclavée par tube), 2x30s à 30Hz
- Retirer la bille avec un barreau aimanté
- Laisser reposer les tubes 5min à température ambiante
- Ajouter 0.2mL de chloroforme pour 1mL de TRI Reagent (1ère étape). Secouer vigoureusement les tubes pendant 15s
- Laisser reposer 2 à 15min à température ambiante
- Centrifuger 15min à 12000g à 4°C
- Transférer la phase aqueuse supérieure contenant les ARN dans un nouveau tube. Ajouter 0.5mL d'isopropanol par mL de TRI Reagent utilisé dans la 1ère étape. Vortexer
- Laisser reposer 5 à 10min à température ambiante
- Centrifuger 8min à 12000g à 4°C
- Prélever précautionneusement et jeter le surnageant
- Ajouter au minimum 1mL d'éthanol 75% par mL de TRI Reagent utilisé. Vortexer. Centrifuger 5min à 7500g à 4°C
- Eliminer le surnageant, sécher le culot d'ARN à l'air (éviter le séchage à vide) 5min, mais souvent plus, puis le dissoudre dans un volume approprié d'eau RNase-free.

##### • **Dosage des ARN**

Doser les ARN avec le spectrophotomètre Genova Nano (Bibby Scientific) à 230, 260 et 280nm en déposant 2µL sur la cellule de lecture. La pureté des acides nucléiques est jugée satisfaisante si le ratio des absorbances à 260/280 est situé entre 1.7 et 2.

##### • **Dilution des ARN**

Dissoudre les ARN totaux dans de l'eau RNase free pour une concentration finale de 200ng/µL.

##### • **Vérification de la qualité des ARN**

Faire migrer 2µL d'ARN dilués additionnés de 5µL de tampon de charge (glycérol/bleu de bromophénol) sur gel d'agarose 1% préparé dans du TBE 0,5X. Utiliser un marqueur de taille de 1kb.

##### • **Reverse transcription**

- Utiliser le kit Verso cDNA Synthesis (Thermo Scientific) selon les recommandations du fournisseur, soit dans 20µL totaux, mélanger 2µL d'ARN dilués (400ng), 4 µL de Tampon Verso, 2µL de dNTP (5 M), 1µL d'amorces (hexamères aléatoires et oligo-dT, v/v 3 : 1), 1µL d'activateur de RT, 1µL d'enzyme reverse transcriptase Verso, ajustés à l'eau ultrapure
- Incuber 30 minutes à 42°C puis 2min à 95°C.

##### • **PCR en temps réel**

Gènes de ménage : Actine et Protéine ribosomale S3.

La réaction de PCR quantitative est réalisée sur l'appareil CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) selon le programme suivant : dénaturation 15 minutes à 95°C, 40 cycles d'amplification de 10 secondes à 95°C, puis 1 minute à 60°C, dans un volume total de 15µL ajusté avec de l'eau milliQ autoclavée :

7.5µL de Mix Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX (Thermo Scientific)

1.5 ou 3µL du couple d'amorce à la concentration optimale selon le gène étudié

3µL d'ADNc (produit de la RT) dilué au 1/10

Des témoins négatifs sont mesurés (sans ADNc et sur ARN non rétro-transcrits). L'efficacité de la PCR doit être calculée après réalisation d'une gamme de dilution, pour chaque gène étudié et par chaque utilisateur.

➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- Tubes Eppendorf® 2 mL et 1.5 mL
- Bac polystyrène + glace
- Lot de Micropipettes
- Billes en inox (VWR, Billes de broyage pour MM 200 et MM 400, Acier inoxydable, 5mm, **Réf. 412-0070**)
- Barreau aimanté
- Tri-reagent (Euromedex, **Réf. TR-118-200**)
- Chloroforme (VWR, **Réf. 22711.290**)
- Isopropanol (VWR, **Réf. 20842.298**)
- Ethanol (VWR, **Réf. 20821.296**)
- Eau RNase free (Euromedex, **Réf. UW0900**)
- Eau milliQ autoclavée
- Agarose (Euromedex, **Réf. LE-8200-B**)
- TBE 10X (Euromedex, **Réf. ET020-A**)
- Bleu de bromophénol (VWR, **Réf. 1.08122.0005**)
- Glycérol (VWR, **Réf. 24388.295**)
- Ladder 1kb (Euromedex, **Réf. 03B-1211**)
- Kit Verso cDNA Synthesis (Life Technologies, **Réf. AB1453B**)
- Kit Absolute Blue qPCR SYBR Green ROX MIX (Life Technologies, **Réf. AB4162B**)
- Amorces F et R dépendant des gènes étudiés
- Plaques qPCR (Dutscher, **Réf. 016204**) ou barrettes qPCR (Dutscher, **Réf. 016167**)
- Films qPCR (Dutscher, **Réf. 016629**) ou bouchons qPCR (Dutscher, **Réf. 016175**)
- Broyeur à billes : *Retsch*® 400MM
- Centrifugeuse réfrigérée
- Spectrophotomètre Genova Nano (Bibby Scientific)
- Cuve d'électrophorèse
- Transilluminateur
- Thermocycleur Mastercycler (Eppendorf)
- CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)

### 3.11 Protocole d'extraction et de détection des protozoaires *T. gondii*, *C. parvum* et *G. duodenalis* dans les tissus de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Casser les parois des oocystes et kystes des protozoaires afin d'extraire leur ADN et réaliser la détection des protozoaires par biologie moléculaire.

#### ➤ **Description du protocole :**

##### • **Pré-extraction :**

- Préparer une solution de Trypsine 1x à partir de la solution mère 10x (diluer avec du PBS, compter 1.5mL de Trypsine 1x par échantillon)
- Ouvrir les valves d'une dreissène au scalpel et prélever tous les tissus
- Broyer les tissus dans un potter à piston en verre dans 500µL de Trypsine 1x
- Déposer le broyat dans un Eppendorf 2mL sur glace
- Rajouter 1mL de Trypsine 1x dans le potter pour prélever les restes de broyat et déposer dans l'Eppendorf 2mL
- Laver le potter avec le stérilisant Actril cold avant de passer à l'échantillon suivant
- Incuber les échantillons broyés dans l'étuve à 37°C, pendant 1h30 sous agitation
- Centrifuger 5min à 5000g
- Enlever le surnageant et récupérer le culot avec 800µL de PBS du kit FastDNA 2mL SPIN Kit for Soil
- Congeler l'échantillon à -20°C ou passer à l'étape d'extraction d'ADN

**La paillasse, le potter et les outils de dissection sont nettoyés avec le stérilisant Actril cold**

##### • **Extraction d'ADN avec le kit FastDNA 2 mL SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals)**

- Transférer l'échantillon dans le tube contenant les billes (Lysing Matrix E tube). Ajouter 120 µL de **MT Buffer**.
- Placer les tubes dans le broyeur FastPrep-24 5G : broyer 2 fois à puissance 6.0 pendant 40 secondes (faire une pause de 40 secondes entre les 2 runs pour éviter que les tubes chauffent)
- Centrifuger 10min à 14 000g
- Transférer le surnageant dans un nouveau Eppendorf 2mL  
Ajouter 250µL de **PPS Buffer** et mélanger par retournement 10 fois (ne pas vortexer !)
- Centrifuger 5min à 14 000g
- Transférer le surnageant dans un nouveau Eppendorf 2mL et ajouter 1mL de **Binding matrix**  
Mélanger par retournement pendant 2min  
Placer le tube sur un portoir et attendre 3min pour laisser décanter la Binding matrix
- Enlever délicatement 500µL de surnageant puis re-suspendre le culot de Binding Matrix dans le reste du surnageant
- Transférer 500µL de surnageant dans une SPIN Filter (tube du kit contenant une membrane filtrante). Centrifuger 1 min à 14 000g
- Eliminer le liquide du tube collecteur et répéter l'étape précédente jusqu'à ce que toute la Binding matrix soit transférée
- Ajouter 500µL de **SEW-M** (complété en éthanol absolu comme indiqué sur l'étiquette du SEW-M) et re-suspendre délicatement la Binding matrix avec la micropipette
- Centrifuger 1min à 14 000g puis éliminer le liquide du tube collecteur
- Centrifuger 2min à 14 000g pour assécher la Binding matrix
- Placer la SPIN Filter dans le tube 2mL fourni dans le kit
- Laisser sécher la SPIN Filter à température ambiante pendant 5 min
- Re-suspendre délicatement la Binding matrix avec 100µL d'eau DNase/Pyrogen-free (**DES**) avec la micropipette. Incuber 5min à 55°C (Bain-marie ou bain-sec)
- Centrifuger 1min à 14 000g pour éluer l'ADN
- Les échantillons d'ADN sont conservés à -20°C (ou à +4°C si utilisés dans les 24h)

- **Détection des protozoaires par qPCR TaqMan**

Travailler sur plaque 96 puits déposée sur glace. Dans chaque puits :

- 5µL d'échantillon d'ADN
  - 1µL amorce F + 1µL amorce R (solutions à 10µM)
  - 0.5µL de sonde pour *T. gondii* et *G. duodenalis* ou 0.25µL pour *C. parvum* (solutions à 10µM)
  - 5µL eau Milli-Q autoclavée
  - 12.5µL de iQ Supermix
- Filmer la plaque avec le film adhésif pour qPCR et centrifuger quelques secondes dans la centrifugeuse de paillasse du laboratoire RIBP
  - Déposer la plaque dans le thermocycleur CFX BioRad (laboratoire RIBP). Penser à mettre le « tapis » sur la plaque
  - Choisir le programme « TaqMan IAE » et « All Channels » pour que tous les fluorophores soient lus
  - La programme « TaqMan IAE » correspond à :
    - 1 cycle de dénaturation : 95°C pendant 3min
    - 45 cycles d'amplification : 95°C pendant 15sec puis 60°C pendant 1min

➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- Scalpel et pince
- Potter à piston en verre
- Lot de Micropipettes
- Tubes Eppendorf® 2mL autoclavés
- 1 bac polystyrène + glace
- Trypsine 10x (from porcine pancreas) (Sigma-Aldrich, **Réf. T4674**)
- PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich, **Réf. D8537-6x500 mL**)
- Stérilisant Actril cold (VWR, **Réf. 148-0111**)
- Etuve à 37°C
- Kit FastDNA 2mL SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, **Réf. 116560200**)
- Broyeur FastPrep-24 5G (MP Biomedicals) (localisé dans le laboratoire ESCAPE, faculté de Pharma)
- Centrifugeuse
- Bain-marie ou bain sec à 55°C
- Plaque 96 puits Low Profile sans jupe naturel AB-0700 ABGENE x25 (Dutscher, **Réf. 016204**)
- Film adhésif par pression qPCR Absolute AB-1170 ABGENE x50 (Dutscher, **Réf. 016540**)
- iQ Supermix, 500 x 50µl reactions (BioRad, **Réf. 1708862**)
- Eau Milli-Q autoclavée
- Cônes autoclavés
- Centrifugeuse de paillasse et thermocycleur CFX BioRad (salle de BioMol du laboratoire RIBP)

### 3.12 Protocole de mesure de la phénoloxydase dans le plasma de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

Mesurer l'activité de la phénoloxydase (rôle dans le système de défense des invertébrés) dans le plasma de *D. polymorpha*.

#### ➤ **Description du protocole :**

##### ● **Prélèvement d'hémolymphe :**

Le prélèvement de l'hémolymphe est détaillé dans le protocole 3.3.

L'hémolymphe est ensuite centrifugée à 800g pendant 15 minutes à 4°C afin de séparer la phase cellulaire du plasma.

Le surnageant est récupéré et stocké à -80°C.

##### ● **Dosages des protéines totales par la méthode de Bradford :**

- Sortir les tubes de la gamme BSA (mg/mL) 0.125 ; 0.25 ; 0.5 ; 1 et les mettre dans la glace
- Sortir les échantillons de plasma et les mettre une fois décongelés à T°C ambiante dans la glace
- Préparer un Falcon 50mL de réactif de Bradford entouré d'aluminium (⚠ photosensible)
- L'ensemble des dépôts (gamme, témoin et échantillons) sont réalisés en triplicat suivant le plan de plaque 1.
- Sur une  $\mu$ -plaque à fond plat, déposer :
  - 5 $\mu$ L de BSA pour la gamme ou 5 $\mu$ L d'échantillon ou 5 $\mu$ L H<sub>2</sub>O pour les témoins (BSA = 0mg/mL)
  - 200 $\mu$ L de réactif de Bradford (pipette multicanaux)
  - Faire des AR à la pipette ⚠ Doucement car le réactif mousse
  - Incuber 30 min à T°C ambiante à l'obscurité (aluminium)
  - Lecture de l'Abs. à 620nm sur le lecteur de plaque **TECAN Infinite F50** avec le logiciel **Magellan**
- for F50 ⚠ Vérifier qu'il n'y ait pas de bulles dans les puits**
- Valider la plaque si le R<sup>2</sup> de la Gamme étalon est supérieur à 0,97

Plan de plaque 1:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA 1	BSA 1	BSA 1	Ech 4	Ech 4	Ech 4	Ech 12	Ech 12	Ech 12	Ech 20	Ech 20	Ech 20
B	BSA 0.5	BSA 0.5	BSA 0.5	Ech 5	Ech 5	Ech 5	Ech 13	Ech 13	Ech 13	Ech 21	Ech 21	Ech 21
C	BSA 0.25	BSA 0.25	BSA 0.25	Ech 6	Ech 6	Ech 6	Ech 14	Ech 14	Ech 14	Ech 22	Ech 22	Ech 22
D	BSA 0.125	BSA 0.125	BSA 0.125	Ech 7	Ech 7	Ech 7	Ech 15	Ech 15	Ech 15	Ech 23	Ech 23	Ech 23
E	Tém H <sub>2</sub> O	Tém H <sub>2</sub> O	Tém H <sub>2</sub> O	Ech 8	Ech 8	Ech 8	Ech 16	Ech 16	Ech 16	Ech 24	Ech 24	Ech 24
F	Ech 1	Ech 1	Ech 1	Ech 9	Ech 9	Ech 9	Ech 17	Ech 17	Ech 17	Ech 25	Ech 25	Ech 25
G	Ech 2	Ech 2	Ech 2	Ech 10	Ech 10	Ech 10	Ech 18	Ech 18	Ech 18	Ech 26	Ech 26	Ech 26
H	Ech 3	Ech 3	Ech 3	Ech 11	Ech 11	Ech 11	Ech 19	Ech 19	Ech 19	Ech 27	Ech 27	Ech 27

##### ● **Mesure de l'activité phénoloxydase sur le substrat L-Dopa :**

- Sortir les échantillons de plasma et les mettre une fois décongelés T°C ambiante dans la glace
- Préparer un tampon Tris-HCl 0.1M, pH8 pour l'ensemble des échantillons de la manip., puis le conserver à 4°C
- Préparer extemporanément une solution de L-Dopa 40mM (20mM dans le volume final) pour la plaque en cours. ⚠ L-Dopa s'auto-oxyde
- Sur chacune des plaques déposer un témoin d'auto-oxydation, deux témoins (1 et 2) et les échantillons. L'ensemble est réalisé en triplicat suivant le plan de plaque 2.
- Sur une  $\mu$ -plaque à fond plat :
  - Témoin auto-ox (Ta-o) : 50 $\mu$ L H<sub>2</sub>O + 50 $\mu$ L Tris-HCl
  - Témoin 1 (T1) : 50 $\mu$ L de plasma + 50 $\mu$ L H<sub>2</sub>O
  - Témoin 2 (T2) : 50 $\mu$ L de plasma + 50 $\mu$ L Tris-HCl
  - Echantillons : 50 $\mu$ L de plasma + 50 $\mu$ L Tris-HCl
- Faire des AR à la pipette
- Incuber 10 minutes à T°C ambiante

Tris-HCl à la pipette multicanaux sauf pour T1 !!

- Ajouter à la pipette multicanaux (sauf pour T2) :
  - Ta-o : 100µL L-DOPA
  - T1 : 100µL L-DOPA
  - T2 : 100µL **H<sub>2</sub>O**d
  - Echantillons : 100µL L-DOPA
- Lecture de l'Abs. à 492nm toutes les minutes pendant 45 minutes sur le lecteur de plaque **TECAN Infinite F50** avec le logiciel **Magellan for F50**  **Vérifier qu'il n'y ait pas de bulles dans les puits**

Plan de plaque 2:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ta-o	Ta-o	Ta-o	Ech 6	Ech 6	Ech 6	Ech 14	Ech 14	Ech 14	Ech 22	Ech 22	Ech 22
B	T1	T1	T1	Ech 7	Ech 7	Ech 7	Ech 15	Ech 15	Ech 15	Ech 23	Ech 23	Ech 23
C	T2	T2	T2	Ech 8	Ech 8	Ech 8	Ech 16	Ech 16	Ech 16	Ech 24	Ech 24	Ech 24
D	Ech 1	Ech 1	Ech 1	Ech 9	Ech 9	Ech 9	Ech 17	Ech 17	Ech 17	Ech 25	Ech 25	Ech 25
E	Ech 2	Ech 2	Ech 2	Ech 10	Ech 10	Ech 10	Ech 18	Ech 18	Ech 18	Ech 26	Ech 26	Ech 26
F	Ech 3	Ech 3	Ech 3	Ech 11	Ech 11	Ech 11	Ech 19	Ech 19	Ech 19	Ech 27	Ech 27	Ech 27
G	Ech 4	Ech 4	Ech 4	Ech 12	Ech 12	Ech 12	Ech 20	Ech 20	Ech 20	Ech 28	Ech 28	Ech 28
H	Ech 5	Ech 5	Ech 5	Ech 13	Ech 13	Ech 13	Ech 21	Ech 21	Ech 21	Ech 29	Ech 29	Ech 29

➤ **Liste du matériel :**

- Dreissènes du lot attitré à l'expérimentation
- Matériel nécessaire au prélèvement d'hémolymphe (Cf protocole 3.3)
- Réactif de Bradford : Sigma-Aldrich®, Bradford Reagent, **Réf B6916-500mL**
- Gamme BSA : Bio Rad, Quick Start™ Bovine Serum Albumin (BSA) Standard Set, **Réf. 500-0207**
- Lot de Micropipettes et pipette multicanaux 200µL
- Tubes Eppendorf® 1.5 mL
- 1 bac polystyrène + glace
- Lecteur de µ-plaque TECAN infinite® F50 avec le logiciel Magellan for F50 associé
- µ-plaques 96 puits, Costar®, **Réf 3590**
- 1 vortex
- Tris-HCl 0.1M, pH8: Sigma®, Trizma®hydrochloride, **Réf. T6666-250G**
- L-Dopa 40mM : Sigma-Aldrich®, L-Dopa(-phényl-d3), **Réf 333786-1G**

### 3.13 Protocole d'évaluation de la croissance chez des « juvéniles » de *D. polymorpha*

#### ➤ **Objectifs :**

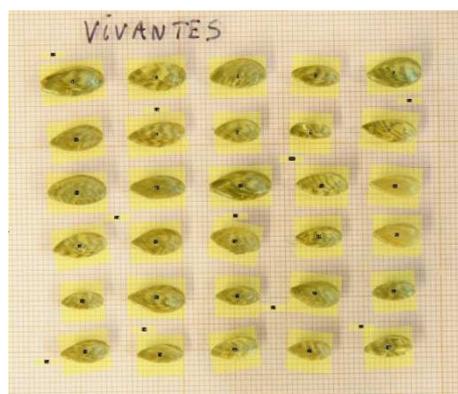
Déterminer la croissance de dreissènes « juvéniles » entre le début (T0) et la fin de la période d'engagem, en termes de prise de poids et de longueur de coquille.

#### ➤ **Description du protocole :**

La mesure de la croissance s'effectue sur des individus calibrés entre 8 et 12mm. Cette gamme de taille peut être resserrée autour des valeurs basses si l'abondance des plus petits individus le permet. Plus les organismes sont de petite taille initialement et la gamme de calibration étroite, plus il sera possible d'observer des différences de croissance (meilleure discrimination des résultats).

##### • **Pesées et prise de clichés :**

- Calibrer les dreissènes (8-12mm max.) à l'aide d'une règle graduée. Préparer des lots de 35 individus (deux lots par site). Chaque lot est rassemblé dans une compresse en forme de « ballotine » et refermée par un collier de serrage en plastique.
- Juste avant l'engagem sur le terrain (24-48 h avant), sécher au mieux les organismes sur du papier absorbant pour limiter la présence d'eau qui biaiserait la pesée. Peser chaque lot de dreissènes préalablement identifié (des pesées individuelles peuvent également être effectuées).
- Positionner l'appareil photo sur un pied (objectif vers le bas) et vérifier son horizontalité à l'aide d'un niveau à bulle. Placer le papier millimétré dans le champ de l'appareil photo et le fixer bien à plat à l'aide de pinces et/ou de scotch. Ces deux points ont pour but d'éviter de fausser les mesures (notamment de calibration) par la présence de courbures de papier et/ou d'effet de perspectives.
- Placer chaque dreissène d'un même lot sur le papier millimétré plastifié, face dorsale vers le haut. Les dreissènes doivent être bien individualisées, ne pas se toucher et être le plus aligné possible pour faciliter la prise de photos et leur analyse ultérieure. Noter l'identité du lot sur le papier millimétré de façon à ce qu'il soit visible sur la photo.
- Prendre quelques clichés de chaque lot entier (utiliser au mieux le zoom optique pour optimiser la résolution de la photo) en veillant à limiter les reflets et les ombres au maximum. Vérifier la qualité de la photo (luminosité, netteté, pas de chevauchement des individus, tout le lot visible etc.)
- En fin d'engagem, réitérer les étapes des points 2 à 4 en écartant les dreissènes mortes. Les lots pour lesquels moins de 50% de l'effectif initial ont été récupérés sont écartés de l'analyse.



**Fig. 6** Exemple d'image de prise de mesure des dreissènes après post-traitement de la photographie initiale par ImageJ. Les rectangles jaunes correspondent aux prises de mesures (calibration et organismes).

##### • **Analyse des photos pour les mesures de taille :**

L'analyse des photos pour la mesure de la longueur des dreissènes est effectuée avec le logiciel (Fiji is Just) ImageJ (ImageJ 1.52d).

- Si nécessaire, corriger la photo pour l'optimiser avant analyse (tronquer, ajustement de la luminosité, contraste etc.)
- Utiliser l'outil \*Straight\* en 150px de large pour effectuer les mesures de longueur de coquille (de la charnière à l'extrémité des valves).
- Avec le même outil en 20px, effectuer 10 mesures de calibration de 5mm à l'aide des graduations du papier millimétré. Répartir ces mesures sur tout le champ où sont présentes les dreissènes. Ces mesures servent ensuite à convertir les mesures de dreissènes de pixels à millimètres (la moyenne des 10 mesures de calibration donne l'équivalent en pixel de 5mm). Généralement, les mesures de calibration présentent moins de 1% de variation entre elles.
- Convertir les mesures des organismes de pixels à millimètres à partir du résultat de la calibration (produit en croix). Une calibration n'est valable que pour l'image sur laquelle elle a été effectuée.

➤ **Liste du matériel :**

- Papier millimétré plastifié (au moins 10x8cm)
- Règle graduée ou un pied à coulisse (calibration des organismes)
- Compresse de gaze stérile (5x5cm ou 7.5x7.5cm pliées)
- Essuie-tout absorbant
- Pince à dissection en inox rigide (pour la manipulation des organismes)
- Niveau à bulle
- Collier de serrage en plastique (2.5x100mm ou 3.5x140mm)
- Appareil photo Canon EOS 20D équipé d'un objectif Canon EFS 17-85 mm USM avec stabilisateur d'image
- Pied d'appareil photo
- Balance de précision (Ohaus®, Adventurer™, **Réf. AR0640**)
- Ordinateur équipé du logiciel (Fiji is Just) ImageJ (ImageJ 1.52d)

## 4 Annexes

### 4.1 Annexe 1 : liste du matériel pour le déploiement

#### **Matériel terrain pour le déploiement**

Fiches terrain + crayon de papier + marqueur  
GPS  
Appareil photo  
Bottes et waders  
Glacières thermo-statée avec seaux  
Bulleur à pile + tuyau + sucres ou cônes P1000  
Cages étiquetées  
Sonde de température Tidbit  
Sonde multiparamétrique VWR MU 6100 H  
Gilet de sauvetage  
Fil de fer ( $\varnothing > 1.2\text{mm}$ )  
Perche télescopique à crochet  
Piles LR20 (bulleurs) + AA (pour GPS)  
Pince coupante  
Poids de plongée  
Sardines, Serflex, gants, sopalin, sac poubelle, scalpel  
Trousse de secours  
Vêtements de rechange

## 4.2 Annexe 2 : liste du matériel pour la récupération

### **Matériel terrain pour la récupération**

Fiches terrain + crayon de papier + marqueur  
GPS  
Bottes et waders  
Glacières thermo-statées avec seaux  
Bulleur à pile + tuyau + sucres ou cônes P1000  
Gilet de sauvetage  
Sonde multiparamétrique VWR MU 6100 H  
Piles LR20 (bulleurs) + AA (pour GPS)  
Perche télescopique à crochet  
Perche à godet pour récupérer l'eau  
Pince coupante  
Bidon de 2L couvercle blanc fermé annoté « eau de site » (3/site)  
Bidon de 2L couvercle blanc percé annoté « petites cages » (1/site)  
Bidon de 1.5L couvercle rouge percé annoté « grande cage » (2/site)  
Bonbonne d'azote Réfroïdie  
Polystyrène avec carboglace + Gants spéciaux -80°C  
Gants, sopalin  
Seau poubelle (Serflex coupés, fil de fer, poids...)  
Grand seau pour transporter les bidons d'eau du site à la voiture  
Trousse de secours  
Vêtements de rechange