

# Etude des adaptations du métabolisme protéique, en particulier, énergétique et oxydatif, en réponse à des changements physiologiques ou environnementaux : approche ciblée et approche globale

Béatrice Rocher

▶ **To cite this version:**

Béatrice Rocher. Etude des adaptations du métabolisme protéique, en particulier, énergétique et oxydatif, en réponse à des changements physiologiques ou environnementaux : approche ciblée et approche globale. Ecotoxicologie. ULH-Normandie Université, 2017. tel-01963849

**HAL Id: tel-01963849**

**https://normandie-univ.hal.science/tel-01963849**

Submitted on 19 Jan 2019

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

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

*Partie scientifique du mémoire présenté par*

**Béatrice Rocher**

**Maître de Conférences**

*En vue de l'obtention du*

**Diplôme National d'Habilitation à Diriger des Recherches**

# Etude des adaptations du métabolisme protéique, en particulier, énergétique et oxydatif, en réponse à des changements physiologiques ou environnementaux : approche ciblée et approche globale

---

**Rapporteurs**

Dr. Dario MORAGA, Maître de Conférences HDR, Université Bretagne Occidentale, UMR CNRS 6539 LEMAR

Dr. Pascal COSETTE, Professeur des Universités, Université de Rouen, UMR CNRS 6270 Laboratoire PBS, Responsable Plateforme Protéomique PISSARO IRIB

**Examinateurs**

Dr. Valérie MESNAGE, Maître de Conférences HDR, Université Rouen, UMR CNRS 6143 M2C

Dr. Michel AUFFRET, Professeur des Universités, Université de Bretagne Occidentale, UMR CNRS 6539 LEMAR

Dr. Frank LE FOLL, Professeur des Universités, Université du Havre, Directeur UMR i02 SEBIO ULH

**Soutenance 22 septembre 2017**

The present work has been conducted in a double ecotoxicological and metabolic context. The aim was to study protein modifications linked to chemical or physical disorders in order to highlight the molecular and physiological mechanisms of stress responses. Ultimately, this work is part of the search in tools for environmental diagnostics. Studied species are common sentinels in environmental monitoring, mainly marine and freshwater bivalves. Two approaches have been developed: an open approach based on the establishment and comparison of proteomic fingerprints; a targeted approach focused on enzymatic markers involved in stress response. Special attention was paid to the superoxide dismutase enzyme, which has been used as a new tool for discrimination of two neighboring species of dreissena.

*A mon fils, Romain,*

*pour avoir supporté une mère aussi fantasque*

*A ses 18 ans,*

*et tout ce bonheur qu'il nous a apporté*

Ma profonde gratitude envers Dario Moraga, Pascal Cosette, Valérie Mesnage, Michel Auffret et Frank Le Foll qui me font l'honneur de participer à ce jury d'HDR.

Mes remerciements sincères aux rapporteurs, Dario Moraga, et Pascal Cosette, pour avoir accepté d'évaluer ce manuscrit.

❖ **Résumé**

❖ **Avant-Propos**

❖ **Synthèse des travaux**

---

Thématique générale :

Etude des adaptations du métabolisme protéique, en particulier énergétique et oxydatif, en réponse à des changements physiologiques ou environnementaux : approche ciblée et approche globale

# Chapitre 1 : Métabolisme oxydatif

I. **Etude du métabolisme oxydatif mitochondrial au cours du développement du rein chez le Rat**

1. Evolution du pool mitochondrial
2. Evolution des capacités respiratoires cellulaires
3. Induction hormonale

II. **Etude du système enzymatique anti-oxydant chez des espèces sentinelles en écotoxicologie aquatique**

1. Approche en laboratoire : exposition à des contaminants chimiques en conditions contrôlées
    a. Chez la moule zébrée
    b. Chez la moule bleue
2. Approche terrain : la baie de Seine, un site atelier en écotoxicologie aquatique

a- Evaluation intégrée des effets des contaminants à l'échelle individuelle et populationnelle sur deux espèces de bivalves, *Dreissena polymorpha* et *Mytilus edulis*, dans l'estuaire et l'embouchure de Seine.

b- Etude de l'impact des effluents industriels dans la zone portuaire havraise.

3. Focus sur la Cu/Zn-SOD
    a. Présentation générale
    b. Méthode de dosage
    c. Profil chez la moule bleue
    d. Profil chez la moule zébrée
4. Etablissement des profils Cu/Zn-SOD dans le cadre de l'ANR-IPOC
    a. Suivis chez la moule bleue
    b. Suivis chez la moule zébrée

# Chapitre 2 : Protéomique

## I. Mise en place d'un pôle protéomique au LEMA

## II. Focus sur le protéome branchial de moules

1. Réalisation d'une cartographie de base chez *Mytilus edulis*
2. Comparaison des profils protéomiques de deux espèces de dreissènes

## III. Le double enjeu : pollution et changement climatique

1. Effet conjugué de la pollution et de l'intertidalité
2. Effet d'une acclimatation sur la tolérance au stress thermique aigu

## IV. Identifications protéiques et données de masse

1. ProteomeViewer
2. Des profils de dégradation en signature de stress

## ❖ Conclusion et perspectives

## ❖ Détail des activités de communication scientifique

## ❖ Bibliographie

## ❖ Résumé

Cette HDR présente des travaux menés dans un double contexte écotoxicologique et métabolique. Il s'est agi d'étudier les modifications protéiques liées à des stress chimiques ou physiques afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires et physiologiques de réponses aux stress. *In fine* ces travaux s'inscrivent dans la recherche d'outils de diagnostics environnementaux. Les modèles d'études sont des espèces utilisées en surveillance environnementale, principalement des bivalves d'eaux marines et d'eaux douces. Deux approches ont été menées : une approche ouverte basée sur l'établissement et la comparaison d'empreintes protéomiques ; une approche ciblée de mesures de marqueurs enzymatiques impliqués dans la réponse aux stress. Une attention particulière a été portée à l'enzyme superoxyde dismutase qui a été utilisée comme nouvel outil de discrimination de deux espèces voisines de dreissènes.

## ❖ Avant-Propos

Mon activité de recherche a commencé en 1991 lors du stage de DEA que j'ai effectué dans l'unité INSERM U319, dirigée par le Dr Claudie Bénichou, unité dont la thématique portait sur la différenciation des épithéliums. A l'issue du DEA j'ai été classée au premier rang de la promotion ce qui m'a permis d'obtenir une allocation du Ministère de la Recherche et de poursuivre des études doctorales dans le même laboratoire, encadrée par le Dr Evelyne Delaval qui travaillait dans l'équipe du Pr. Jean-Pierre Geloso sur le développement du métabolisme énergétique rénal. Cette période fut riche en apprentissages tant techniques que fondamentaux, d'autant que j'eus pour mission de développer des techniques qui n'existaient pas alors dans le laboratoire. Ce développement s'est fait à travers des collaborations, d'abord avec le Dr. Laurence Cordeau-Lossouarn qui m'a accueillie dans le Laboratoire de Biochimie du Professeur Gros, au Collège de France et m'a initiée aux techniques biochimiques d'analyses des protéines : électrophorèses mono et bidimensionnelles, western-blot et immunodétection. Pour les analyses moléculaires de l'ADN mitochondrial, j'ai été accueillie par Agnès Rötig à l'INSERM U12 de l'Hôpital Necker, unité dirigée par le Pr. Arnold Munnick. Enfin, la construction d'une sonde cDNA de cytochrome c oxydase a également été réalisée à l'Hôpital Necker en collaboration avec le Dr. Cécile Marsac.

En 1993, j'ai eu l'occasion d'effectuer des heures d'enseignement à l'Université Paris VII en tant que Monitrice de l'Enseignement Supérieur. Cette expérience a conforté mon choix d'orientation professionnelle pour un métier combinant recherche et enseignement.

En 1999, j'ai été recrutée en tant que maître de conférences à l'Université du Havre et j'ai intégré le Laboratoire d'Ecotoxicologie-Milieux Aquatiques dirigé à l'époque par le Pr. François Leboulenger. J'ai plus précisément rejoint la thématique de recherche « Biochimie des stress environnementaux », thématique que j'ai partagée avec le Dr. Camille Galap, avant son élection à la Présidence de l'Université du Havre en 2005. En 2014, lors du passage du laboratoire en Unité Mixte de Recherche, nous avons engagé avec ma collègue Florence Bultelle un partenariat étroit en recherche et intégré la thématique Métabolisme et Energie du nouveau laboratoire. Cela nous a permis de continuer les travaux portant sur les effets des stress chimiques et physiques sur les bivalves à travers d'autres collaborations au sein de la nouvelle structure, notamment avec Elise David et Stéphane Betoulle.

Mon recrutement avait entre autres objectifs de mettre en place et développer l'approche protéomique pour la mettre au service des problématiques d'écotoxicologie. Cela a

demandé l'équipement intégral d'une pièce dédiée et un financement conséquent qui a été obtenu progressivement via des contrats de financement essentiellement régionaux : CPER de la Région Haute-Normandie, contrats Agence de l'Eau Seine-Normandie, programmes et aides aux financements du GIP Seine-Aval, de l'IFRMP23 puis de la SFR-SCALE. La thématique en se développant a donné lieu à plusieurs collaborations nationales et internationales, de même qu'à de nombreuses interactions au sein du laboratoire. Elle a ainsi été intégrée à une succession de programmes de recherche au niveau national (INSU/ECODYN DECIME, LITEAU 2, ANR IPOC) et au niveau international (INTERREG IVA DIESE, FEDER ECORSA, INTERREG IVA PeReNE) ainsi qu'à plusieurs travaux de thèse.

Parallèlement à l'activité de recherche et d'enseignement, j'ai pris en 2002 la responsabilité de la licence de Biologie Générale de l'UFR des Sciences et Techniques de l'Université du Havre puis, à la suite du passage au LMD, j'ai été chargée de la mention Biologie de la licence de Sciences et Technologies ainsi que de la 3ème année de cette licence, responsabilités que j'ai exercées jusqu'en 2014. J'ai également été porteur du projet de licence de Sciences de la Vie dans les habilitations LMD2 et LMD3, ce qui m'a permis de participer à l'évaluation de cette formation et à son évolution.

---

L'ensemble des travaux développés ou évoqués dans les pages suivantes n'auraient pu exister sans l'aide et la collaboration de nombreux collègues. Ainsi merci à …

François Leboulenger, alors Directeur du LEMA, d'avoir accepté de me recevoir et d'avoir pris en considération ma demande de stage. Il a été un exemple pour moi, tant par son humanité et la richesse de sa culture scientifique que par sa capacité à avancer sans jamais se départir de sa gentillesse.

Marc Bulant de m'avoir pris dans son équipe et mis le pied à l'étrier. Camille Galap, avec qui on a formé une équipe mixte au sens où nous avons poursuivi la mise en place d'un pôle protéomique et, parallèlement, étudié les enzymes antioxydantes, avec un coup de cœur pour la superoxyde dismutase.

Jérôme Cachot, Jean-Michel Danger, Christophe Minier, Fabrice Durand, Joëlle Forget-Leray, Céline Boulangé-Lecomte, Thomas Knigge, Tiphaine Monsinjon et, à plus d'un titre,

Frank Le Foll avec lesquels j'ai pris plaisir, et je continue à prendre plaisir, à interagir au sein de programmes de recherche fructueux et enrichissants.

Encore merci à Tiphaine Monsinjon, de même qu'à Linda Gricourt, Myrielle Dupont, Anne-Caroline Hanquet et Teddy Lesueur pour leur participation à ces travaux de recherche pendant leurs contrats d'ATER à l'Université du Havre.

Mention spéciale à Florence Bultelle pour le bonheur de tracer avec elle le cercle vertueux de la Recherche : curiosité pour la nature et questionnement, avancées des technologies et des connaissances, découverte de nouveaux territoires à explorer… Merci à elle pour ce partenariat de travail qui m'amène à préciser que les travaux effectués depuis 2012 ont été menés ensemble, fruit étroit de concertations actives et de journées de paillasse studieuses.

Je tiens aussi à remercier des collègues extérieurs au laboratoire qui ont contribué de façon notable au développement de cette recherche. Plus particulièrement, Hubert Vaudry, Catherine Lange, Thierry Jouenne, David Vaudry, Philippe Chan, et de nouveau Pascal Cosette, pour leur apport dans l'identification des protéines par spectrométrie de masse.

Merci à Stéphanie Olivier et Agnès Poret pour leur aide précieuse dans la réalisation de manip au fil de l'eau.

Merci également à l'équipe Métabolisme et Energie du site rémois pour cette belle énergie qu'elle nous donne et avec laquelle nous partons pour d'attrayants nouveaux projets.

Et comme je ne pourrais citer chacun, merci à tous les collègues français et étrangers, co-auteurs et partenaires de projets avec lesquels nous avons poussé la roue de la connaissance. Un clin d'œil à David Sheehan pour son enthousiasme communicatif et à Yves Saint-Pierre pour cette formule si délicieusement adaptée à notre travail : « Avant d'embarquer, commence par débarquer ».

Et que serait notre travail sans les étudiants que nous formons et qui en retour nous enrichissent de nouvelles expériences : ils ont toute ma gratitude.

Enfin merci à celui qui a été mon plus grand supporter, Patrice. Il a activement participé à ces travaux, sur le terrain, dans les campagnes de prélèvements des week-end ou de ses jours de repos, par beau temps comme sous la pluie, en assurant des éclairages de nuit dans la campagne Decime, à transporter les échantillons entre la moulière et le fourgon de prélèvement, à assurer la sécurité lors des prélèvements dans l'Oise et même à se mouiller (en propre –difficile à dire au vu de la couleur de l'eau-) dans les pêches à la dreissène.

De façon aussi efficace, il a apporté un éclairage de logique et de connaissances encyclopédiques à vingt ans de discussions scientifiques, toujours menées avec autant d'intérêt et d'enthousiasme.

Les travaux auxquels j'ai participé ces dernières années, que ce soit en protéomique ou dans l'étude d'éléments intervenant dans la réponse au stress oxydant, ont été intégrés à de nombreux programmes de recherche et de financement. Merci à tous ces soutiens ainsi qu'aux collègues qui ont activement porté ces projets.

**au niveau de l'UMR**

---

. Actions Transversales 2015 et 2016

**au niveau régional**

---

. CPER de la Région Haute-Normandie

. IFRMP23

. Fédération SCALE

. GIP Seine-Aval

. CODAH

. Agence de l'Eau Seine-Normandie

**au niveau national**

---

. PNETOX Programme National d'Ecotoxicologie (2002-2004) « Etude des phénomènes de bioaccumulation/biotransformation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques par les organismes aquatiques »

. DECIME INSU/ECODYN (2003-2005) « Dynamique et effets biologiques des contaminants organiques dans le contexte d'intertidalité d'un organisme sentinelle, *Mytilus edulis* »

. LITEAU2 (2004-2007) « Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique »

. ANR IPOC (2013-2016) « Interactions entre la POllution et les Changements climatiques : développement d'une nouvelle stratégie de surveillance »

. PolQua Fondation ROVALTAIN (2016-2017) Programme de Recherche en Toxicologie Environnementale et Ecotoxicologie « Moule zébrée ou moule quagga, identification génétique et comparaison des réponses biologiques aux stress : quelle implication en écotoxicologie ? »

**au niveau international**

---

. BEEP (contrat européen EVK3-2000-00543) (2001-2004) « Biological effects of environmental pollution in marine coastal ecosystems »

. FEDER ECORSA (soutien financier de Fonds Européen de DEveloppement Régional) (2007-2013) « Ecotoxicologie des Contaminants Organiques et Recherche de Substances Actives »

. DièSE INTERREG IVA FRANCE (MANCHE)-ANGLETERRE (2009-2013) «Détermination d'Indicateurs Environnementaux pertinents : une Stratégie pour l'Europe »

. PERèNE INTERREG IVA FRANCE (MANCHE)-ANGLETERRE (2013-2015) «Peptide Research Network of Excellence »

## ❖ Synthèse des travaux

Thématique générale :

Etude des adaptations du métabolisme protéique, en particulier énergétique et oxydatif, en réponse à des changements physiologiques ou environnementaux : approche ciblée et approche globale

# Chapitre 1: Métabolisme oxydatif

Il y a presqu'un aspect philosophique à la progression scientifique qui m'a amené à passer du métabolisme oxydatif au stress oxydatif (ou selon, oxydant), l'un et l'autre représentant les deux versants d'un même phénomène merveilleux : l'émergence d'une vie plus complexe par le pouvoir que confère l'oxygène à extraire plus d'énergie des aliments, tout en étant un poison pour un environnement cellulaire apparu dans le contexte d'un monde réducteur.

## I. Etude du métabolisme oxydatif mitochondrial au cours du développement du rein chez le Rat

---

1992-1997 : Laboratoire INSERM U319, Université P7

Mon premier sujet de recherche a concerné le développement du métabolisme oxydatif mitochondrial dans le rein de rat au cours de la période périnatale. La thématique de recherche visait à comprendre les adaptations du métabolisme énergétique rénal en vu de répondre aux demandes accrues en énergie de la période périnatale. De fait, à la fin de la vie foetale comme à la naissance, la mise en place et le développement des principales fonctions rénales s'accompagnent d'une forte augmentation de la demande énergétique de l'organe (Bastin et al., 1988). Je me suis plus particulièrement intéressée au métabolisme oxydatif mitochondrial car c'est lui qui assure, dans le rein de l'adulte, l'essentiel de la production d'ATP (Balaban & Mandel, 1980).

### 1. Evolution du pool mitochondrial

Dans un tissu, la maturation du pool mitochondrial peut se faire selon deux processus, l'un conduisant à une prolifération de ces organites, c'est à dire à une augmentation de la densité mitochondriale ; l'autre correspondant à une différenciation de mitochondries préexistantes (Veltri et al., 1990).

L'évolution du pool mitochondrial a été déterminée en mesurant de façon relative la quantité d'ADN mitochondrial par dot blot et hybridations avec des sondes spécifiques. Les résultats de cette étude ont indiqué un doublement de la quantité d'ADN mitochondrial 3 jours avant la naissance, ce qui traduit une prolifération mitochondriale au moment où les activités

de filtration et de réabsorption se mettent en place. Le suivi du marqueur de densité mitochondriale, la citrate synthase, a confirmé ces résultats (Fig.1).

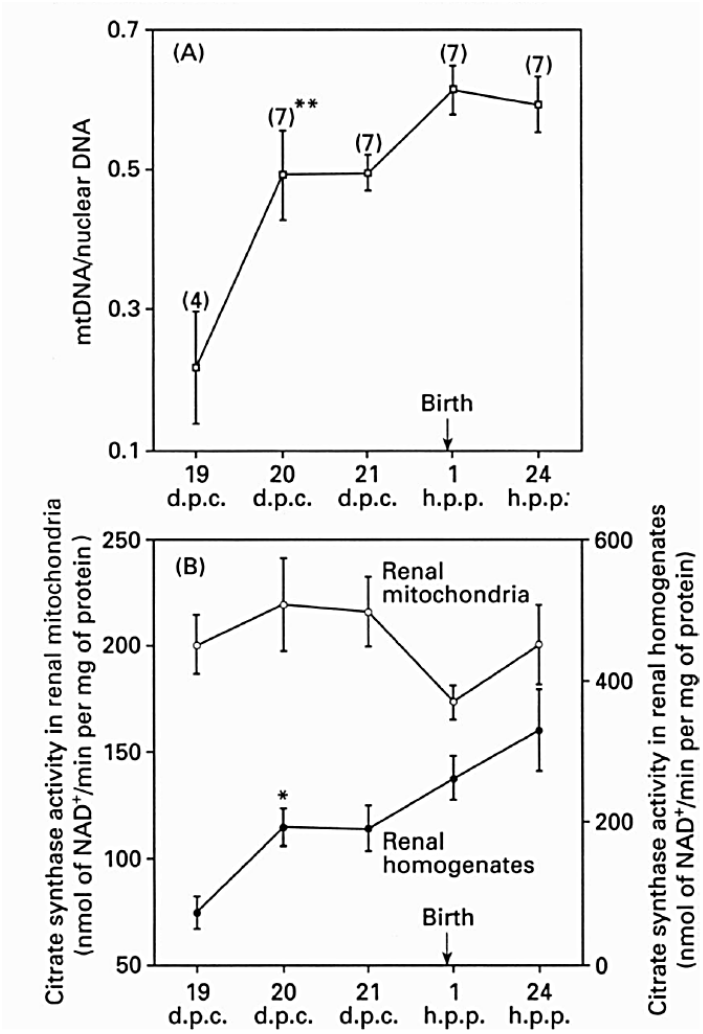



Fig. 1 - Prolifération mitochondriale dans le rein de rat au cours de la période péri-natale (adapté de Prieur et al, 1995, Biochemical Journal) A : abondance relative de la quantité d'ADN mitochondrial ; B : activité citrate synthase dans le rein (ronds noirs) et les mitochondries isolées (ronds blancs).

## 2. Evolution des capacités respiratoires cellulaires

Afin de déterminer si une différenciation des mitochondries rénales apparaissait également au cours de la période étudiée, nous avons réalisé des préparations de mitochondries isolées sur lesquelles nous avons mesuré la consommation d'oxygène. Faible au cours de la vie foetale, elle augmente de 30 % à la fin de la gestation, puis à nouveau mais de façon plus importante après la naissance (+70%). Il existe donc bien une différenciation des mitochondries rénales au cours de la période étudiée (Prieur et al., 1995).

A ce stade, nous avions montré qu'en réponse à l'élévation de la demande en énergie du rein, le métabolisme oxydatif se développait de façon importante. Restait à comprendre les mécanismes impliqués dans ces changements. Pour ce faire, nous avons étudié un complexe majeur de la chaîne respiratoire : la cytochrome c oxydase (Capaldi, 1990). C'est à ce niveau que l'oxygène est consommé lors des phosphorylations oxydatives qui conduisent à la synthèse d'ATP. L'activité enzymatique de la cytochrome c oxydase comme son abondance et le taux de ses ARN messagers ont été déterminés sur mitochondries isolées (Fig. 2).

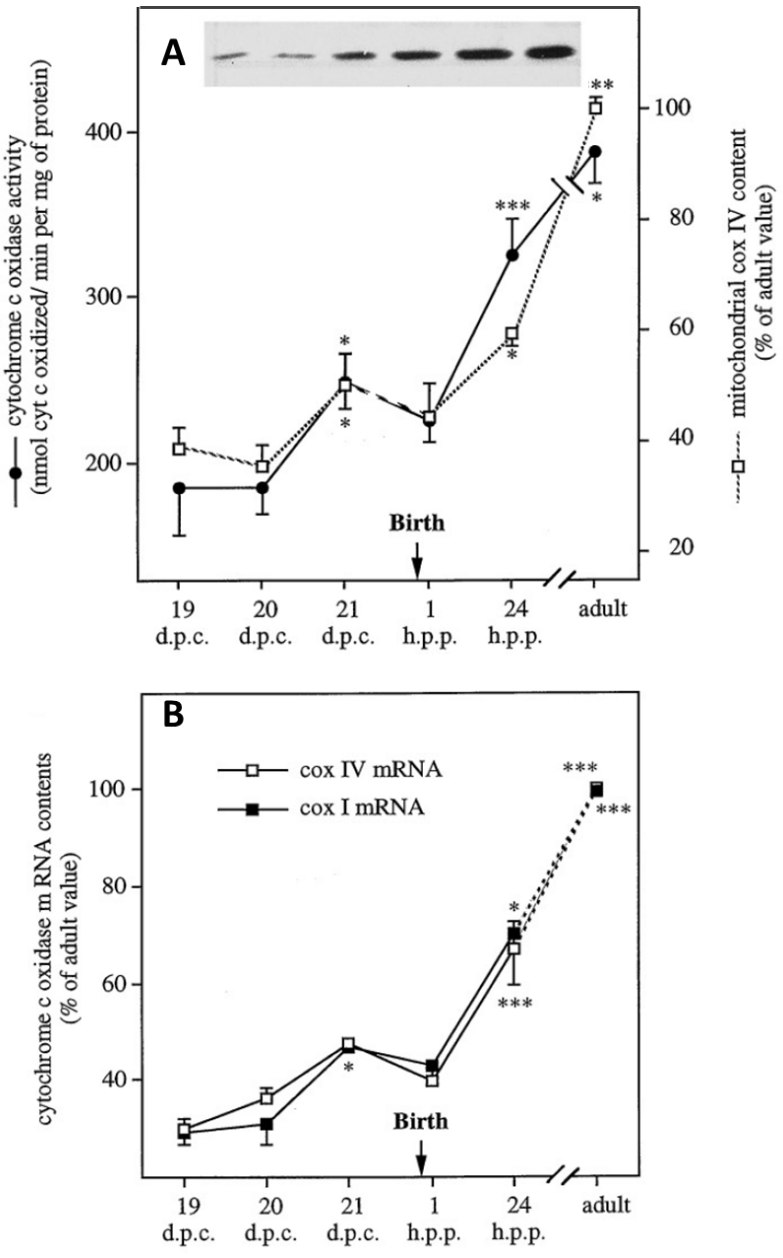
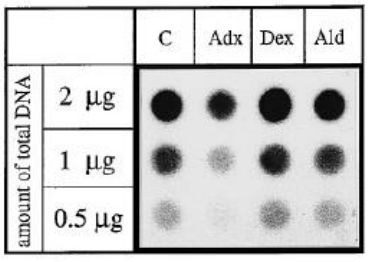



Fig. 2 - Evolution de la cytochrome c oxydase au cours de la période périnatale dans le rein de rat (adapté de Prieur et al, 1998, European Journal of Biochemistry) A : activité enzymatique et abondance relative ; B : taux relatifs de transcrits.

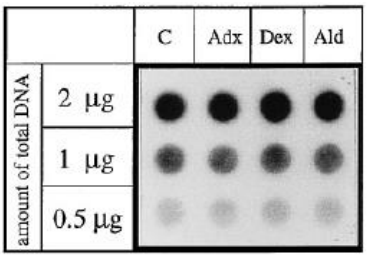
Ces éléments présentent une évolution tout à fait parallèle et semblable à celle de la consommation d'oxygène. Ces résultats suggèrent qu'une synthèse de novo de complexes de la chaîne respiratoire est à l'origine des modifications des capacités oxydatives observées précédemment.

### 3. Induction hormonale

Parmi les mécanismes susceptibles d'être impliqués dans la maturation mitochondriale rénale, nous avons examiné le rôle éventuel des hormones surrénaliennes (Geloso and Basset, 1974; Jost, 1966). Une étude réalisée sur des femelles gestantes surrénalectomisées a montré que la quantité d'ADN mitochondrial et le taux des ARN messagers de la cytochrome c oxydase sont diminués dans les reins des foetus en l'absence d'hormones surrénaliennes. Par contre, l'injection à des femelles surrénalectomisées de dexaméthasone, un analogue des glucocorticoïdes, restaure des niveaux comparables à ceux mesurés chez les témoins. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'aldostérone, un minéralocorticoïde (Fig. 3).




a - mitochondrial probe




b - nuclear probe

Fig. 3 - Effet des hormones surrénaliennes sur la maturation mitochondriale rénale chez le rat (adapté de Prieur et al, 1998, European Journal of Biochemistry) a : quantité d'ADN mitochondrial ; b : quantité d'ADN total. Les prélèvements des reins des fœtus ont été réalisés au 21ème jour post-coïtum ; précédemment, au 16 ème jour post-coïtum les femelles ont été opérées à blanc (C) ou surrénalectomisées et traitées journellement à la métopirone pour inhiber la synthèse des hormones stéroïdiennes fœtales (Adx) ; au 19 ème jour post-coïtum, les fœtus des femelles surrénalectomisées et traitées à la métopirone ont reçu une dose de dexaméthasone (Dex) ou d'aldostérone (Ald) par voie intra-utérine.

Il existe donc un effet inducteur des hormones surrénaliennes à la fois sur la densité et la différenciation des mitochondries rénales à la fin de la gestation (Prieur et al., 1998).

## II. Etude du système enzymatique anti-oxydant chez des espèces sentinelles en écotoxicologie aquatique

---

1999-2014 : LEMA EA32 22, Université du Havre
depuis Avril 2014 : SEBIO UMR -I 02 INERIS-URCA-ULH

Lorsque j'ai rejoint le LEMA mon sujet de recherche s'est inscrit dans le cadre de la mise en place d'outils pour la gestion des pollutions chimiques de l'eau afin d'évaluer les seuils de toxicité des xénobiotiques et tenter d'identifier des biomarqueurs spécifiques des polluants de l'environnement.

L'exposition aiguë ou chronique à une contamination chimique représente pour les organismes aquatiques un stress dont l'une des composantes majeures est le stress oxydatif (Sies et al., 2017). Une panoplie de systèmes anti-oxydants existe, incluant des enzymes dont les principales sont la superoxyde dismutase (SOD), la catalase, la glutathion peroxidase et la glutathion réductase. Nous avons entrepris de mesurer les niveaux d'activité de ces biomarqueurs potentiels de stress chimiques avec une attention toute particulière portée à la SOD. Cette enzyme catalyse la dismutation du radical superoxyde en peroxyde d'hydrogène, bloquant ainsi la production de radicaux plus réactionnels à partir de l'anion superoxyde. Elle a donc un rôle clé dans les défenses cellulaires contre le stress oxydatif. Nous nous sommes de même particulièrement intéressés à une autre enzyme, la glutathion S-transférase (GST) qui appartient à la phase II du système de détoxification mais possède en outre une activité glutathion peroxydase, de sorte qu'elle participe également à la protection anti-oxydante.

Les mesures ont été réalisées chez différentes espèces de bivalves et de crustacés, je ne rapporterai ici que quelques-uns des résultats obtenus chez *Mytilus sp*. et *Dreissena sp*. Ces bivalves sont des espèces couramment utilisées en surveillance environnementale et font l'objet de nombreuses études écotoxicologiques. Elles présentent des caractéristiques requises d'espèces sentinelles ou indicatrices, en particulier une large aire de répartition géographique,

un mode de vie sédentaire, une abondance de leurs peuplements, associées à une relative résistance aux contaminants et à une importante capacité de bioaccumulation. De plus, elles constituent une ressource alimentaire non négligeable pour de nombreuses espèces aériennes ou aquatiques, ce qui occasionne l'entrée des polluants chez ses prédateurs. Bien que l'une soit marine et l'autre dulçaquicole, ces deux espèces possèdent des caractéristiques morphologiques et des modes de vie très similaires. Elles vivent en pleine eau, fixées par un byssus sur pratiquement tous les substrats durs disponibles. Elles sont microphages filtreurs, les particules alimentaires étant capturées au niveau des branchies et orientées ensuite vers la cavité buccale par des mouvements ciliaires. Enfin, outre cette fonction de nutrition, les branchies ont aussi une fonction de respiration en assurant de nombreux échanges gazeux. Ce sont ces fonctions ainsi que la position de ce tissu à l'interface entre l'environnement interne de l'organisme et l'extérieur qui nous ont amené à le privilégier dans nos études, souvent de préférence à la glande digestive, également très étudiée en écotoxicologie.

1. Approche en laboratoire : exposition à des contaminants chimiques en conditions contrôlées

    a. Chez la moule zébrée

En ce qui concerne la dreissène, les expositions en laboratoire à des contaminants chimiques ont été menées essentiellement dans le cadre des travaux de thèse d'Hélène Manduzio (Manduzio, 2004). Les dreissènes ont été prélevées dans la Seine à hauteur de l'île Lacroix à Rouen (76, France) et placées dans une enceinte climatisée à 18°C, pour une période de dépuration de 21 jours. Dans ces conditions, nous avons observé qu'il fallait attendre une quinzaine de jours avant d'atteindre une stabilisation des niveaux d'activité des enzymes suivies.

Les expositions aux contaminants ont été réalisées en mode statique, avec un renouvellement de l'eau tous les deux jours. Trois composés ont été testés : deux herbicides, l'atrazine retrouvé fréquemment dans les eaux de surfaces et le méthylviologène, principe actif du paraquat connu pour sa capacité à induire la production de radicaux de l'oxygène en raison de ses propriétés d'accepteur fort d'électrons ; l'aroclor 1254, un mélange technique de polychlorobiphényls de composition représentative des congénères présents en estuaire de Seine. Dans leur ensemble, les résultats ont montré des variations, le plus souvent transitoires, des niveaux d'activité des enzymes étudiées aux plus fortes concentrations testées. Inversement, aucune variation significative n'a été enregistrée lorsque les dreissènes ont été

exposées à des concentrations de contaminants comparables aux doses retrouvées dans l'estuaire de Seine. A ces concentrations, les variations saisonnières et inter-individuelles sont susceptibles de masquer les perturbations dues aux effets propres de l'exposition. Toutefois, nous avons noté une différence de sensibilité entre les deux tissus étudiés, les branchies et la glande digestive. Ainsi, suite aux expositions à l'atrazine et au mélange méthylviologène-Aroclor 1254, les branchies ont présenté les modifications d'activité les plus importantes et les plus reproductibles.

b. Chez la moule bleue

Dans le cadre du programme européen d'écotoxicologie marine BEEP (Biological effects of environmental pollution in marine coastal ecosystems), une expérience d'exposition de 21 jours de moules bleues à deux conditions de contamination environnementale a été réalisée à Stavanger (Norvège) dans les installations du laboratoire Akvamiljø : la première avec du pétrole brut de la Mer du Nord ; la deuxième avec ce même pétrole complémenté par des hydrocarbures aromatiques polycycliques et des alkylphénols afin de mimer l'eau de production qui est rejetée aux abords des plateformes pétrolières off-shore en Mer du Nord.

Ces expériences ont eu peu d'effet sur l'activité des systèmes antioxydants des moules bleues. L'activité de la glutathion réductase a été la plus significativement modifiée, avec une diminution d'environ 40% dans les deux tissus après exposition des animaux au pétrole brut. En présence du mélange de contaminants, la réduction n'a été retrouvée que dans la glande digestive, mais son amplitude a été plus prononcée. Aucune variation de l'activité totale de la superoxyde dismutase n'a été observée à la suite de ces expositions. Cependant, l'activité de l'isoforme majeure de la Cu-Zn/SOD comme sa contribution à l'activité totale ont été significativement diminuées dans les deux tissus des animaux exposés au mélange pétrole, hydrocarbures aromatiques polycycliques et alkylphénols. Dans la glande digestive, cette réduction s'est accompagnée d'une augmentation parallèle de l'isoforme mineure. Une étude protéomique a également été menée sur ces échantillons (Manduzio et al., 2005).

Dans le cadre du programme national DECIME (Dynamique et effets biologiques des contaminants organiques dans le contexte d'intertidalité d'un organisme sentinelle, *Mytilus edulis*), des expériences d'exposition de moules bleues à différents contaminants organiques ont été réalisées dans les installations du laboratoire situées à Aquacaux. Les animaux ont été prélevés à Yport et placés dans un système de stabulation en circuit ouvert reproduisant, pour

un groupe, un cycle artificiel de marée avec une exondation périodique (6h/6h) quand l'autre groupe a été placé en condition d'immersion permanente. Après 7 jours d'acclimatation, une partie des moules a été exposée aux CB153 (500 ng/L), B[a]P-phénantrène (respectivement 0,5 et 5µg/L), nonylphénol (5µg/L), carbamazépine (30 µg/L), seuls ou en mélange. Les prélèvements ont été effectués à heure fixe après 2, 4, 7 et 14 jours. Les niveaux des activités anti-oxydantes, superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxidase, glutathion réductase et de la glutathion S-transférase ont été mesurés dans les branchies et les glandes digestives pour tous ces points de prélèvements. Une analyse protéomique a été menée sur les branchies prélevées après les 14 jours d'exposition (Letendre et al., 2011).

Ces études ont fait l'objet du travail de thèse de Julie Letendre et ont été associées à une approche terrain qui, de façon générale, a montré que les contraintes naturelles de l'habitat influencent les capacités anti-oxydantes dans une mesure parfois supérieure à l'impact de la contamination chimique (Letendre, 2009). Ce constat nous a amené à privilégier l'approche terrain de manière à mieux prendre en compte les variations écophysiologiques afin de les distinguer des variations induites par les polluants.

2. Approche terrain : la baie de Seine, un site atelier en écotoxicologie aquatique

Le profil de contamination de la Seine et de sa baie est multiple et complexe. La Normandie est une région fortement industrialisée et urbanisée, notamment le long de l'axe de la Seine avec, dans sa partie avale, un ensemble industriel et portuaire développé de Rouen au Havre. Par ailleurs, la Seine recueille une majeure partie des pollutions d'origine industrielle, domestique, agricole et urbaine, provenant de l'ensemble de son bassin versant. De nombreux micro-polluants sont adsorbés sur les matières en suspension ou les sédiments et se retrouvent retenus dans l'estuaire, notamment au niveau du bouchon vaseux. Une partie de ces polluants est absorbée par les organismes, transférée via les réseaux trophiques et concentrée au sommet de la chaine alimentaire. C'est pourquoi l'état de l'environnement aquatique de la zone requiert une attention majeure. Dans ce contexte la Seine et sa baie font l'objet depuis plusieurs décennies d'un suivi environnemental articulé autour de structures de recherche et de grands programmes : Gip Seine Aval (http://www.seine-aval.fr), Piren-Seine (http://piren-seine.fr), réseau ROCCH –précédemment RNO- (http://envlit.ifremer.fr/surveillance).

Au niveau de la baie, l'effet de dilution par les eaux de la Manche crée un gradient de contamination contrasté entre une zone portuaire havraise fortement impactée par les déchets industriels et urbains et des sites périphériques présentant des taux de contamination beaucoup

plus bas, en particulier à Yport, station sélectionnée de ce fait comme référence dans des études comparatives avec la zone havraise. Ci-dessous deux exemples d'études que nous avons menées sur cette zone.

a. Evaluation intégrée des effets des contaminants à l'échelle individuelle et populationnelle sur deux espèces de bivalves, *Dreissena polymorpha* et *Mytilus edulis*, dans l'estuaire et l'embouchure de Seine.

Dans le cadre d'une campagne d'échantillonnage d'un programme du GIP Seine Aval porté par Jérôme Cachot, des moules, de l'eau et des sédiments ont été prélevés sur une dizaine de sites, de la partie amont de Rouen à la Baie de Seine. L'étude a permis l'analyse d'une palette de contaminants (lindane, métaux lourds, polychlorobiphényles et hydrocarbures aromatiques polycycliques) contenus dans les sédiments et dans les tissus de deux espèces de bivalves. En parallèle, les activités glutathion peroxydase, superoxyde dismutase et glutathion S-transférase ont été mesurées sur les branchies et glandes digestives des animaux collectés.

Les principaux résultats reflètent le profil de contamination des zones étudiées tout en renseignant sur la manière dont les deux espèces de moules accumulent de façon différentielle les contaminants. Une corrélation nette a été établie entre la contamination en métaux et l'activité antioxydante SOD, d'une part et entre la contamination en hydrocarbures et l'activité de détoxification de la glutathion S-transférase, d'autre part (Rocher et al., 2006).

b. Etude de l'impact des effluents industriels dans la zone portuaire havraise.

Dans cette deuxième étude, les moules ont été collectées dans le port du Havre aux abords du complexe industriel formé par l'ensemble Centrale thermique (EDF) – Station d'épuration des eaux usées – Usine d'incinération des ordures ménagères. Un site localisé au niveau du quai de la Gironde a servi de point de référence en raison de son isolement des autres bassins portuaires. Les activités glutathion S-transférase, glutathion peroxydase, glutathion réductase et Cu-Zn/SOD ont été mesurées dans les branchies et les glandes digestives d'animaux prélevées au cours d'un cycle annuel.

Les résultats de cette étude ont fait apparaître une variation saisonnière des niveaux d'activité de l'ensemble des enzymes suivies, avec toutefois des augmentations particulièrement marquées en juin au niveau du site le plus proche du point de sortie des effluents de la centrale thermique. Ce site présente dans ses eaux les résidus d'une chloration en continu (taux résiduels de chlore libre de 0,1 à 0,2 $mg.L^{-1}$) et d'un agent anti-biosalissure,

le Mexel 432, un mélange de polyamines primaires et secondaires. Ces composés pourraient être responsables de l'induction des enzymes observée en particulier dans les branchies (López-Galindo et al., 2010). En effet le Mexel est un surfactant non-ionique qui forme un film sur les cellules branchiales et peut modifier leur infrastructure, ce qui, à hautes doses, conduit à l'asphyxie des bivalves (Domart-Coulon et al., 2000). Un autre élément distingue le site de sortie des effluents aqueux de la centrale thermique, il s'agit d'une température significativement plus élevée (de + 4 à + 6°C). En juin, un stress thermique surimposé pourrait ainsi expliquer l'induction plus forte des enzymes mesurées. En outre, en dépit de variations saisonnières, les données recueillies font apparaître pour l'enzyme Cu-Zn/SOD une surexpression quasi-systématiquement significative, et parfois spectaculaire (jusqu'à 500 %), d'une de ses isoformes (bande 3), quelle que soit la date de prélèvement, chez les animaux provenant des sites du complexe industriel comparativement au site référence (Manduzio et al., 2004). Ces observations nous ont amené à approfondir l'étude de la Cu-Zn/SOD.

3. Focus sur la Cu/Zn-SOD

    a. Présentation générale

La superoxyde dismutase des moules présente plusieurs formes dont une forme associée au cuivre et au zinc, la Cu/Zn-SOD (SOD1, dimérique) souvent décrite comme cytosolique, une forme associée au manganèse particulièrement inductible par l'anion superoxyde, la Mn-SOD (SOD2), localisée dans la matrice mitochondriale et une forme extracellulaire, EC-SOD (SOD3, tétramèrique) (Yamada et al., 1997; Zeinali et al., 2015; Zelko et al., 2002). Cette dernière a la capacité de se lier à la surface des membranes cellulaires ou au collagène et protège ainsi les cellules du stress oxydant exogène. Ces formes se distinguent par plusieurs autres critères dont des critères de séquence, de taille et des sensibilités différentes à des inhibiteurs ; ainsi l'activité de la Cu/Zn-SOD est bloquée par le cyanure de potassium (Kliebenstein et al., 1998; Yim et al., 1990). Il est à noter que le site actif des différentes formes présente une structure tertiaire d'ensemble bien conservée, formée d'un puits hydrophobe où s'insère l'anion superoxyde. Pendant la catalyse, l'ion métallique capture un électron de l'anion superoxyde et le transfère au noyau imidazole de l'une des histidines du site actif.

Le couple Mn-SOD et Cu/Zn-SOD intervient dans des conditions de déséquilibre redox, activant et contrôlant des mécanismes spécifiques de réparation de l'ADN (Bonatto, 2007). La Mn-SOD mitochondriale est essentielle pour les êtres vivants aérobies dans la mesure où son

absence est létale (Melov et al., 1998). De ce point de vue, la Cu/Zn-SOD cytosolique apparaît moins importante dans la limitation du stress oxydant, cependant les souris dépourvues de SOD1 (Cu/Zn-SOD cytosolique) développent une grande quantité de pathologies (Liu et al., 2000). Par ailleurs, les deux formes sont finement régulées au niveau de leur expression génétique (Miao and St Clair, 2009; Milani et al., 2011).

Enfin, la Cu/Zn-SOD est la plus polyvalente des superoxydes dismutases. D'une part, le promoteur du gène SOD1 possède des éléments de réponse à toute une variété de facteurs de transcription (Milani et al., 2011), d'autre part, la localisation cellulaire de la Cu/Zn-SOD est multiple. Initialement décrite dans le cytosol, elle est aussi rattachée à l'espace inter-mitochondrial où elle limite le relargage du cytochrome c dans le cytosol et donc verrouille une voie apoptotique (Kira et al., 2002; Okado-Matsumoto and Fridovich, 2001; Zapico and Ubelaker, 2013). Après phosphorylation, elle peut être transloquée dans le noyau et servir de facteur de transcription (Tsang et al., 2014). De plus, elle est elle-même sujette à des oxydations (Uchida and Kawakishi, 1994) et, sous ses formes oxydées, s'avère capable d'inhiber certaines des protéases du protéasome (Le Pecheur et al., 2005). Enfin, outre ses fonctions anti-oxydantes, elle a été impliquée dans des réponses pro-inflammatoires du système immunitaire (Wang et al., 2013).

b. Méthode de dosage

Plutôt que de mesurer l'activité superoxyde dismutase sur homogénats, nous avons adopté une technique de révélation sur gels après isoélectrofocalisation qui permet la discrimination des différents types de superoxyde dismutases (Beauchamp & Fridovich, 1971). Après migration de l'extrait tissulaire, les gels sont placés dans une solution de bleu de nitrotetrazolium et de riboflavine, l'activité superoxyde dismutase est visualisée par l'apparition de bandes achromatiques sur fond violet. Une gamme étalon est réalisée à partir de superoxyde dismutase bovine purifiée.

Dans un gradient de pH large, la forme manganèse apparait à un pI basique (environ 9) alors que les formes cuivre/zinc présentent des pI acides (entre 4 et 5).

c. Profil chez la moule bleue

Dans les branchies et la glande digestive de la moule bleue, l'activité superoxyde dismutase est majoritairement de type Cu/Zn et présente un profil caractéristique à trois bandes (Fig.4). Nous avons montré que la bande mineure (bande 3 de la figure 4) est

inductible et que son abondance relative peut être modifiée selon les conditions environnementales rencontrées (Manduzio et al., 2003).

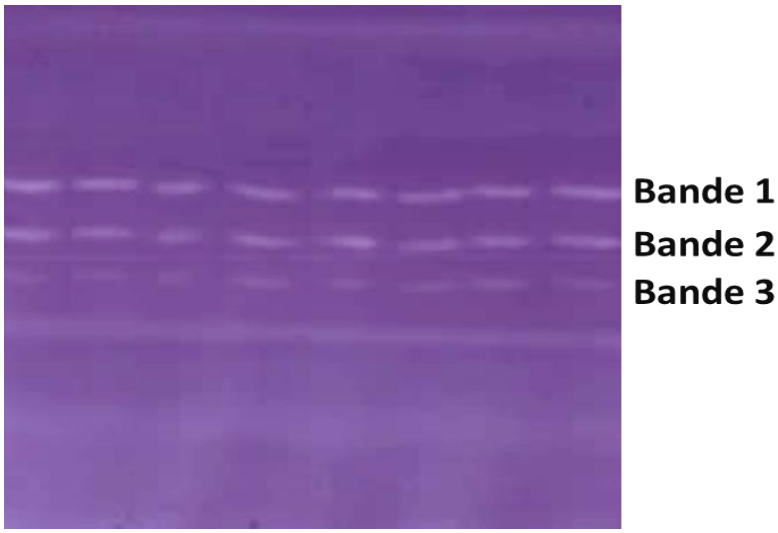



Fig. 4 - Bandes achromatiques présentant une activité Cu-Zn/SOD dans les tissus de moules bleues

Dans un deuxième temps, nous avons caractérisé la réponse de la Cu/Zn-SOD dans la glande digestive et les branchies chez la moule bleue, *Mytilus edulis*, au cours du cycle tidal, considérant qu'en raison de l'alternance des phases d'immersion/émersion, il s'agissait d'un cas remarquable d'adaptation physiologique à des phases répétées d'hypoxie-hyperoxie et donc à un stress oxydant périodique.

Les animaux ont été prélevés au niveau de la station de référence Yport. Deux positions situées respectivement en position haute et basse de l'estran ont été définies : les moules de la position haute subissant la plus longue période d'exondation, les moules de la position basse n'étant qu'occasionnellement hors de l'eau. Les prélèvements des tissus ont été effectués directement sur le terrain à différents moments du cycle tidal. L'activité superoxyde dismutase a été déterminée sur gel par révélation spécifique après isoélectro-focalisation.

Dans ces conditions les trois bandes de Cu/Zn-SOD précédemment décrites ont été retrouvées et une modification de leur contribution à l'activité totale a été observée. Elle dépend à la fois du cycle tidal et de la localisation sur l'estran. Ces résultats suggèrent que les modifications d'expression des isoformes de la Cu/Zn-SOD sont non seulement induites par des contaminants, comme cela a été précédemment démontré, mais également liés aux changements de statut redox qui interviennent au cours du cycle tidal (Letendre et al., 2008).

Des analyses en spectrométrie de masse sur protéines natives pourraient nous permettre de mieux comprendre de tels changements et de valider l'hypothèse actuellement posée de régulation de cette activité, dans les tissus de moules bleues, par des modifications post-traductionnelles de type oxydations. Ce travail est en cours… A suivre donc.

d. Profil chez la moule zébrée

Chez la dreissène nous avons également retrouvé un profil Cu/Zn-SOD composé de plusieurs isoformes mais le nombre de bandes a été plus variable d'un individu à l'autre. Ces profils nous ont amené à deux hypothèses, l'une expliquant l'hétérogénéité des isoformes du fait d'une grande plasticité structurale et de possibles interconversions chimiques, l'autre reposant sur l'existence d'un polyallélisme élevée du gène SOD1. Comme je vais le détailler dans le prochain paragraphe, les observations réalisées lors de l'ANR IPOC font plutôt pencher la balance en faveur de cette dernière hypothèse. Les données de séquençage acquises récemment au cours du programme PolQua de la fondation Rovaltain devrait nous permettre de trancher.

4. Etablissement des profils Cu/Zn-SOD dans le cadre de l'ANR-IPOC

Le projet IPOC (https://www-iuem.univ-brest.fr/ipoc/fr), porté en France par Michel Auffret et au Québec par Michel Fournier, avait pour objectif une meilleure connaissance des réponses biologiques d'espèces-sentinelles aux contraintes environnementales naturelles et d'origine humaine afin d'évaluer la vulnérabilité des écosystèmes aquatiques anthropisés au changement climatique. Dans ce projet, une stratégie de surveillance par une approche écotoxicologique pluridisciplinaire a été développée, associant observations sur le terrain et expérimentations en conditions contrôlées, sur une échelle géographique allant de l'Arctique Canadien aux mers australes (Archipel des Kerguelen) et sur deux espèces-sentinelles communes, la moule bleue et la dreissène. Dans ce contexte, nous avons proposé de suivre le marqueur Cu/Zn-SOD.

a. Suivis chez la moule bleue

Les mesures réalisées dans les branchies des moules bleues de la Baie de Seine ont permis de retrouver les profils précédemment décrits ainsi que des variations saisonnières de niveau d'activité (Fig. 5).

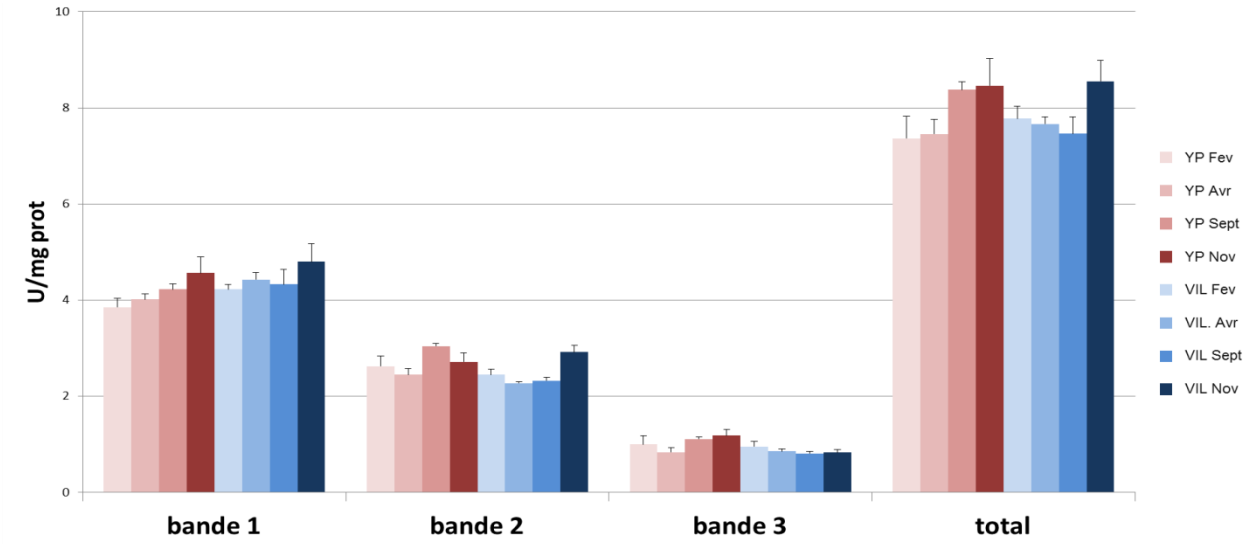



Fig. 5 - Activité Cu-Zn/SOD dans les tissus branchiaux de moules bleues des stations Yport (YP) et Villerville (VIL)

Les deux stations de la Baie de Seine n'ont pas été discriminées par ce marqueur. Ces résultats sont cohérents avec la présence sur les deux sites, Yport et Villerville, de taux comparables en métaux retrouvés dans les tissus des moules prélevées aux mêmes périodes sur ces sites (Fig 6.).

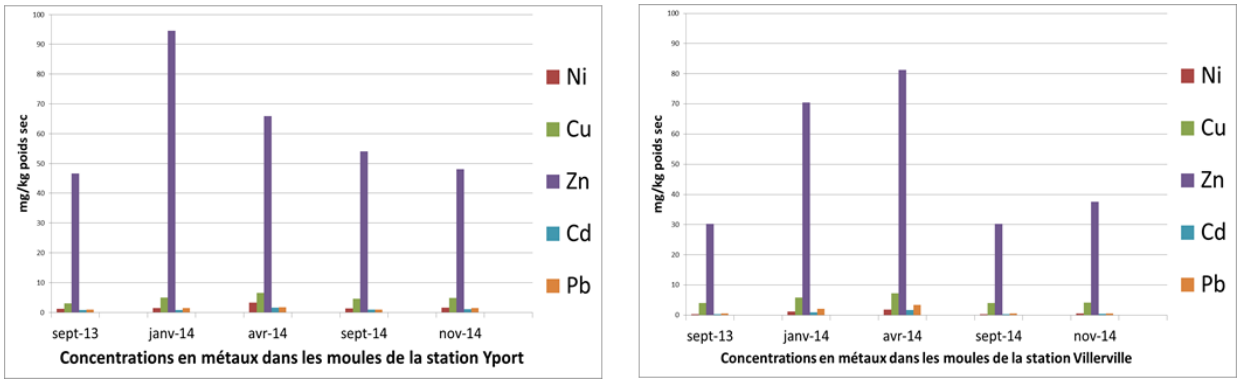



Fig. 6 - Concentration en métaux dans les moules récoltées au niveau de deux stations de la Baie de Seine (Source : rapport de l'ANR IPOC)

Les variations saisonnières sont généralement attribuées à des changements liés au cycle de reproduction et aux fluctuations de la disponibilité en nourriture conduisant à une modification saisonnière du poids corporel et de sa composition.

Dans cette étude, nous avons également entrepris de caractériser la Cu/Zn-SOD chez la sous-espèce de moule bleue *Mytilus edulis desolationis* présente dans l'Archipel des îles

Kerguelen. Les échantillons ont été récoltés au niveau de trois stations, respectivement Baie Norvégienne, Bras Laboureur et Anse des Ecueils (Fig. 7).

La révélation de l'activité dans les branchies montre que la population des moules bleues des Kerguelen présente des profils Cu/Zn-SOD identiques à ceux de la population des moules bleues de la Baie de Seine caractérisés par trois isoformes de mêmes points isoélectriques. De plus les niveaux d'activité Cu/Zn-SOD totaux dans les branchies de ces deux populations sont du même ordre de grandeur (environ 8 mU/mg prot).

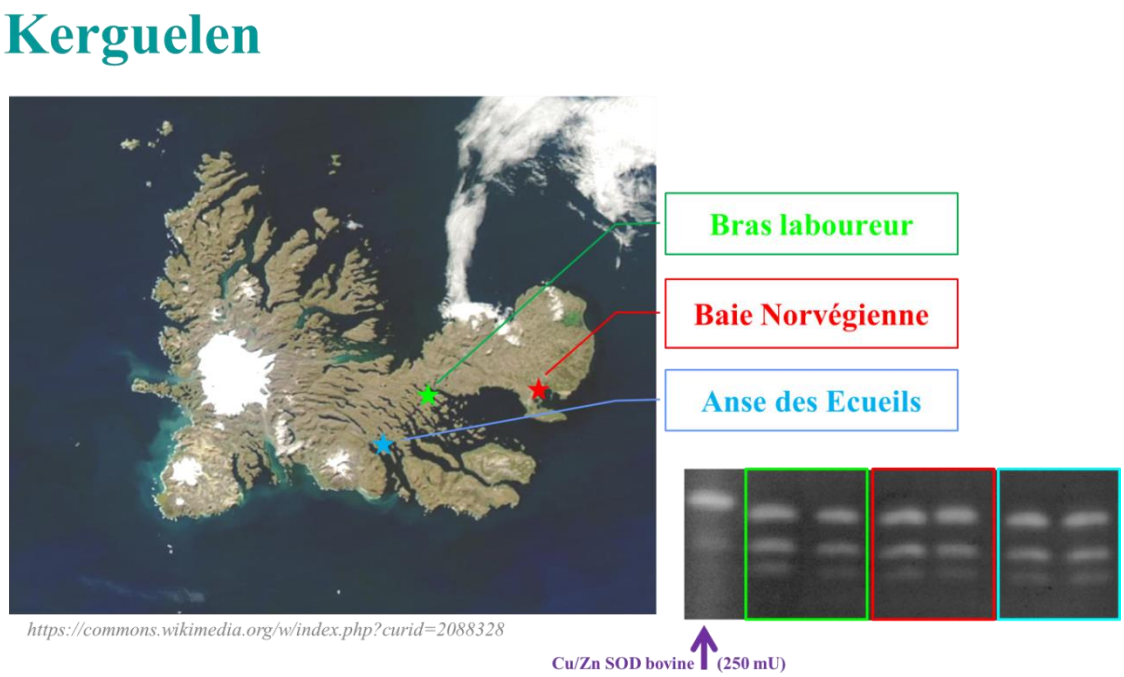



Fig. 7 - Localisation des sites de prélèvement aux Kerguelen et profils Cu/Zn-SOD dans les branchies de moules récoltées au niveau de ces sites

La comparaison des niveaux d'activité totale Cu/Zn-SOD n'a pas fait apparaitre de différence entre les stations alors que l'analyse spécifique de la bande 3 discrimine les stations Baie Norvégienne et Anse des Ecueils (Fig.8). Cette différence est encore plus marquée si on considère la contribution de chaque isoforme à l'activité totale. Les branchies des moules issues de la station Anse des Ecueils présentent ainsi une bande 3 nettement plus faible et, en proportion inverse, une bande 1 plus forte.

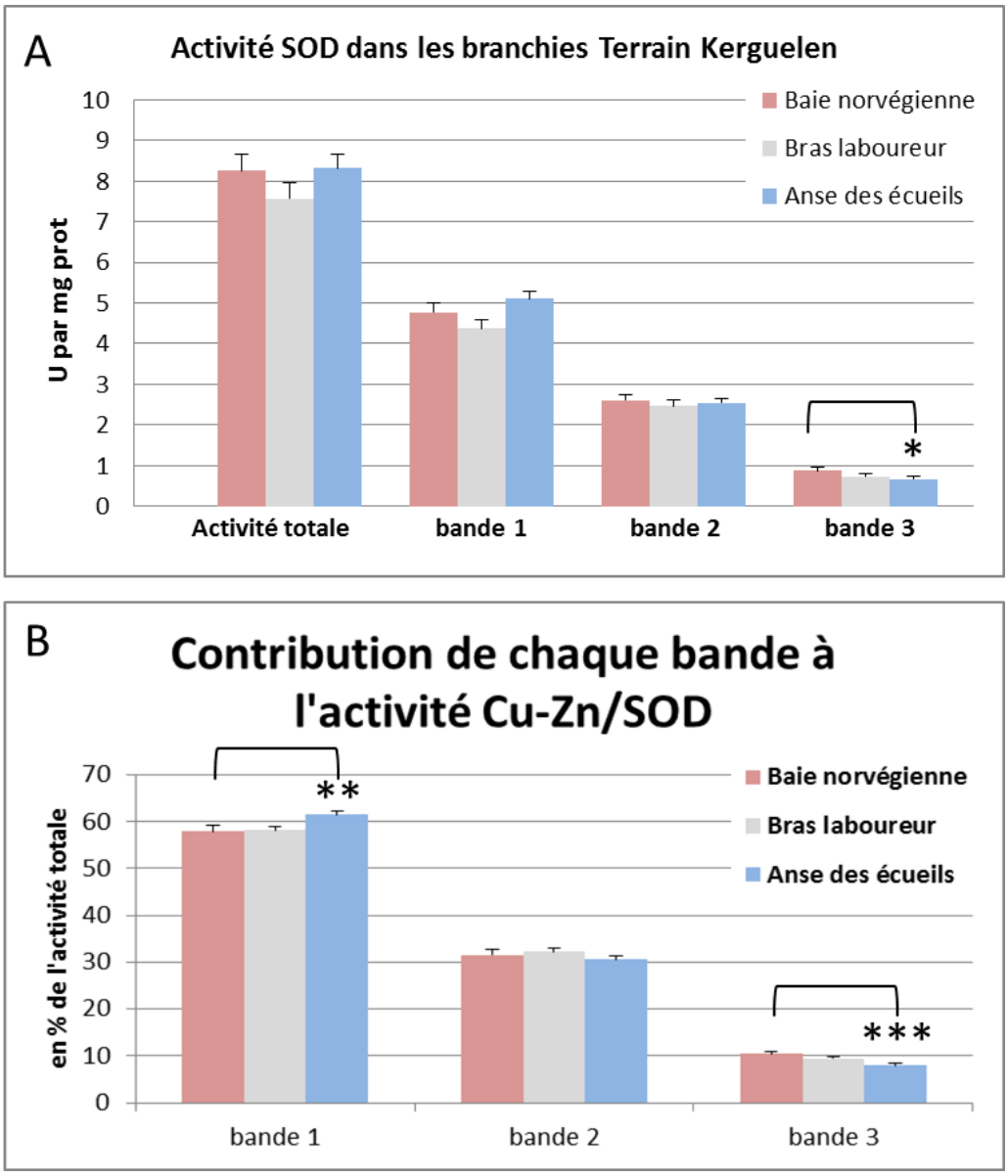



Fig. 8 - Comparaison des niveaux d'activité Cu/Zn-SOD dans les branchies de moules provenant des sites de prélèvements des Kerguelen

Ces résultats sont à rapprocher des analyses chimiques réalisées sur les moules prélevées sur ces mêmes sites et qui mettent en exergue la présence de Pyrène et de chlorobiphényl CB 118 au site Baie Norvégienne, non retrouvée au site Anse des Ecueils. On peut émettre l'hypothèse que cette contamination en HAP et PCB s'accompagne d'une contamination anthropique plus large capable de modifier le patron d'expression de la Cu/Zn-SOD.

A une autre échelle, la comparaison des patrons d'expression entre échantillons des Kerguelen et échantillons de la Baie de Seine, renvoie la même image : en zones côtières très faiblement anthropisées la proportion de la bande 3 est moindre, celle de la bande 1

supérieure et le profil est inversé en zones côtières très fortement anthropisées, suggérant la conversion d'une forme à l'autre en fonction des caractéristiques du milieu, potentiellement par des jeux d'oxydation comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Fig. 9).

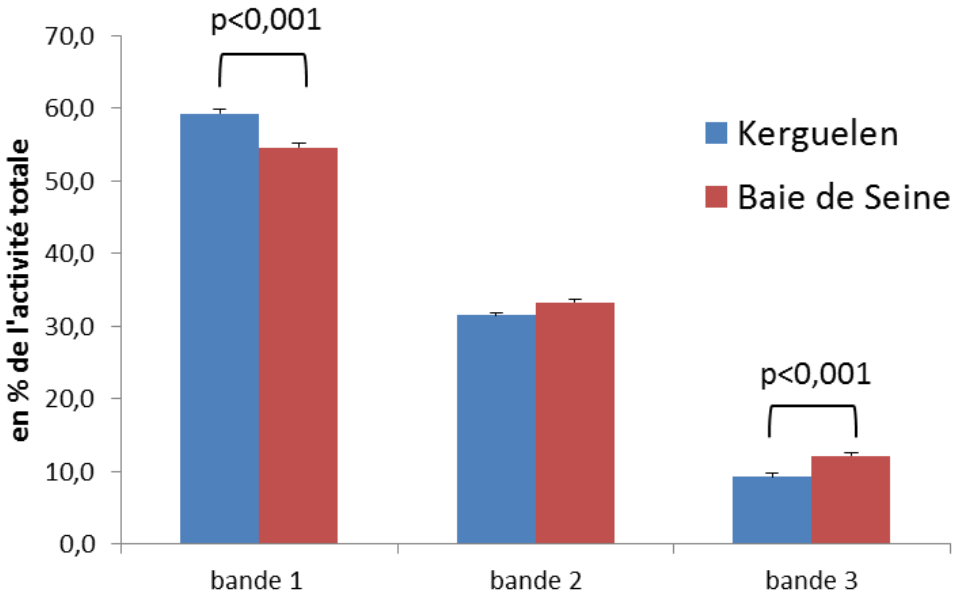



Fig. 9 - Contribution des bandes Cu/Zn-SOD à l'activité totale de l'enzyme dans les branchies de moules provenant des Kerguelen et de la baie de Seine

b. Suivis chez la moule zébrée

Les mesures réalisées dans les branchies et les glandes digestives de dreissènes prélevées en France et au Québec ont révélés des profils beaucoup plus polymorphes que ceux précédemment décrits chez les individus issus de la zone Seine-aval (Fig. 10).

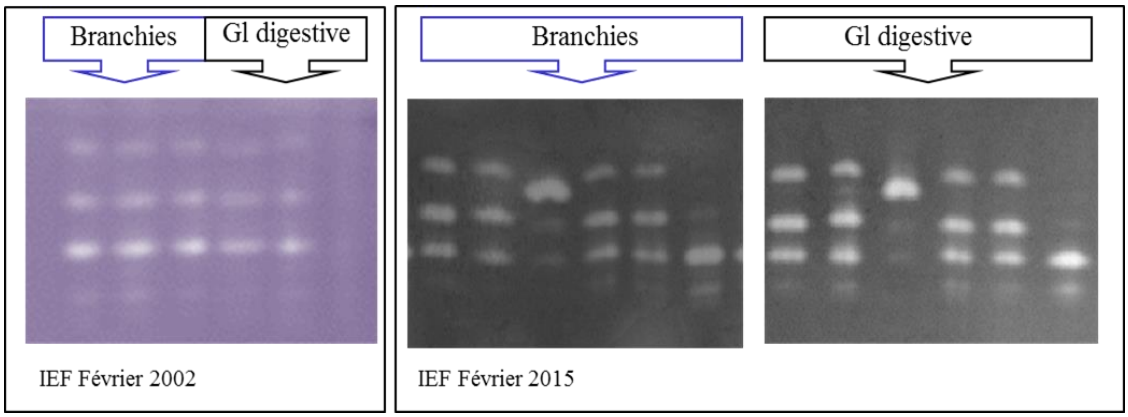



Fig. 10 - Isoformes Cu/Zn-SOD dans les tissus de dreissènes : 2002, Seine ; 2015, Saint-Laurent

De façon étonnante, la comparaison des profils Cu/Zn-SOD réalisées sur des dreissènes issues de différents cours d'eau en France a fait également apparaitre des réponses très contrastées mais cela nous a permis d'interpréter ces réponses *a priori* inattendues.

Classiquement, les populations de dreissènes rencontrées dans les cours d'eau en France correspondaient à l'espèce *Dreissena polymorpha*, la moule zébrée pour laquelle nous avions déjà établi les profils Cu/Zn-SOD caractérisés par plusieurs bandes de pI compris entre 4 et 5. Il semble qu'on assiste actuellement en France, comme cela a déjà été le cas au Québec, à l'invasion d'une nouvelle espèce de dreissène, la moule quagga, *Dreissena rostriformis bugensis* (Potet et al., 2016) pour laquelle nous observions ces profils Cu/Zn-SOD atypiques caractérisés par une bande unique au pI de 4,95. Une analyse par RFLP, réalisée par Elise David, de séquences mitochondriales spécifiques de chaque espèce a permis de confirmer cette hypothèse.

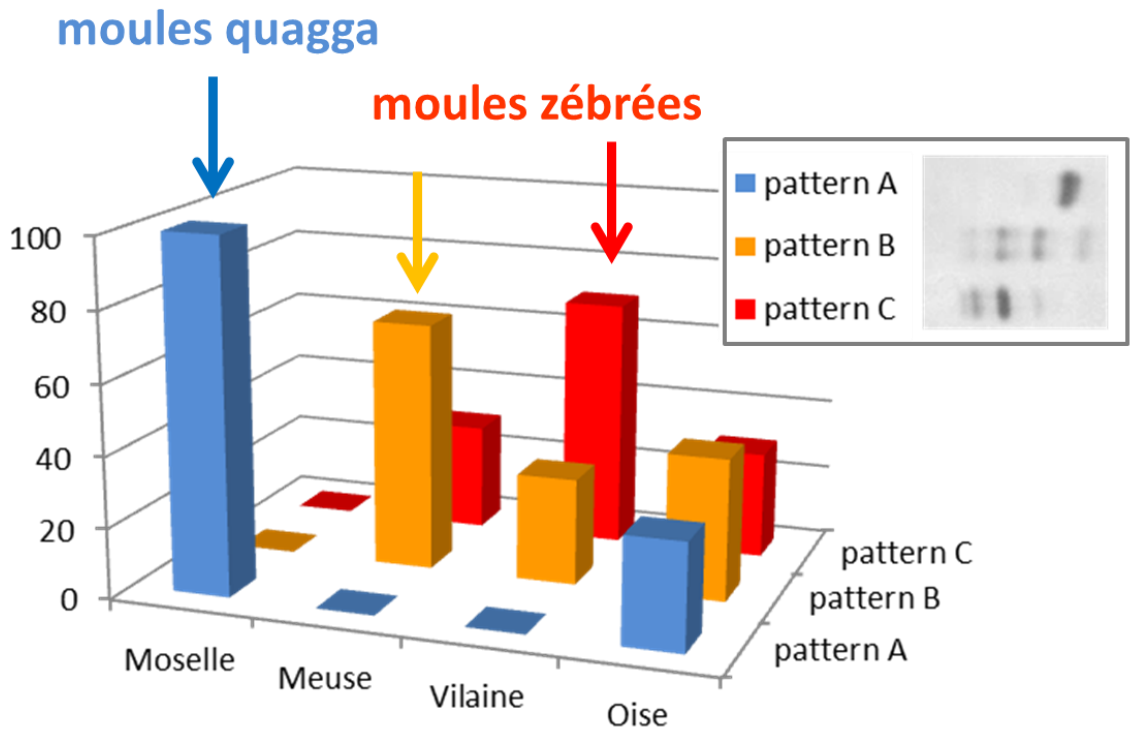



Fig. 11 – la Cu/Zn-SOD comme outil d'identification des moules zébrées et quagga

Ces travaux nous ont permis de proposer une méthode alternative pour discriminer ces deux espèces de dreissènes pouvant s'appliquer a posteriori sur des échantillons déjà préparés pour d'autres mesures enzymatiques par exemple (Fig. 11, AIAT 2016).

# Chapitre 2 : Protéomique

## I. Mise en place d'un pôle protéomique au LEMA

Lors de mon recrutement au sein du LEMA en 1999, j'ai été chargée de mettre en place et de développer la thématique protéomique dans le laboratoire. Les protéines peuvent être les cibles directes des contaminants ou de leurs métabolites, elles peuvent être également, sous l'effet de certains xénobiotiques, induites ou réprimées au niveau génomique. Il est possible de quantifier les protéines de façon ciblée et également, dans le cadre d'une approche ouverte, de procéder à des études globales du protéome (Anderson and Anderson, 1998).

Le suivi des modifications du protéome vise à évaluer, chez des espèces sentinelles modèles, des acteurs protéiques dont l'expression est modifiée sous l'impact de facteurs environnementaux naturels et anthropiques. L'un des objectifs de ces études est de caractériser les protéines qui sont la cible spécifique d'un type particulier de contaminants afin de mieux comprendre les mécanismes d'action du polluant, un autre objectif est d'identifier chez une espèce sentinelle de nouveaux biomarqueurs pouvant servir d'outils dans les diagnostics environnementaux.

Dans un premier temps, l'approche protéomique développée a utilisé la technique d'électrophorèse bidimensionnelle sur gel avec comparaison des empreintes protéomiques, après coloration au bleu colloïdal ou au nitrate d'argent en fonction de la quantité de matériel recueillie. Progressivement le nombre d'espèces retenues pour ces analyses a augmenté, s'élargissant, des espèces sentinelles types, en l'occurrence des mollusques bivalves, *Mytilus edulis* et *Dreissena polymorpha,* au crustacé copépode, *Eurytemora affinis,* espèce prédominante du zooplancton de la zone oligohaline de l'estuaire de la Seine ainsi qu'à deux espèces de poissons : le médaka, *Oryzias latipes* et le bar, *Dicentrarcus labrax,* et à deux espèces de crustacés décapodes : le crabe vert, *Carcinus maenas* et l'étrille, *Necora puber*. Pour chaque nouvelle espèce et nouveau tissu étudié, la préparation et la solubilisation des échantillons - *qui constituent une étape cruciale, déterminant la qualité ultérieure des résultats*- ont nécessité une mise au point, souvent de plusieurs mois, à laquelle j'ai

activement participé (Boulangé-Lecomte et al., 2016; Manduzio et al., 2005; Panchout et al., 2013).

## II. Focus sur le protéome branchial de moules

L'approche protéomique principalement utilisée, la 2DE, restreint le champ d'étude aux protéines les plus abondantes des tissus et à celles qui sont les plus solubles dans les conditions d'extraction utilisées. Il s'agit essentiellement de protéines du cytosquelette, de protéines du métabolisme majeur du tissu étudié, parmi lesquelles de nombreuses enzymes du métabolisme énergétique et de la grande « famille » des protéines intervenant dans le turn-over protéique, que ce soit les protéines ribosomales, les protéines chaperonnes ou les protéines du système d'adressage et de dégradation (voir pour revue : Campos et al., 2012; Tomanek, 2011; Veldhoen et al., 2012).

De fait, si les protéines mises en évidence sont souvent des « déjà-vu », elles demeurent sources d'informations, non seulement dans la mesure où leurs réponses peuvent être très plastiques, mais également parce qu'elles sont susceptibles de subir des modifications post-traductionnelles qui reflètent les changements environnementaux encourus (Braconi et al., 2011; McDonagh et al., 2006). Ainsi, les résultats obtenus sont révélateurs de phénomènes sous-jacents tels des mécanismes de régulations très rapides et sensibles ou des atteintes structurales comme les oxydations qui peuvent servir de signatures de stress (Wang et al., 2009).

### 1. Réalisation d'une cartographie de base chez *Mytilus edulis*

Il nous a paru primordial d'établir un protéome de référence sur lequel appuyer les travaux suivants. En 2015, l'approche par 2DE a conduit à la publication d'une cartographie du protéome branchial de la moule bleue établie en conditions physiologiques non perturbées (Rocher et al., 2015). Sur ce protéome, avec le logiciel d'analyse d'image Delta2D (Decodon©), la trame de spots détectée est d'environ 900 protéoformes dont 200 ont été identifiés par spectrométrie de masse (Fig. 12).

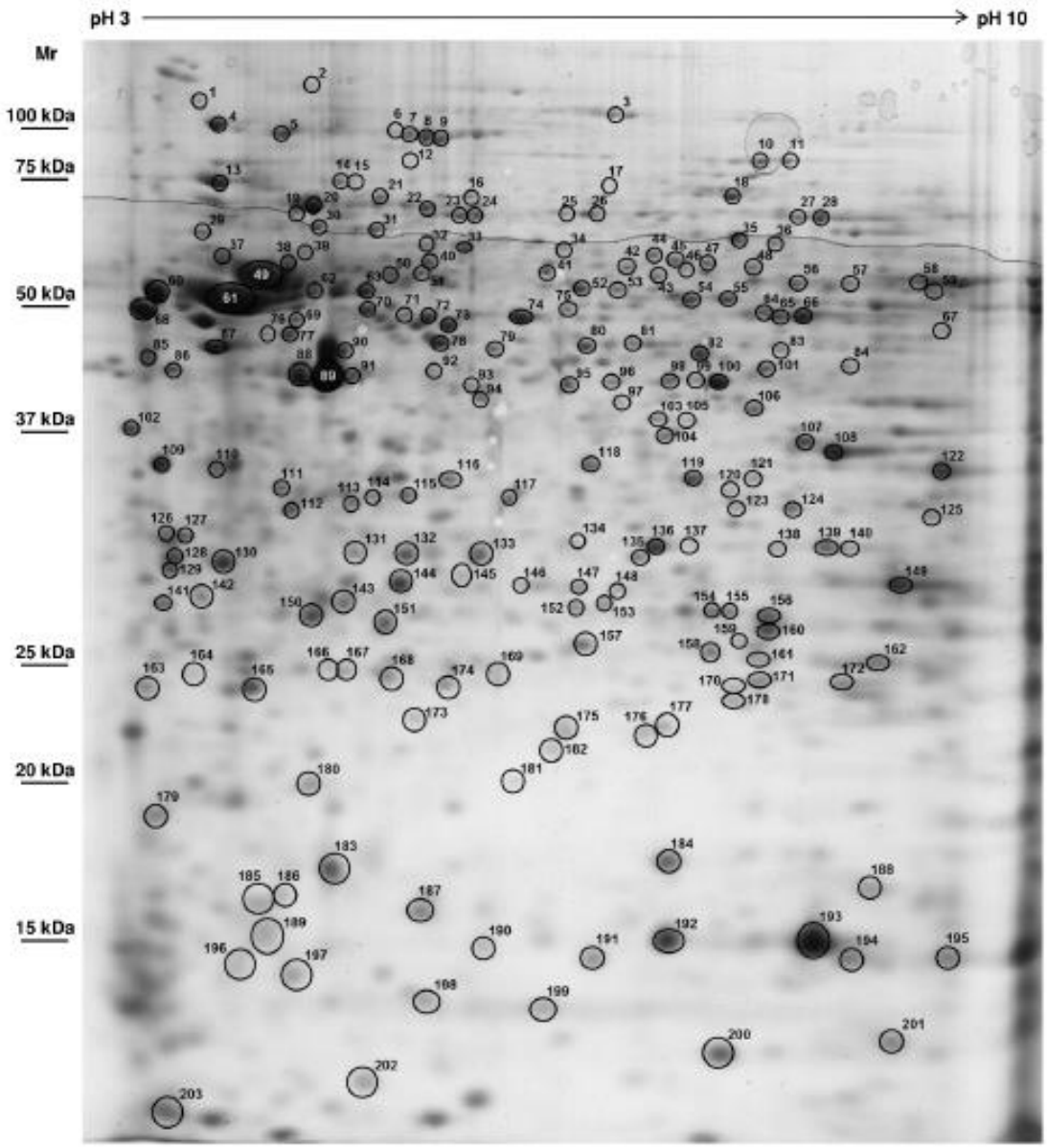



Fig. 12 – Cartographie 2DE du protéome branchiale de la moule bleue (tirée de Rocher *et al,* 2015, Proteomes)

L'attribution des classes fonctionnelles dans le protéome branchial de la moule bleue a été réalisée à l'aide de la classification KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, http://www.genome.jp/kegg). La moitié des protéines identifiées appartiennent à trois classes fonctionnelles : le métabolisme des glucides, le système de repliement, tri et dégradation des protéines et la motilité cellulaire (Fig. 13). Je rassure tout de suite le lecteur il n'est pas question dans ce mémoire de passer en revue l'ensemble de ces identifications, ce serait comme partir dans une exploration dont on n'est pas sûr de revenir vivant mais que j'apprécie personnellement vraiment. Ainsi à seul titre d'exemple, 27 protéoformes correspondant aux

voies de la glycolyse, néoglucogénolyse et au cycle de Krebs ont été mis en évidence. Ces 27 protéoformes correspondent à seulement 12 enzymes différentes, le système de séparation permettant la discrimination des modifications post-traductionnelles.

De façon attendue, de nombreuses protéines en relation avec la nature ciliée de l'épithélium branchial ont été identifiées. Il s'agit d'éléments du cytosquelette qui appartiennent au système d'assemblage et de maintien des cils, comme les tektines, ou encore de la protéine SET, un inhibiteur de phosphatase qui, entre autres fonctions, participe à la régulation du réseau des microtubules des structures ciliées.

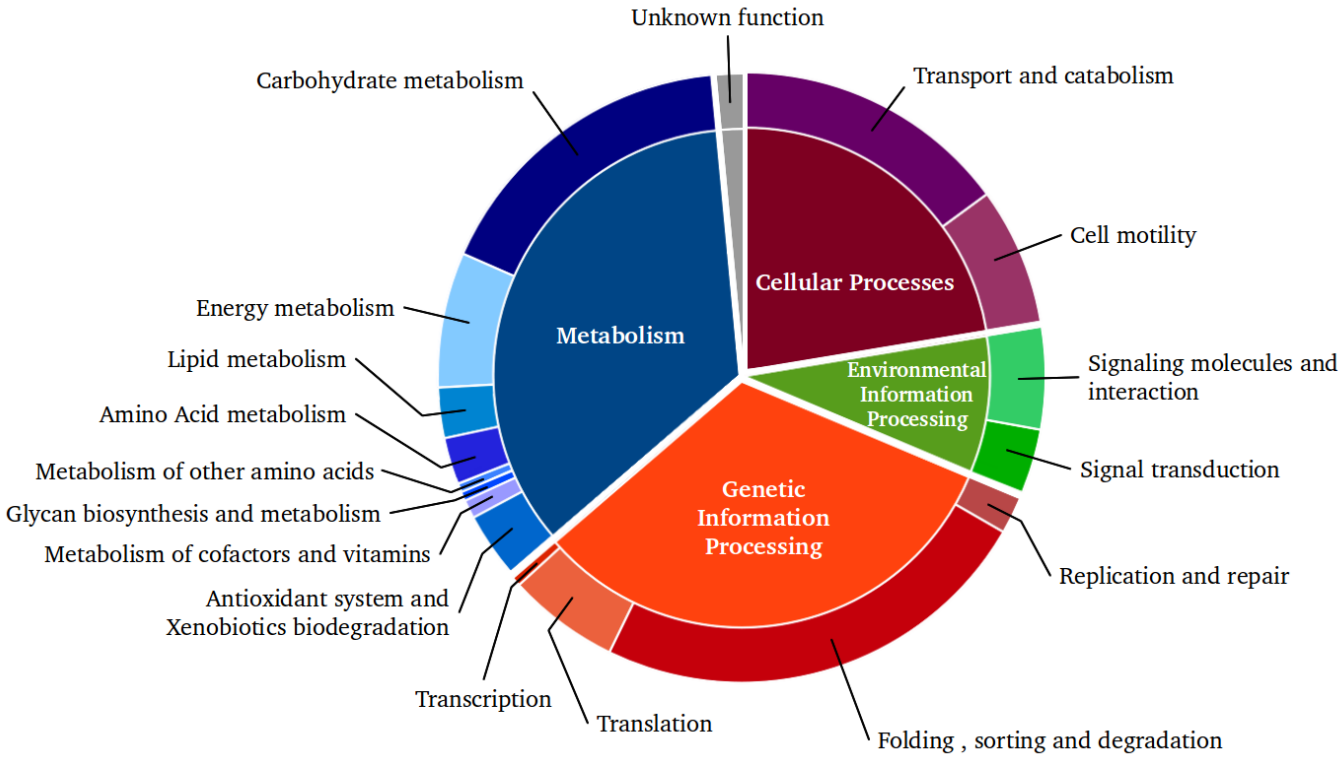



Fig. 13 - Diagramme de distribution fonctionnelle des identifications (tiré de Rocher *et al,* 2015, Proteomes)

Par ailleurs, des acteurs des systèmes de défense cellulaire, dont certains déjà utilisés en tant que biomarqueurs en écotoxicologie, ont été recensés parmi lesquels des glutathion S-transférases, des peroxydases et des superoxydes dismutases.

Pour ma part, j'ai une faiblesse pour la MVP (major vault protein) que nous avons identifiée dès 2008 lors d'une étude portant sur l'impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques sur la moule bleue (communication affichée au congrès 'Pollutant Responses in

Marine Organisms' PRIMO 15, mai 2009). C'est la protéine majoritaire d'assemblages ribonucléoprotéiques qui forment des vaultosomes, structures en arceaux plus grosses que les ribosomes, sortes de cargos assurant des transports entre noyau, cytoplasme et membrane plasmique dont les rôles ne sont pas parfaitement élucidés. Ainsi, la MVP a été localisée à la surface des cellules épithéliales du poumon en cas d'infection par une bactérie pathogène ; elle a été impliquée dans la résistance aux médicaments anti-tumoraux de cellules cancéreuses, d'où un de ses alias, 'lung resistance-related protein' LRP (Banerjee Dixit et al., 2017; Chen et al., 2016; Das et al., 2016; Peng et al., 2016; Wood and Streckfus, 2015).

2. Comparaison des profils protéomiques de deux espèces de dreissènes

La coexistence de la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*, classiquement utilisée comme modèle biologique en écotoxicologie et d'une nouvelle espèce invasive de dreissène, très proche morphologiquement, la moule quagga, *Dreissena rostriformis bugensis*, demande une meilleure connaissance des deux espèces pour une meilleure compréhension de leurs réponses dans les études de biosurveillance environnementale. Pour atteindre cet objectif, dans le cadre du programme PolQua porté par Elise David, nous avons entrepris une étude comparative des protéomes branchiaux d'individus des deux espèces prélevés sur un même site afin de restreindre au maximum la différence d'environnement écophysiologique.

Les premiers résultats ont fait apparaitre une vingtaine de marqueurs distinguant les deux espèces. L'identification de ces marqueurs par spectrométrie de masse est en cours, espérons que la Cu-Zn/SOD soit parmi eux.

## III. Le double enjeu : pollution et changement climatique

De façon générale, l'impact de l'environnement sur le bon état écologique dépend de la qualité du milieu et des pressions environnementales rencontrées. Les variations physico-chimiques et une composition complexe en xénobiotiques forment un ensemble multiparamétrique qui peut exercer des effets additifs voire synergiques ou, à l'inverse, antagonistes. La question de la tolérance des organismes aux effets conjugués des changements de milieu est cruciale, en particulier dans le contexte mondial du changement climatique. Cette question est encore plus incontournable en ce qui concerne les moules bleues prélevées en zones côtières qui subissent quotidiennement une alternance d'émersion-

immersion au rythme des marées. Dans quelle mesure les adaptations comportementales, physiologiques et métaboliques de ces organismes très plastiques sont un atout pour faire face à la pression combinée de la pollution et des changements climatiques ou, au contraire, sont limitants dans la résistance à ces stress combinés. Quel en est le coût énergétique et ses conséquences en termes de taux de mortalité, de reproduction et de développement ? Quel impact cela a-t-il sur les individus et les populations ?

1. Effet conjugué de la pollution et de l'intertidalité

Une étude des effets combinés du contexte écophysiologique et de la contamination chimique a été menée chez des moules bleues placées dans une enceinte climatique reproduisant les conditions du milieu, en particulier les alternances d'immersion/exondation du cycle tidal et soumises à une concentration environnementale d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (phénanthrène 5 µg $L^{-1}$ and benzo[a]pyrène 500 ng $L^{-1}$). Les protéomes branchiaux de moules exposées aux hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été comparés à ceux de moules témoins, respectivement en contexte d'immersion permanente et en contexte intertidal, caractérisé par une alternance d'émersion/ immersion (6h/6h). Ces comparaisons avaient pour but de mieux comprendre l'impact de la condition intertidale sur les mécanismes mis en place pour faire face au stress chimique. Les résultats mettent en évidence des régulations du métabolisme protéique, des défenses cellulaires, des processus de signalisation ou de production d'énergie (Letendre et al. 2011) Pour mémoire, les hydrocarbures aromatiques polycycliques font partie de contaminants présents en grande concentration dans l'environnement et particulièrement dans les eaux côtières de la Manche. Ils possèdent un fort potentiel toxique lié à des propriétés oxydantes et mutagènes ; en effet, leur métabolisation par les cytochromes P450 donne lieu à la formation de métabolites et d'espèces oxygénées très oxydants et réactifs, susceptibles d'entraîner des dommages sur les constituants cellulaires (Martins et al., 2013). De plus, leur nature hydrophobe facilite leur entrée dans les cellules et leur accumulation dans les corps gras des tissus.

La comparaison des réponses à l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques en contexte intertidal et en contexte subtidal donne deux empreintes différentes qui se recouvrent partiellement, ce qui souligne l'importance des conditions de prélèvement pour les études écotoxicologiques de terrain. Plus précisément, presque la moitié des spots dont l'expression est significativement affectée par la contamination est retrouvée dans les deux

situations. D'autre part, la comparaison des réponses à la tidalité en contexte pollué ou en contexte sain, met en évidence un groupe de protéines spécifiquement modifiées dont les acteurs, bien qu'appartenant aux mêmes classes fonctionnelles, peuvent s'avérer différents. A titre d'exemple, on remarque l'induction de protéines régulatrices de l'actine dont la nature change selon le contexte chimique. Il en va ainsi de la destrine et de la gelsoline toutes deux présentant des similarités structurales et fonctionnelles, telle la capacité à réorganiser et transloquer les filaments d'actine dans le noyau en réponse à divers stress ou stimuli (Hatanaka et al., 1996; Kwiatkowski, 1999; McGrath et al., 2017). Ces résultats suggèrent des systèmes redondants dont la régulation permet d'assurer le maintien des mécanismes nécessaires pour faire face à l'alternance émersion/immersion.

2. Effet d'une acclimatation sur la tolérance au stress thermique aigu

Des moules bleues ont été prélevées durant l'été sur deux stations de la Baie de Seine présentant des profils de pollution contrastés, Yport et Le Havre. Elles ont ensuite été soumises, après des périodes d'acclimatation thermique différentes, à un même stress caniculaire. Dans le détail, les animaux ont été placés en microcosmes thermostatés reproduisant le balancement des marées et l'alternance jour/nuit. Après 7 jours d'acclimatation aux conditions de stabulation du laboratoire, les moules ont été conditionnées pendant 7 jours à des températures aériennes différentes : soit représentatives d'un été actuel, soit d'un été à l'horizon 2100 (selon le scénario A1B du GIEC). Dans une dernière étape, les moules ont été soumises à une même canicule de 3 jours avec des pics journaliers de 35°C (Fig. 14, Péden *et al*, 2014).

Aucune différence de mortalité n'a été observée entre les groupes avant la période de stress thermique aigu. Après les 3 jours de canicule, les taux de mortalité dans tous les groupes ont été similaires (inférieurs à 10%) à l'exception notable du groupe d'animaux venant du site havrais acclimaté à des températures représentatives d'un été actuel. Dans ce groupe, le taux de mortalité a atteint les 50%. L'expérience a été refaite et a donné les mêmes résultats.

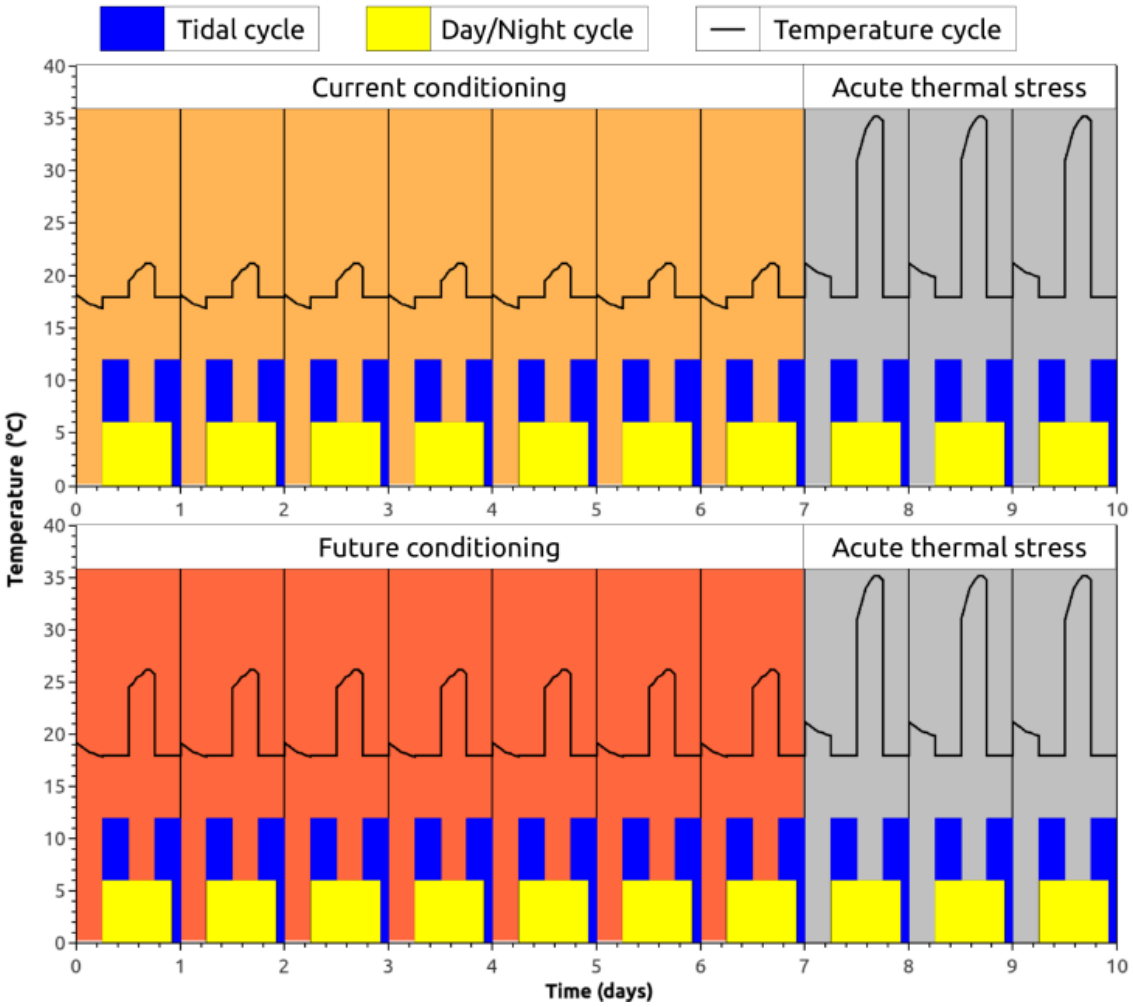



Fig. 14 - Conditions d'expositions en microcosme

Le microcosme reproduit les cycles de marée (bleu) et l'alternance jour/nuit (jaune). Deux groupes de moules ont été acclimatés 7 jours en parallèle à des températures aériennes estivales actuelles (années 2010) ou futures (années 2100, Scénario A1B du GIEC) avant d'être exposés pendant 3 jours à un stress caniculaire. Tiré de Péden *et al.*, 2014, Journal of Xenobiotics.

L'analyse des protéomes branchiaux a permis d'observer de façon attendue, et quel que soit le groupe d'animaux soumis à la canicule, une induction très marquée des protéines de stress thermique, en particulier des HSP70 et des small-HSP24. Parallèlement, une forte sollicitation du métabolisme énergétique a été mise en évidence, avec notamment une diminution des capacités de formation du phosphagène phosphoarginine et une bascule vers un métabolisme plus anaérobie. En particulier, l'analyse des protéines différentiellement exprimées chez les moules issues du site de référence révèle la mise en place de systèmes alternatifs de production d'énergie (fig. 15, Péden *et al.*, 2016).

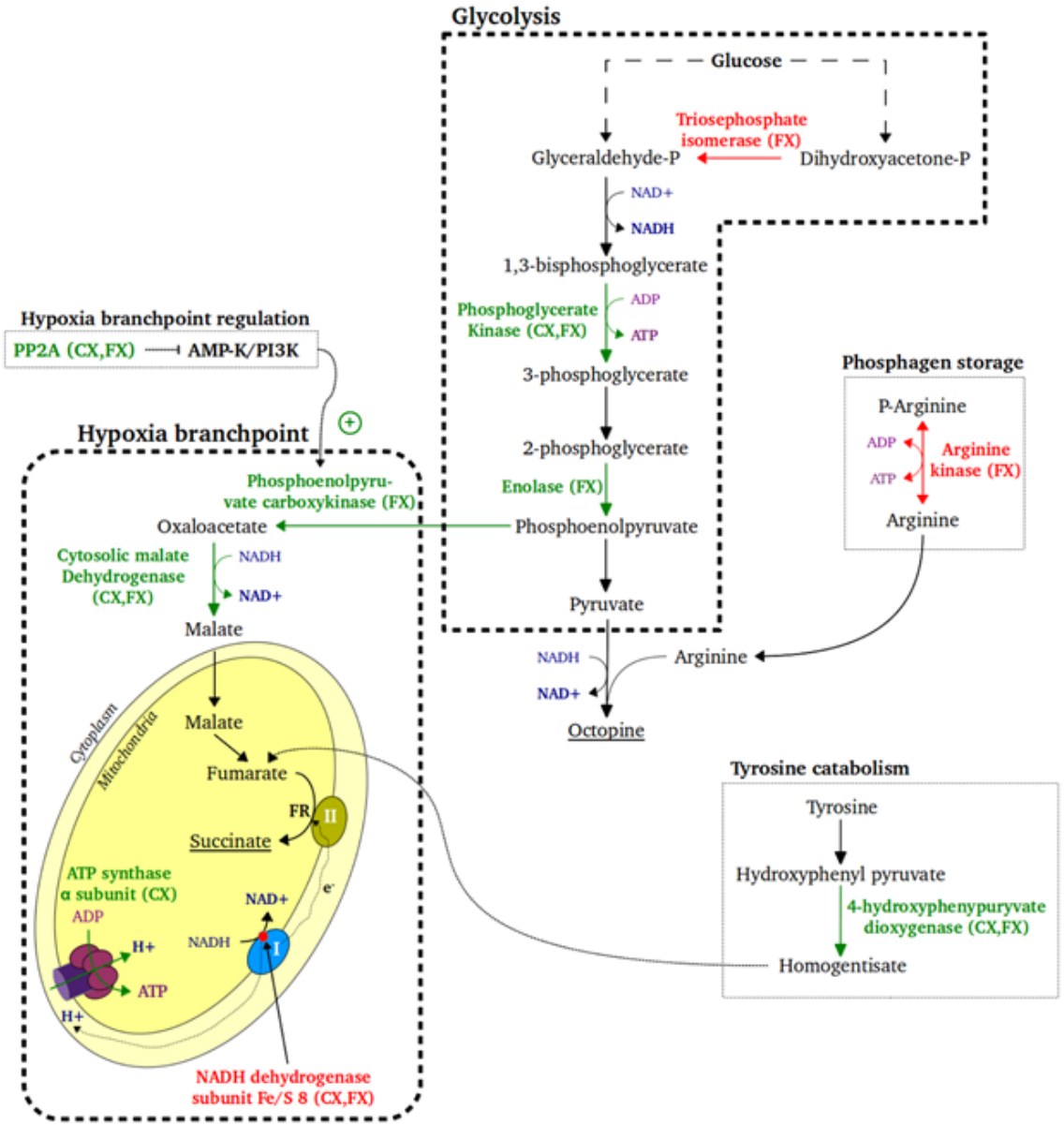



Fig. 15 - Modification du flux métabolique de production d'énergie sous l'effet d'un stress thermique. Les protéines différentiellement exprimées sont en vert dans le cas d'une surexpression et en rouge dans le cas d'une sous-expression. Tiré de Péden *et al.*, 2016, Marine Environmental Research

Au-delà des similitudes, des réponses caractéristiques de chaque conditionnement ont été observées : ces résultats sont en cours de publication. L'ensemble suggère que le maintien de l'activité des branchies en conditions caniculaires est conditionné aux protéines chaperonnes ainsi qu'à une réallocation du système de production d'énergie. De plus, l'étude montre que le stress thermique caniculaire met en jeu des processus de résistance très solliciteurs qui peuvent être dépassés lorsqu'au stress thermique s'ajoute un stress chimique fort. De façon

remarquable, un conditionnement préalable avec une mise en place progressive des processus de résistance thermique restaure les capacités de survie des animaux soumis à un stress chimique fort. Ces travaux soulignent l'importance du trait de vie dans le succès de survie des animaux face au réchauffement climatique.

## IV. Identifications protéiques et données de masse

D'aucun en aurait fait un chapitre à part et ce, de façon tout à fait méritée car l'acquisition et l'analyse des données de masse est primordiale. Simplement elles sont ici le fruit d'une collaboration précieuse avec les collègues de la plateforme IBIS Pissaro dont les compétences ne sont plus à démontrer. Reste que l'interprétation des spectres de masse est une étape cruciale et en constante évolution à mesure que les données de séquençage s'étoffent.

En bref, les spots d'intérêt sont manuellement excisés des gels à l'aide de pointes de cônes stériles et placés dans des microplaques. La digestion automatisée à la trypsine et le traitement au spectromètre de masse sont réalisées sur le plateau technique de la Plateforme protéomique PISSARO IRIB9. L'identification des spectres de masse générés est réalisée d'abord à l'aide du logiciel MASCOT Daemon version 2.2.2 (Matrix Science) en utilisant la banque de données NCBInr 20140824 « other metazoa » (48 094 830 séquences; 17 186 091 396 résidus). Le système KEGG pathway database10 est utilisé pour une première classification fonctionnelle des protéines.

### 1. ProteomeViewer

Depuis mon intégration à l'université du Havre, nous avons mené plusieurs études protéomiques qui chacune a généré un grand nombre de données, à la fois en terme de spectres de masse mais aussi d'analyses d'images. La problématique du stockage et de la récupération/réutilisation de ces données dans le temps est une pierre d'angle dans ce travail. Il s'est agi de pouvoir revenir sur des études précédentes afin d'approfondir notre compréhension des phénomènes rencontrés. De ce fait, il nous est apparu essentiel de développer des stratégies de stockage, de conservation et d'annotation qui renseignent sur l'historique des analyses et maintiennent le lien entre les données d'identification et les contextes de changements d'abondance.

Il existe bien sûr des logiciels qui assurent totalement ou en partie ces fonctions, mais souvent en requérant des licences couteuses ou des mises à jour régulières. Ainsi avons-nous préféré utiliser un programme mis au point par notre collègue, Frédéric Guinand, Professeur à l'Université du Havre et membre du Laboratoire d'Informatique, de Traitement de l'Information et des Systèmes (LITIS). Ce programme, appelé ProteomeViewer par ses initiateurs, François Panchout et Romain Péden alors étudiants en thèse, permet d'accéder directement aux fichiers d'identification des protéines à partir d'une image de gel interactive.

Actuellement, le gel de fusion de l'analyse protéomique associée est celui utilisé comme image source sur laquelle les spots différentiellement exprimés apparaissent avec un cercle coloré interactif : un clic donne accès à une série d'informations concernant les propriétés de la protéoforme (masse, point isoélectrique), la qualité de l'identification (espèce, nombre de peptides identifiés, pourcentage couvert de la séquence, score), les variations d'abondances… Cette version permet aussi d'accéder directement aux fichiers d'identification MASCOT afin d'approfondir les recherches *in silico* (BLAST, recherches de modifications post-traductionnelles). Une option de filtrage et de recherche existe aussi. Cet outil facilite l'archivage des données lourdes issues de l'analyse protéomique 2D et accélère l'accès et le traitement post-identification des fichiers de masses. La figure suivante donne un aperçu de l'interface ProteomeViewer (Fig. 16).

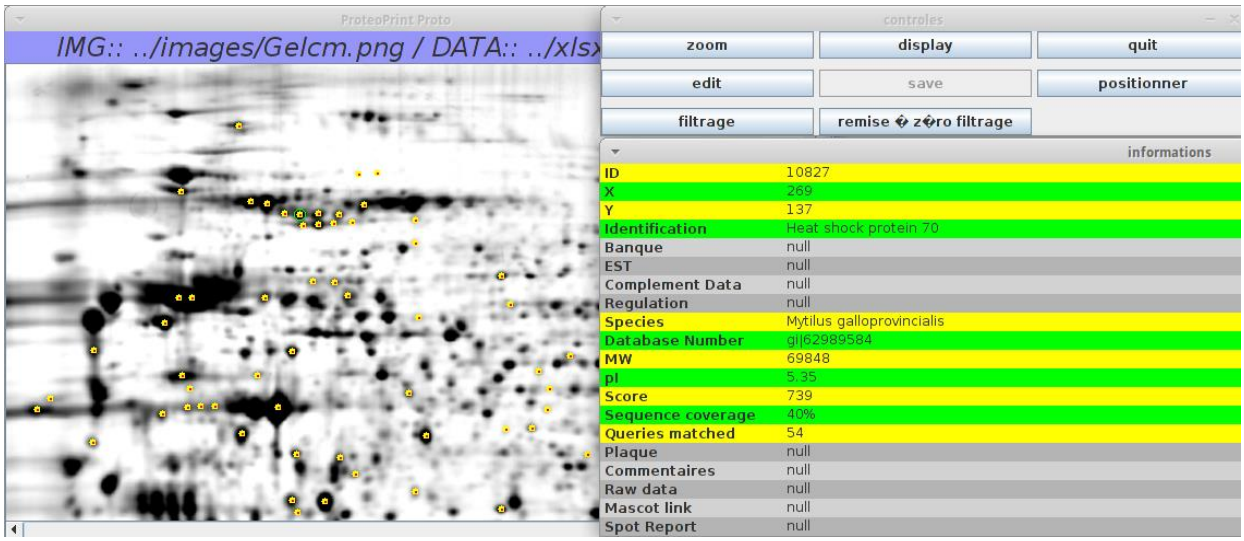



Fig. 16 – Interface du ProteomeViewer (Adapté du mémoire de thèse de Romain Péden, 2016)

2. Des profils de dégradation en signature de stress

Les comparaisons des protéomes branchiaux d'animaux exposés ou non à différents stress chimiques ou physiques ont fait apparaître de façon récurrente des profils caractéristiques. Après analyse par spectrométrie de masse, une partie de ces protéoformes s'avère correspondre à des formes tronquées de protéines identifiées chez *Mytilus edulis* ou chez des espèces proches. Deux cas de figures ont été observées, d'une part une multiplication assez disparate de protéoformes tronquées, suggérant des fragmentations protéiques plus nombreuses ; d'autre part des protéoformes, déjà observés chez les témoins, dont l'abondance diminue sous l'effet d'un stress, suggérant une inhibition d'une voie sélective de dégradation.

Les premières formes fragmentaires concernent en grande majorité des protéines du cytosquelette. De façon générale elles sont plus fréquentes chez les individus issus de conditions environnementales difficiles. Les deuxièmes formes tronquées concernent également des protéines du cytosquelette mais aussi des protéines chaperones.

Pour illustrer ce deuxième cas, la figure suivante présente les profils de 3 spots, tous identifiés comme de la béta-actine mais observés à des poids moléculaires (PM) différents et présentant des variations significative de leur abondance sous l'effet d'un stress (Fig. 17). En A, le spot à 42 kDa correspond à la forme normale de la protéine ; en B et C, les spots sont des protéoformes tronquées, respectivement la partie initiale (B) et la partie finale (C) de la béta-actine. De façon intéressante on remarque que la protéoforme complète voit son abondance augmenter sous l'effet d'un stress alors que le phénomène inverse est observé pour les formes tronquées.

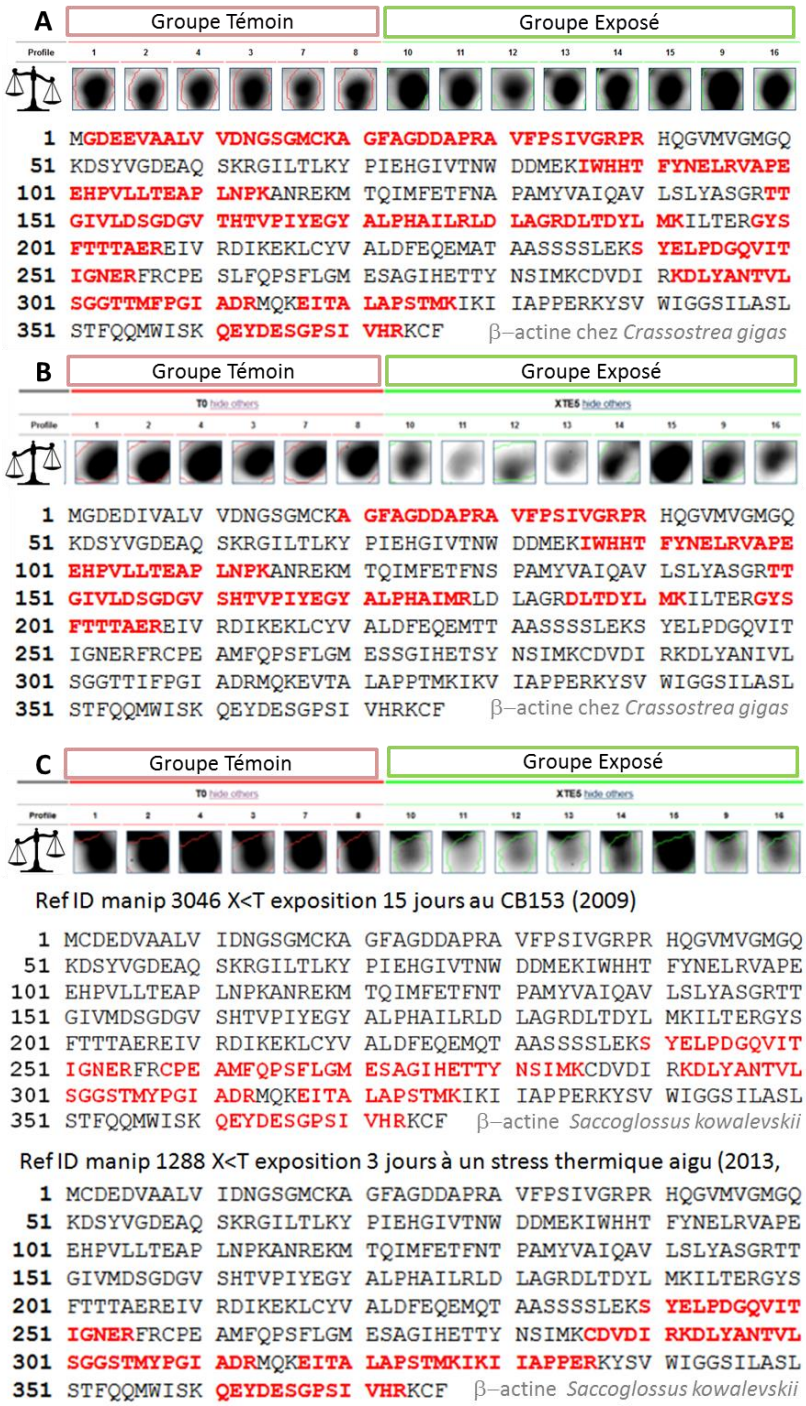



Fig. 17 – Mise en évidence de modifications d'abondance de l'actine (A) et de ses protéoformes tronquées (B et C) sous l'effet d'un stress

De la même manière, deux fragments complémentaires de la forme constitutive de la protéine de choc thermique HSC71 ont été identifiés (Fig. 18). Ces deux fragments sont, à l'inverse de la forme entière, sous-exprimées à la suite d'un stress thermique fort appliqué aux moules.

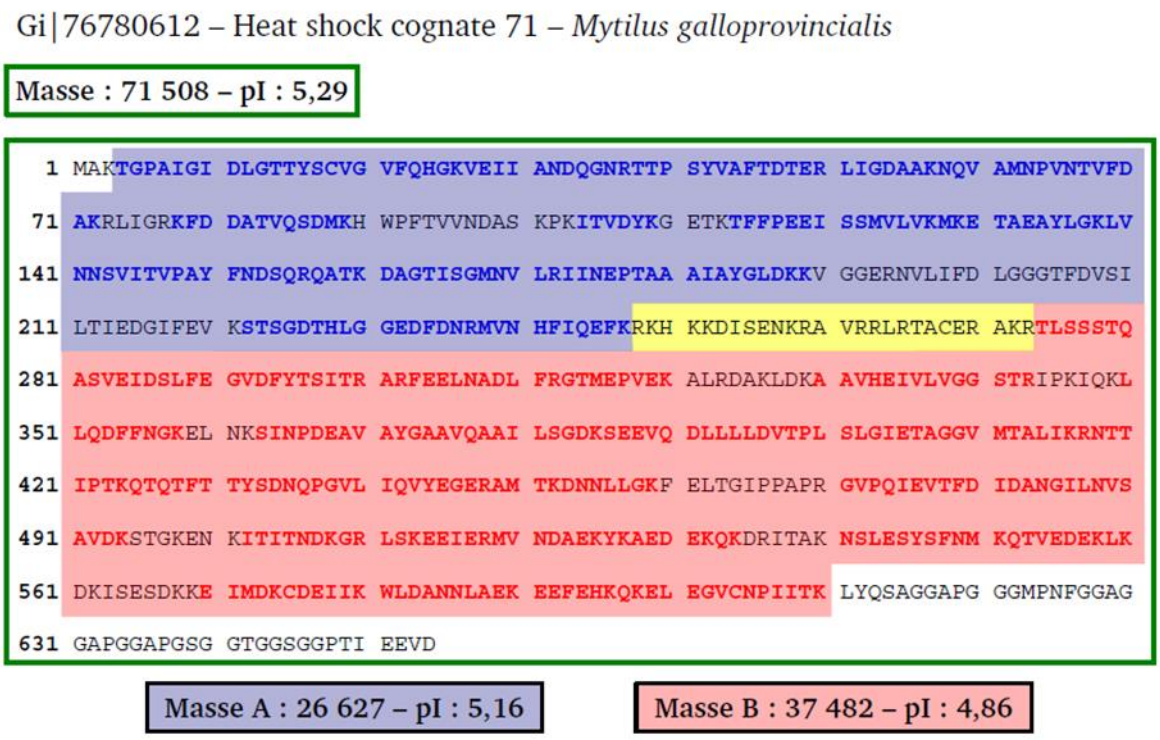



Fig. 18 – Mise en évidence de protéoformes tronquées de la Hsc71 : A, en bleue la partie correspondant au début de la protéine ; B, en rose la partie correspondant à la fin de la protéine (Tiré du mémoire de thèse de Romain Péden, 2016)

L'ensemble de ces résultats suggère un changement d'activité du système de dégradation des protéines que nous allons tenter d'explorer par la suite.

## ❖ Conclusion et perspectives

### Bilan

L'activité de recherche qui a été menée a permis la mise en place d'outils de protéomique au laboratoire, outils qui ont directement été utilisés dans les travaux de thèse de 7 doctorants : Hélène Manduzio, 2004, Kevin Cailleaud, 2006, Julie Letendre, 2009, Ludovic Vicquelin, 2011, François Panchout, 2014, Romain Péden 2016 et Alexandrine Robert, 2017. Ces travaux, financés par des programmes de recherche nationaux et internationaux, sont le résultat de collaborations étroites entre collègues enseignants-chercheurs du laboratoire. Ils ont actuellement donné lieu à 6 publications et plusieurs autres publications sont en préparation**.**

Le développement de la protéomique au laboratoire s'est aussi accompagné de collaborations fructueuses avec des membres extérieurs au laboratoire, notamment avec Philippe Chan, Pascal Cosette, Thierry Jouenne et David Vaudry de l'Université de Rouen ce qui nous a permis de réaliser les analyses en spectrométrie de masse par le biais de la plate-forme IBIS Pissaro. En 2012, dans le cadre du programme INTERREG IVa Dièse, nous avons réalisé les premières analyses protéomiques sans gel (IEF off gel et nanoLC-MS/MS) toujours grâce au plateau technique de la plate-forme IBIS Pissaro.

### Priorités et nouvelles orientations

Les travaux réalisés ces dernières années ont ouvert le champ à de nombreux développements qui, bien que tous soient passionnants et pertinents quant aux objectifs du laboratoire, sont aussi tous très exigeants en termes de temps. Ceci m'amène à recentrer au maximum les projets sur un nombre restreint de modèles, avec en priorité les bivalves *Mytilus sp*. et *Dreissena sp*.

De fait, les empreintes protéomiques analysées ont mis en évidence l'importance des modifications post-traductionnelles dans les mécanismes de résistance et de réponses aux stress. Il s'agit désormais d'analyser de façon plus ciblée ces modifications au sens où elles peuvent modifier le métabolisme rapidement et de façon ciblée, soit un modifiant directement l'activité d'acteurs protéiques cibles, soit en modifiant des sous-localisations cellulaires voire la transcription de gènes.

Le développement des données de séquences par RNAseq devrait nous permettre de mieux comprendre les modifications de protéome observées.

---

L'objectif est d'approfondir l'étude de trois types de modifications :

- les phosphorylations, éléments de régulations majeurs du métabolisme énergétique ;
- la balance polyubiquitination/sumoylation qui participe à l'homéostasie protéique ;
- les oxydations, marqueurs d'effet du stress et potentiellement inducteurs de mécanismes de réparation ou de dégradation.

---

Des formes tronquées de protéines ont été identifiées soulevant différentes questions parmi lesquelles :

- leur mécanisme d'apparition et plus spécifiquement la régulation des protéases impliquées ;
- leur implication comme signal dans la réponse au stress ;
- leur pertinence en tant que marqueurs dans les études environnementales.

---

Par ailleurs, nous allons pouvoir passer à la validation de certains des marqueurs identifiés en protéomique en développant :

- une approche en western blot ;
- des mesures d'activités enzymatiques.

---

A terme, il s'agit d'identifier des outils facilement transposables au terrain, c'est-à-dire applicable à la biosurveillance environnementale.

---

Enfin, les travaux sur la Cu/Zn-superoxyde dismutase seront poursuivis afin de mieux comprendre son rôle de stress sensor ou plus joliment d'alarmine si on accepte ce terme au sens large de molécule participant aux défenses générales de l'organisme et pas seulement aux défenses immunitaires.

Bien évidemment, il s'agira de laisser aussi une place au milieu de tout cela aux mitochondries…

## ❖ Détail des activités de communication scientifique

### Publications

**1.** *Effect of maternaI hyperglycemia on Na,K-A TPase activity in fetal rat kidney*
N. Freund, F. Bost, **B. Prieur,** J. Bismuth, J. P. Geloso and E. Delaval
**Biology of the Neonate 64; 304-309 (1993)** doi.org/10.1159/000244003

**2.** *Perinatal maturation of rat kidney mitochondria*
**B. Prieur,** L. Cordeau-Lossouarn, A. Rötig, J. Bismuth, J. P. Geloso and E. Delaval
**Biochemical Journal 305; 675-680 (1995)** DOI: 10.1042/bj3050675

**3.** *Polyol pathway in rat kidney during the perinatal period* : *effect of hyperglycemia*
N. Freund, **B. Prieur,** J. Bismuth and E. Delaval
**European Journal of Biochemistry 242; 86-89 (1996)** DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.0086r.x

**4.** *Effects of adrenal steroid hormones on mitochondrial maturation during the late fetal period*
**B. Prieur,** J. Bismuth and E. Delaval
**European Journal of Biochemistry 252; 194-199 (1998)** DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2520194.x

**5.** *Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD) in the blue mussel (Mytilus edulis)*
H. Manduzio, T. Monsinjon, **B. Rocher**, F. Leboulenger and C. Galap
**Aquatic Toxicology 64**; **73-83 (2003)** doi.org/10.1016/S0166-445X(03)00026-2

**6.** *Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussel collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase and of glutathione S-transferase*
H. Manduzio, T. Monsinjon, C. Galap, F. Leboulenger and **B. Rocher**
**Aquatic Toxicology 70**; **83-93 (2004)** doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.07.003

**7.** *The point about oxidative stress in bivalves, a review*
H. Manduzio, **B. Rocher**, F. Durand and F. Leboulenger
**Journal of survival Invertebrates 2**; **91-104 (2005)**

**8.** *Proteome modifications of blue mussel (Mytilus edulis* L.) gills as an effect of water pollution
H. Manduzio, P. Cosette, L. Gricourt, T. Jouenne, C. Lenz, O. K. Andersen, F. Leboulenger and **B. Rocher**
**Proteomics 5**; **4958-4963 (2005)** doi:10.3390/proteomes3010003

**9.** *Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River*
**B. Rocher**, Le Goff J., Peluhet L., Briand M., Manduzio H., Gallois J., Devier M.H., Geffard O., Gricourt L., Augagneur S., Budzinski H., Pottier D., Andrée V., Lebailly P. and J. Cachot
**Aquatic Toxicology 79; 65-77 (2006)** DOI : 10.1016/j.aquatox.2006.05.005

**10.** *Differential pattern of the Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel Mytilus edulis*
J. Letendre, B. Chouquet, **B. Rocher**, H. Manduzio, F. Leboulenger and F. Durand **Comparative Biochemistry and Physiology part C, 148; 211-216 (2008)** doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.05.012

**11.** *Impact of toxicant exposure on the proteomic response to intertidal condition Mytilus edulis*
J. Letendre, M. Dupont-Rouzeyrol, A-C. Hanquet, F. Durand, H. Budzinski, P. Chan, D. Vaudry, **B. Rocher** **Comparative Biochemistry and Physiology part D, 6; 357-369 (2011)** doi.org/10.1016/j.cbd.2011.08.002

**12.** *17β-estradiol induces changes in cytokine levels in head kidney and blood of juvenile sea bass (Dicentrarchus labrax, L., 1758*)
F. Seemann, T. Knigge, **B. Rocher**, C. Minier, T. Monsinjon
**Marine Environmental Research 87-88; 44-51 (2013)** doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.03.003

**13.** *Comparison of protein extractions from gills of the shore crab, Carcinus maenas, (L.) and application to 2DE*
F. Panchout, J. Letendre, F. Bultelle, X. Denier, **B. Rocher** , P. Chan, D.Vaudry, F. Durand
**Journal of Biomolecular Techniques, 24(4), 218-223 (2013)** doi: 10.7171/jbt.13-2404-002.

**14.** Impact of heat stress on *Mytilus edulis*: contaminants affect survival and HSP 70 proteoform expression
R. Péden, J. Letendre, **B. Rocher**, F. Durand, F. Le Foll, P. Chan, D Vaudry, F. Bultelle
**Journal of Xenobiotics, 4; 4892 (2014)** doi.org/10.4081/xeno.2014.4892

**15.** A convenient device for xenobiotic dosing and haemolymph sampling in *Carcinus maenas* (Portunidae, Decapoda)
A. Robert, **B. Rocher**, F. Nihoul, T. Monsinjon and T. Knigge
**Journal of Xenobiotics, 4; 4903 (2014**) doi.org/10.4081/xeno.2014.4903

**16.** 2-DE mapping of the Mytilus gill proteome: the usual suspects revisited
**B. Rocher**, J. Letendre, R. Péden, S. Olivier, A. Poret, F. Bultelle, T. Monsinjon, F. Le Foll, P. Chan, D. Vaudry and T. Knigge
**Proteomes, 3; 3-41(2015)** doi:10.3390/proteomes3010003

**17.** Differential protein expression of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* after diuron and alkylphenol exposures

C. Boulangé-Lecomte, **B. Rocher**, K. Cailleaud, P. Cosette, E. Legrand, D. Devreker, H. Budzinski, S. Souissi and J. Forget-Leray

**Environmental Toxicology and Chemistry, 9999, 1-12, (2016)** DOI: 10.1002/etc.3343

**18.** Consequences of acclimation on the resistance to acute thermal stress: Proteomic focus on mussels from a pristine site

R. Péden**, B. Rocher**, S. Olivier, A. Poret, P. Chan, D. Vaudry, F. Le Foll and F. Bultelle

**Marine Environmental Research, 121, 64–73 (2016)** doi:10.1016/j.marenvres.2016.02.006

**19.** Étude du protéome branchial de la moule bleue : vers un outil de surveillance environnemental

F. Bultelle, R. Péden, A. Poret, S. Olivier, P. Chan, D. Vaudry, F. Le Foll, **B. Rocher**

**Spectra Analyse, 314, 53-58 (2017)**

## Actes écrits de congrès

**1.** Aldose *reductase activity in developing rat kidney: effect of hyperglycemia*
E. Delaval, N. Freund, **B. Prieur,** J. Bismuth and J. P. Geloso
**Journal of the American Society of Nephrology 4; 371(1993)**

**2.** *Etude de la cytochrome* c *oxydase dans le rein de rat au cours du développement*
**B. Prieur,** J. Bismuth, J. P. Geloso and E. Delaval
**Néphrologie 15 N°6; 378(1994)**

**3.** *Cytochrome c oxidase expression in rat kidney during the perinatal period*
**B. Prieur,** J. Bismuth and E. Delaval
**Journal of Molecular Medicine (1995) 9; B51 (1995)**

**4.** *Development of sorbitol pathway in rat kidney during the perinatal period*
E. Delaval, N. Freund, **B. Prieur,** J. Bismuth and J. P. Geloso
**Kidney International 47 N°2 ; 678 (1995)**

*Changes in mitochondrial ATPsynthase in the developing rat kidney*
**B. Prieur,** L. Lossouarn, J. Bismuth and E. Delaval
**Kidney International 47 N°2 ; 679 (1995)**

**6.** *Effects of glucocorticoids on mitochondrial pool in rat kidney during the late fetaI age*
**B. Prieur,** J. Bismuth and E. Delaval
**Kidney International 53 N°3; 855 (1998)**

**7.** *Evidence for relationships between enzymatic biomarker responses and pollution loads in mussel species collected along a pollution gradient*
**B. Rocher**, H. Manduzio, O. Geffard, K. Le Menach, L. Peluhet, S. Augagneur, D. Pottier, F. Leboulenger, H. Budzinski & J. Cachot
**Marine Environmental Research,** 62 S363 **(2006)**

**8.** *Differential expression of SOD isoforms in relation to tidal spatiotemporal change in the blue mussel*
Durand F., B. Chouquet, J. Letendre, H. Manduzio, F. Leboulenger & **B. Rocher**
**Marine Environmental Research,** 62 S451 **(2006)**

**9.** *Proteomic responses of a calanoid copepod Eurytemora affinis analysis to organic contaminant exposure: a microcosm study*
Cailleaud K., H. Budzinski, S. Souissi, G. Maillet, **B. Rocher** & J. Forget
**Marine Environmental Research,** 62 S185 **(2006)**

## Communications dans des congrès internationaux

- **Communications orales**

**1.** *Effects of glucocorticoids on mitochondrial pool in rat kidney during the late fetaI age*
**B. Prieur,** J. Bismuth and E. Delaval
**Second European Kidney Research Forum, Baveno, Italie, Avri1 1996**

**2.** *Evidence for relationships between enzymatic biomarker responses and pollution loads in mussel species collected along a pollution gradient*
**B. Rocher**, H. Manduzio, O. Geffard, K. Le Menach, L. Peluhet, S. Augagneur, D. Pottier, F. Leboulenger, H. Budzinski and J. Cachot
**13th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms), Alessandria, Italy, June 2005**

**3.** *Impact of tidal condition on the proteomic response to PAHs exposure in the blue mussel gills*
J. Letendre, M. Dupont-Rouzeyrol, **B. Rocher,** P. Chan, D. Vaudry, F. Leboulenger, Durand F
**15th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms), Bordeaux, France, May 2009**

**4.** *Application of proteomis in marine ecotoxicology: effects of environmental stress on Mytilus edulis 2-DE profil*
J. Letendre, **B. Rocher,** M. Dupont-Rouzeyrol, P. Chan, D. Vaudry, F. Leboulenger, F. Durand
**4th European Summer School in Proteomic Basic, Italy, Brixen/Bressanone, August 2010**

**5.** *Comparison of extraction protocols of gill proteins in the shore crab Carcinus maenas (L.) for 2DE application*
F. Panchout, J. Letendre, **B. Rocher,** F. Leboulenger, F. Durand
**2nd Young Environmental Scientists Meeting (YES meeting, SETAC Europe- Student Advisory Council), Aachen, Allemagne, February 2011**

**6.** *Impact of 17beta-estradiol on the development of sea bass immune system- inluences on cytokine mRNA expression?*
F. Seemann, T. Monsinjon, **B. Rocher**, T. Knigge, C. Minier
**16th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms), Long Beach, USA, May 2011**

**7.** *Effet du stress thermique sur le protéome de Mytilus edulis dans un contexte de réchauffement climatique et de contamination*

Péden R., **Rocher B**., Chan P., Vaudry D., Le Foll F., Bultelle F.

**ECOBIM, Brest, France, May 2014**

**8.** *Neuroendocrine disruption in crustaceans and fish: effects of SSRIs on gene expression, behavior and cardio-ventilatory functions*

Robert A., Bossus M, Lancien F., Kermorgant M., **Rocher B**., Short S. J., Monsinjon T., Le Mével J-C., Ford A. and Knigge T.

**29th ESCBP (European Society for Comparative Physiology and Biochemistry), Glasgow, Scotland, Sept 2014**

**9.** *Proteomic analysis of mytilus edulis gills response to acute heat stress does not reveal effect of differential acclimation*

Péden R., **Rocher B**., Chan P., Poret A., Olivier S., Vaudry D., Le Foll F. and Bultelle F.

**18th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms), Trondheim, Norway, May 2015**

**10.** *Sensibilité des paramètres physiologiques de la moule bleue (Mytilus desolationis) des Îles Kerguelen aux variations environnementales liées au changement global*

Betoulle S., Caza, F., Fraser, M., St-Pierre, Y., Costil, K., **Rocher, B**., Pain-Devin, S., Moraga, D., Auffret, M., Brousseau, P., Fournier, M.

**11ème Colloque annuel du Réseau International ECOBIM, Québec, Canada, 19-22 May 2015**

---

- ## Communications affichées dans des congrès internationaux

---

**1.** *Aldose reductase activity in developing rat kidney: effect of hyperglycemia*

E. Delaval, N. Freund, **B. Prieur,** J. Bismuth and J. P. Geloso

**The American Society of Nephrology, 26th Annual Meeting, Boston, U.S.A., Novembre 1993**

**2.** *Development of sorbitol pathway in rat kidney during the perinatal period*

E. Delaval, N. Freund, **B. Prieur,** J. Bismuth and J. P. Geloso

**First European Kidney Research Forum, Kloster-Banz, Germany, Avril 1994**

**3.** *Changes in mitochondrial ATPsynthase in the developing rat kidney*

**B. Prieur,** L. Lossouarn, J. Bismuth and E. Delaval

**First European Kidney Research Forum, Kloster-Banz, Germany, April 1994**

**4.** *Cytochrome c oxidase expression in rat kidney during the perinatal period*

**B. Prieur,** J. Bismuth and E. Delaval

**First Colloquium on Mitochondria and Myopathies, Halle Saale, Germany, Octobre 1995**

**5.** *Maturation of renal mitochondrial respiration during the perinatal period in the rat*

**B. Prieur,** J. Bismuth and E. Delaval

**Workshop on New Perspectives in Mitochondrial Research, Padova, Italie, Septembre 1997**

**6.** *Proteomic approach to study the effect of water contamination in the blue mussel (Mytilus edulis)*

H. Manduzio, L. Gricourt, **B. Rocher**, C. Galap and F. Leboulenger

**14th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms),, La Pampa, USA, May 2003**

**7.** *Proteomic approach to study the effect of crude oil, PAHs and alkylphenols in the blue mussel (Mytilus edulis)*

H. Manduzio, F. Durand, L. Gricourt, M. Hubert, C. Lange, P. Cosette, T. Jouenne, F. Leboulenger and **B. Rocher**

**Proteomic Forum 2003, Munich, Germany, September 2003**

**8.** *Effect of nonylphenol in the calanoid copepod Eurytemora affinis Proteomic analysis and acetylcholinesterase biomarker*

A.C. Dufour, J. Forget, H. Manduzio, K. Cailleaud, L. Gricourt, F. Leboulenger and **B. Rocher**

**22nd Conference European Society for Comparative Physiology and Biochemistry, Alessandria, Italy, December 2003**

**9.** *Differential expression of SOD isoforms in relation to tidal spatiotemporal change in the blue mussel*

Durand F., B. Chouquet, J. Letendre, H. Manduzio, F. Leboulenger and **B. Rocher**

**13th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms), Alessandria, Italy, June 2005**

**10.** *Proteomic responses of a calanoid copepod Eurytemora affinis analysis to organic contaminant exposure: a microcosm study*

Cailleaud K., H. Budzinski, S. Souissi, G. Maillet**, B. Rocher** and J. Forget

**13th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms), Alessandria, Italy, June 2005**

**11.** *Combined effects of ecophysiological and chemical stresses on the gill proteome of Mytilus edulis*

J. Letendre, M. Dupont-Rouzeyrol, S. Olivier, **B. Rocher**, F. Leboulenger and F. Durand

**SETAC, Varsovie, Poland, May 2008**

**12.** *Change in protein vault expresion after PAH exposure in blue mussel gills*

**B. Rocher,** J. Letendre, M. Dupont-Rouzeyrol, P. Chan, D. Vaudry, F. Leboulenger, Durand F
**15th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms),, Bordeaux, France, May 2009**

**13.** *Ubiquitination of proteins: an insight into protein catabolism in stressed mussels?*
Denier X., **Rocher B.,** Durand F., Letendre J., Poret A., Langlois G., Leboulenger F. and Bultelle F.
**14th ISTA (International Symposium on Toxicity Assessment), Metz, France, September 2009**

**14.** *Comparison of proteomic profiles in gills of shore crabs (Carcinus maenas, L.) from urban and reference sites and variation of polyubiquitinated proteins*
F. Panchout, J. Letendre, X. Denier, F. Bultelle, **B. Rocher,** F. Leboulenger, F. Durand
**SETAC, 22nd Annual Meeting, Berlin, Germany, May 2012**

**15.** *Does contaminated context impact the shore crab (Carcinus maenas, L.) resistance to an additional stress?*
F. Panchout, J. Letendre, F. Bultelle, **B. Rocher,** F. Leboulenger, F. Durand
**SETAC, 22nd Annual Meeting, Berlin, Germany, May 2012**

**16.** *Proteomic analysis of the impact of environmental contamination in Decapods: a comparative approach*
F. Panchout, J. Letendre, R. Péden, F. Bultelle, **B. Rocher,** X. Denier, F. Leboulenger, D. Vaudry, P. Chan, F. Durand
**17th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms),, Faro, Portugal, May 2013**

**17.** *Oestrogen induced changes in the fish pituitary proteome*
J. Letendre, T. Monsinjon, P. Chan, **B. Rocher,** C. Minier, D. Vaudry and T. Knigge
**EUPA, Saint-Malo, France, October 2013**

**18.** *Effect of thermal stress on Mytilus edulis proteome: global warming and contamination context*
R. Péden, **B. Rocher**, P. Chan, D. Vaudry, F. Le Foll and F. Bultelle
**8th European Summer School Advanced Proteomic, Brixen, Italy, August 2014**

**19.** *Cu/Zn-SOD allows a discrimination of the two Dreissena species, the quagga and the zebra mussel*
**B. Rocher** , E. Kerambrun, L. Delahaut**,** S. Pain-Devin, S. Devin, D. Rioult, R. Péden, F. Bultelle and E. David
**18th PRIMO (International symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms),, Trondheim, Norway, May 2015**

**20.** *Réponse moléculaire de populations de moules d'eau douce Dreissena spp. aux paramètres de l'environnement dans quatre rivières françaises*
Kerambrun E., Rioult D., Delahaut L., **Rocher B**., Petiau E., Geffard A., Pain-Devin S., Devin S., Auffret M., David E.

**11ème Colloque annuel du Réseau International ECOBIM, Québec, Canada, 19-22 May 2015**

**21.** *Evaluation of the health status of blue mussels Mytilus edulis from two contrasted sites in the Bay of Seine (Normandy, France): a seasonal, transcriptomic survey*
I. Boutet, K. Costil, A. Seguin, **B. Rocher**, M. Auffret, J.M. Lebel, A. Serpentini
**SETAC, Nantes, France, 22-26 May 2016**

**22.** *Molecular response of mussels Dreissena spp. to contrasted environments: comparison of different French and Canadian populations*
Kerambrun E., Evarist L., Rioult D., Delahaut L., **Rocher B**., Pain-Devin S., Devin S., Cloutier P-L., Desrosier M., Geffard A., Fournier M., Auffret M., David E.
**SETAC, Nantes, France, 22-26 May 2016**

**23.** *Activité Cu-Zn/SOD chez les dreissènes soumises à un stress thermique*
**B. Rocher**, L. Evariste, R. Vaillancourt, E. David, S. Betoulle, M. Fournier, M. Auffret, & F. Bultelle
**12ème Colloque annuel du Réseau International ECOBIM, Le Havre, France, 30 Mai-1er juin 2016**

**24.** *Comparaison des profils d'activité Cu/Zn-SOD chez les moules bleues issues de la Baie de Seine et des îles Kerguelen*
F. Bultelle, E. Petiau, S. Betoulle, A. Seguin, A. Serpentini, K. Costil, Y. Saint-Pierre, F. Caza, I. Boutet, D. Moraga, M. Auffret, P. Brousseau, M. Fournier, J-M. Danger, F. Le Foll & **B. Rocher**
**12ème Colloque annuel du Réseau International ECOBIM, Le Havre, France, 30 Mai-1er juin 2016**

## Communications dans des congrès nationaux

- **Communications orales**

**1.** *Etude de la cytochrome* c *oxydase dans le rein de rat au cours du développement*
**B. Prieur,** J. Bismuth, J. P. Geloso and E. Delaval
**Colloque de Physiologie Rénale, Paris, France, Juin 1994**
**Néphrologie (1994) 15 N°6; 378**

**2**. *Etude du stress oxydant chez Dreissena polymorpha*
H. Manduzio, K. Cailleaud, E. Gacquerel, **B. Rocher**, C. Galap et F. Leboulenger
**6ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Le Havre, Mai 2000**

**3.** *Etude expérimentale de l'action de contaminants sur la dreissène,* Dreissena polymorpha *: mesures d'activités et approche protéomique*
H. Manduzio, **B. Rocher**, C. Galap et F. Leboulenger
**Journées Seine Aval II, Rouen, Octobre 2002**

**4.** *Comparison of extraction protocols of gills proteins in the shore crab* Carcinus maenas *for 2DE application*
Panchout F., Letendre J., **Rocher B**., Leboulenger F., Durand F.
**14ème journée de l'Ecole Doctorale EdN BISE, Le Havre, France, 8-9 juin 2011**

**5.** *The Potential of Perseverance: Analysing of the Proteome of Non-Model Organisms*
T. Knigge, F. Bultelle, P. Chan, P. Cosette, F. Durand, J. Forget-Leray, T. Jouenne, F. Leboulenger, J. Letendre, T. Monsinjon, F. Panchout, R. Péden, D. Vaudry, L.Vicquelin, **B. Rocher**
**SFEAP 2012, Rouen, Octobre 2012**
Conférence invitée, introduction de la session **« Approche protéomique et organismes non-modèles »**

**6.** *Recherche de protéines polyubiquitinylées dans le protéome de décapodes*
Panchout F., Péden R., Letendre J., Bultelle F., Denier X., **Rocher B.,** Durand F.
**8ème journée du Club Jeunes de la SFEAP, Arras, France, 6-8 juin 2012**

**7.** *Escalade de la moule bleue*
*Conférence invitée,* **B. Rocher**, R. Péden, J. Letendre, H. Manduzio, S. Olivier, A. Poret, T. Knigge, T. Monsinjon, F. Durand, F. Le Foll et F. Bultelle
**Journées du Club Jeune de la SFEAP, Toulouse, France, Mai 2014**

**8.** *Mortalité et stress chez* Mytilus edulis *: approche par 2DE*
Péden R., Letendre J., Bultelle F., Denier D., **Rocher B.,** Durand F.

**10ème journée du Club jeune de la SFEAP, Arras, France, juin 2014**

**9.** *Effet du réchauffement climatique sur une espèce clé des milieux intertidaux,* Mytilus edulis *: approche par 2DE*

R. Péden, **B. Rocher,** P. Chan, D. Vaudry, F. Le Foll and F. Bultelle

**SMAP, Lyon, France, 30 juin-2 juillet 2014**

**10.** *La 2DE en eaux troubles*

F. Bultelle, R. Péden, J. Letendre, S. Olivier, A. Poret, F. Durand, F. Le Foll et **B. Rocher**

*Conférence invitée,* **Journées du Club Jeune de la SFEAP, Toulouse, France, Mai 2015**

---

- **Communications affichées dans des congrès nationaux**

---

**1**. *Etude du stress oxydant chez Dreissena polymorpha*

H. Manduzio, K. Cailleaud, E. Gacquerel, **B. Rocher**, C. Galap et F. Leboulenger

**6ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Le Havre, Mai 2000**

**2**. *Caractérisation des isoformes de la Cu/Zn-SOD chez différents bivalves*

H. Manduzio, F. Géret, **B. Rocher**, C. Galap et F. Leboulenger

**8ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Rouen, Juin 2002, (prix du meilleur poster)**

**3**. *Identification of an inducible form of the Cu/Zn-SOD by a modified bidimensional electrophoresis in a marine bivalve the blue mussel (Mytilus edulis)*

H. Manduzio, T. Monsinjon, **B. Rocher**, C. Galap and F. Leboulenger

**Congrès de la Société Fançaise d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Lille, Octobre 2002 (bourse SFEAP)**

**4.** *Etude expérimentale de l'action de contaminants sur la dreissène, Dreissena polymorpha : mesures d'activités et approche protéomique*

H. Manduzio, **B. Rocher**, C. Galap et F. Leboulenger

**Journées Seine Aval II, Rouen, Octobre 2002**

**5.** *Comparaison des empreintes protéomiques chez le copépode Eurytemora affinis : animaux provenant de la Seine et après une décontamination*

A.C. Dufour, H. Manduzio, L. Gricourt, J. Forget, **B. Rocher** and F. Leboulenger

**9ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Rouen, Juin 2003 (prix du meilleur poster)**

**6.** *Etude protéomique des effets d'une contamination de l'eau sur la moule bleue (Mytilus edulis)*
H. Manduzio, L. Gricourt, **B. Rocher**, C. Galap, M. Khalanski and F. Leboulenger
**9ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Rouen, Juin 2003**

**7.** *Ecotoxicologie moléculaire des bivalves : transcriptomique, protéomique et signalisation ionique*
B. Loup, M. Marin, R. Masson, H. Manduzio, G. Maillet, A. Poret, A. Siah, F. Bultelle, F. Le Foll, **B. Rocher** and J-M. Danger
**10ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Dieppe, Juin 2004**

**8.** *Expression spatio-temporelle differentielle des isoformes de la superoxyde dismutase chez la moule bleue*
B. Chouquet, J. Letendre, H. Manduzio, **B. Rocher**, F. Durand et F. Leboulenger
**11ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Rouen, Juin 2005**

**9.** *Etude du protéome de tissus branchiaux chez la Moule bleue (Mytilus edulis L.) exposée au polychlorobyphényle CB153*
T. Charpentier, J. Letendre, **B. Rocher**, F. Durand, D. Vaudry, P. Chan, H. Vaudry et F. Leboulenger
**15ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Rouen, Juin 2009**

**10.** *Modifications d'expression protéique dans les branchies de moules bleues (Mytilus edulis L.) après exposition à un mélange de HAP : focus sur la major vault protein*
J. Letendre, **B. Rocher**, F. Durand, D. Vaudry, P. Chan, H. Vaudry et F. Leboulenger
**15ème journée de l'Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les peptides, Rouen, Juin 2009**

**11.** *Ubiquitinisation dans les branchies d'invertébrés aquatiques en réponse aux stress environnementaux*
F. Bultelle, X. Denier, F. Panchout, J. Letendre, **B. Rocher**, F. Leboulenger, F. Durand
**Séminaire du GDR SER (grand réseau de recherche Science de l'environnement) Gestion et maîtrise des risques, Rouen, France, Février 2011**

**12.** *Comparaison des protocoles d'extraction de protéines de branchies de crabe vert (Carcinus maenas) pour l'électrophorèse bidimentionnelle*
F. Panchout, J. Letendre, **B. Rocher**, F. Leboulenger, F. Durand
**Séminaire du GDR SER (grand réseau de recherche Science de l'environnement) Gestion et maîtrise des risques, Rouen, France, Février 2011**

**13.** *Caractérisation du protéome de branchies de moules bleues en vue d'applications en écotoxicologie marine*
J. Letendre, M. Crétenet, **B. Rocher**, F. Durand, D. Vaudry, P. Chan, F. Leboulenger et C. Minier
**17ème journée de l' IFRMP 23 (Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides), Rouen, 17 Juin 2011**

**14.** *Environmental relevant concentrations of 17-β estradiol: influencing the cytokine mRNA-expression in juvenile Sea Bass (D. labrax)?*
F. Seeman, T. Monsinjon, **B. Rocher**, T. Knigge and C. Minier
**17ème journée de l' IFRMP 23 (Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides), Rouen, 17 Juin 2011**

**15.** *Modulations du protéome d'embryons de médaka japonais, Oryzias latipes, exposés à un sédiment contaminés au fluoranthène*
L. Vicquelin, H. Budzinski, J. Cachot, P. Chan, J. Letendre, K. LeMenach, S. Olivier, **B. Rocher**, D. Vaudry et J. Forget-Leray
**17ème journée de l' IFRMP 23 (Institut Fédératif de Recherche Multidisciplinaire sur les Peptides), Rouen, 17 Juin 2011**

**16.** *Développement d'une approche protéomique chez le crabe vert Carcinus maenas (L.) : mise au point d'un protocole d'extraction de protéines à partir de branchies et révélation des protéines ubiquitinisées*
F. Panchout, J. Letendre, X. Denier, F. Bultelle, **B. Rocher**, F. Leboulenger et F. Durand
**Congrès de la Société Fançaise d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique co-joint à celui de la Spectrométrie de masse, Avignon, Septembre 2011 (SMAP 2011)**

**17.** *Quel est l'impact de la contamination chimique sur les capacités de résistance au stress chez le crabe vert Carcinus maenas (L.) : une approche protéomique*
F. Panchout, J. Letendre, R. Péden, F. Bultelle, **B. Rocher**, X. Denier, Vaudry D., Chan P. et F. Durand
**Congrès de la Société Fançaise d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Rouen, 15-17 Octobre 2012**

**18.** *Effect of thermal stress on Mytilus edulis proteome : global warming and contamination context*
Péden R., **Rocher B.**, Chan P., Vaudry D., Le Foll F., Bultelle F
**17èmes Journées de l'EdNBISE, Avril 2014, Le Havre**

**19.** *Effect of thermal stress on Mytilus edulis proteome : global warming and contamination context*
Péden R., **Rocher B.**, Chan P., Vaudry D., Le Foll F., Bultelle F
**Séminaire du GDR SER (grand réseau de recherche Science de l'environnement) Gestion et maîtrise des risques, Rouen, France, 2014**

**20.** *Acclimatation et Stress caniculaire :focus sur le protéome branchial de moules bleues issues d'un site de référence en baie de Seine*
Péden R., **Rocher B.**, A. Poret, S. Olivier, Chan P., Vaudry D., Le Foll F. et Bultelle F
**Séminaire de la SFR SCALE, Le Havre, France, 23 juin 2015**

**21.** *Perturbations neuroendocriniennes chez le crabe vert, Carcinus maenas : effets de la fluoxetine sur les neuropeptides*

A. Robert, T. Monsinjon, P. Chan, F. Le Foll, S. Olivier, R. Péden, A . Poret, **B. Rocher**, D. Vaudry & T. Knigge

**Séminaire de la SFR SCALE, Le Havre, France, 23 juin 2015**

**22.** *Analyse par 2DE des effets du CB153 sur les branchies de moules bleues*

**Rocher B**., S. Olivier, F. Durand, Chan P., Vaudry D. et Bultelle F.

**Congrès de la Société Française d'Ecotoxicologie Appliquée, Bordeaux, France, Juin/Juillet 2015**

**23.** *Criblage de marqueurs post-traductionnels chez deux bivalves modèles*

Bultelle F, A. Poret, Péden R., Chan P., Vaudry D., Le Foll F. et **Rocher B**.

**Congrès de la Société Française d'Ecotoxicologie Appliquée, Bordeaux, France, Juin/Juillet 2015**

**24.** *Limite de la tolérance thermique chez des moules bleues provenant d'un site fortement impacté par la pollution*

Péden R., **Rocher B**., Chan P., Vaudry D., Le Foll F. et Bultelle F

**Séminaire de la SFR SCALE, Le Havre, France, 10 Mars 2016**

**25.** *Comparaison des signatures protéomiques induites par un stress thermique dans les branchies de moules Mytilus edulis et Mytilus desolationis*

F. Bultelle, S. Betoulle, Y. Saint-Pierre, F. Caza, R. Péden, R. Péden, P. Brousseau, F. Le Foll, J-M. Danger M. Fournier, M. Auffret et **B. Rocher**

**Congrès de la Société Française d'Ecotoxicologie Appliquée, Reims, France, 29-30 Juin 2016**

**26.** *Protéines tronquées, un signal de stress à ne pas négliger ?*

R. Péden, F. Bultelle, F. Guinand, P. Chan, D. Vaudry et **B. Rocher**

**Congrès de la Société Fançaise d'Electrophorèse et d'Analyse Protéomique, Chambéry, 12-16 Oct 2016**

## ❖ Bibliographie


Anderson, N.L., and Anderson, N.G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 19, 1853–1861.

Balaban, R.S., and Mandel, L.J. (1980). Coupling of aerobic metabolism to active ion transport in the kidney. J. Physiol. 304, 331–348.

Banerjee Dixit, A., Sharma, D., Srivastava, A., Banerjee, J., Tripathi, M., Prakash, D., and Sarat Chandra, P. (2017). Upregulation of breast cancer resistance protein and major vault protein in drug resistant epilepsy. Seizure 47, 9–12.

Bastin, J., Delaval, E., Freund, N., Razanoelina, M., Djouadi, F., Bismuth, J., and Geloso, J.P. (1988). Effects of birth on energy metabolism in the rat kidney. Biochem. J. 252, 337–341.

Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44, 276–287.

Bonatto, D. (2007). A systems biology analysis of protein-protein interactions between yeast superoxide dismutases and DNA repair pathways. Free Radic. Biol. Med. 43, 557–567.

Boulangé-Lecomte, C., Rocher, B., Cailleaud, K., Cosette, P., Legrand, E., Devreker, D., Budzinski, H., Souissi, S., and Forget-Leray, J. (2016). Differential protein expression in the estuarine copepod Eurytemora affinis after diuron and alkylphenol exposures. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1860–1871.

Braconi, D., Bernardini, G., and Santucci, A. (2011). Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. J. Proteomics 74, 2324–2337.

Campos, A., Tedesco, S., Vasconcelos, V., and Cristobal, S. (2012). Proteomic research in bivalves: Towards the identification of molecular markers of aquatic pollution. J. Proteomics 75, 4346–4359.

Capaldi, R.A. (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase. Annu. Rev. Biochem. 59, 569–596.

Chen, Y.-L., Yang, T.-Y., Wu, C.-L., Chen, K.-C., Hsu, S.-L., and Hsueh, C.-M. (2016). Mechanisms underlying lung resistance-related protein (LRP)-mediated doxorubicin resistance of non-small cell lung cancer cells. Chin. J. Physiol. 59, 331–347.

Das, D., Wang, Y.-H., Hsieh, C.-Y., and Suzuki, Y.J. (2016). Major vault protein regulates cell growth/survival signaling through oxidative modifications. Cell. Signal. 28, 12–18.

Domart-Coulon, I., Auzoux-Bordenave, S., Doumenc, D., and Khalanski, M. (2000). Cytotoxicity assessment of antibiofouling compounds and by-products in marine bivalve cell cultures. Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA 14, 245–251.

Geloso, J.P., and Basset, J.C. (1974). Role of adrenal glands in development of foetal rat kidney Na-K-ATPase. Pflugers Arch. 348, 105–113.

Hatanaka, H., Ogura, K., Moriyama, K., Ichikawa, S., Yahara, I., and Inagaki, F. (1996). Tertiary Structure of Destrin and Structural Similarity between Two Actin-Regulating Protein Families. Cell 85, 1047–1055.

Jost, A. (1966). Problems of fetal endocrinology: the adrenal glands. Recent Prog. Horm. Res. 22, 541–574.

Kira, Y., Sato, E.F., and Inoue, M. (2002). Association of Cu,Zn-type superoxide dismutase with mitochondria and peroxisomes. Arch. Biochem. Biophys. 399, 96–102.

Kliebenstein, D.J., Monde, R.-A., and Last, R.L. (1998). Superoxide Dismutase in Arabidopsis: An Eclectic Enzyme Family with Disparate Regulation and Protein Localization. Plant Physiol. 118, 637–650.

Kwiatkowski, D.J. (1999). Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. Curr. Opin. Cell Biol. 11, 103–108.

Le Pecheur, M., Bourdon, E., Paly, E., Farout, L., Friguet, B., and London, J. (2005). Oxidized SOD1 alters proteasome activities in vitro and in the cortex of SOD1 overexpressing mice. FEBS Lett. 579, 3613–3618.

Letendre, J. (2009). Effets combinés de l'intertidalité et de la contamination chimique chez Mytilus edulis : Mécanismes enzymatiques anti-oxydants et approche protéomique. mémoire de doctorat. Le Havre.

Letendre, J., Chouquet, B., Rocher, B., Manduzio, H., Leboulenger, F., and Durand, F. (2008). Differential pattern of Cu/Zn superoxide dismutase isoforms in relation to tidal spatio-temporal changes in the blue mussel Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol. CBP 148, 211–216.

Letendre, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Hanquet, A.-C., Durand, F., Budzinski, H., Chan, P., Vaudry, D., and Rocher, B. (2011). Impact of toxicant exposure on the proteomic response to intertidal condition in Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics 6, 357–369.

Liu, H., Zhu, H., Eggers, D.K., Nersissian, A.M., Faull, K.F., Goto, J.J., Ai, J., Sanders-Loehr, J., Gralla, E.B., and Valentine, J.S. (2000). Copper(2+) binding to the surface residue cysteine 111 of His46Arg human copper-zinc superoxide dismutase, a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant. Biochemistry (Mosc.) 39, 8125–8132.

López-Galindo, C., Vargas-Chacoff, L., Nebot, E., Casanueva, J.F., Rubio, D., Mancera, J.M., and Solé, M. (2010). Sublethal responses of the common mussel (Mytilus galloprovincialis) exposed to sodium hypochlorite and Mexel®432 used as antifoulants. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 825–834.

Manduzio, H. (2004). Etude des modifications d'expression protéique sous l'effet d'un stress environnemental chez deux bivalves estuariens, la moule zébrée (Dreissena polymorpha) et la moule bleue (Mytilus edulis) : suivi de marqueurs de défense cellulaire et approche protéomique. mémoire de doctorat. Le Havre.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Rocher, B., Leboulenger, F., and Galap, C. (2003). Characterization of an inducible isoform of the Cu/Zn superoxide dismutase in the blue mussel Mytilus edulis. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 64, 73–83.

Manduzio, H., Monsinjon, T., Galap, C., Leboulenger, F., and Rocher, B. (2004). Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels Mytilus edulis collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 70, 83–93.

Manduzio, H., Cosette, P., Gricourt, L., Jouenne, T., Lenz, C., Andersen, O.-K., Leboulenger, F., and Rocher, B. (2005). Proteome modifications of blue mussel (Mytilus edulis L.) gills as an effect of water pollution. Proteomics 5, 4958–4963.

Martins, M., Costa, P.M., Ferreira, A.M., and Costa, M.H. (2013). Comparative DNA damage and oxidative effects of carcinogenic and non-carcinogenic sediment-bound PAHs in the gills of a bivalve. Aquat. Toxicol. 142–143, 85–95.

McDonagh, B., Tyther, R., and Sheehan, D. (2006). Redox proteomics in the mussel, Mytilus edulis. Mar. Environ. Res. 62, Supplement 1, S101–S104.

McGrath, J., Roy, P., and Perrin, B.J. (2017). Stereocilia morphogenesis and maintenance through regulation of actin stability. Semin. Cell Dev. Biol. 65, 88–95.

Melov, S., Schneider, J.A., Day, B.J., Hinerfeld, D., Coskun, P., Mirra, S.S., Crapo, J.D., and Wallace, D.C. (1998). A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. Nat. Genet. 18, 159–163.

Miao, L., and St Clair, D.K. (2009). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease. Free Radic. Biol. Med. 47, 344–356.

Milani, P., Gagliardi, S., Cova, E., and Cereda, C. (2011). SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. Neurol. Res. Int. 2011, 458427.

Okado-Matsumoto, A., and Fridovich, I. (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. J. Biol. Chem. 276, 38388–38393.

Panchout, F., Letendre, J., Bultelle, F., Denier, X., Rocher, B., Chan, P., Vaudry, D., and Durand, F. (2013). Comparison of protein-extraction methods for gills of the shore crab, Carcinus maenas (L.), and application to 2DE. J. Biomol. Tech. JBT 24, 218–223.

Péden, R., Rocher, B., Chan, P., Vaudry, D., Poret, A., Olivier, S., Le Foll, F., and Bultelle, F. (2016). Consequences of acclimation on the resistance to acute thermal stress: Proteomic focus on mussels from pristine site. Mar. Environ. Res. 121, 64–73.

Péden, R., Letendre, J., Rocher, B., Durand, F., Le Foll, F., Chan, P., Vaudry, D., and Bultelle, F. (2014). Impact of heat stress on Mytilus edulis: contaminants affect survival and HSP 70 proteoform expression | Péden | Journal of Xenobiotics.

Peng, N., Liu, S., Xia, Z., Ren, S., Feng, J., Jing, M., Gao, X., Wiemer, E.A.C., and Zhu, Y. (2016). Inducible Major Vault Protein Plays a Pivotal Role in Double-Stranded RNA- or Virus-Induced Proinflammatory Response. J. Immunol. Baltim. Md 1950 196, 2753–2766.

Potet, M., Devin, S., Pain-Devin, S., Rousselle, P., and Giambérini, L. (2016). Integrated multi-biomarker responses in two dreissenid species following metal and thermal cross-stress. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 218, 39–49.

Prieur, B., Cordeau-Lossouarn, L., Rotig, A., Bismuth, J., Geloso, J.P., and Delaval, E. (1995). Perinatal maturation of rat kidney mitochondria. Biochem. J. 305 ( Pt 2), 675–680.

Prieur, B., Bismuth, J., and Delaval, E. (1998). Effects of adrenal steroid hormones on mitochondrial maturation during the late fetal period. Eur. J. Biochem. 252, 194–199.

Rocher, B., Le Goff, J., Peluhet, L., Briand, M., Manduzio, H., Gallois, J., Devier, M.H., Geffard, O., Gricourt, L., Augagneur, S., et al. (2006). Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. Aquat. Toxicol. Amst. Neth. 79, 65–77.

Rocher, B., Bultelle, F., Chan, P., Foll, F.L., Letendre, J., Monsinjon, T., Olivier, S., Péden, R., Poret, A., Vaudry, D., et al. (2015). 2-DE Mapping of the Blue Mussel Gill Proteome: The Usual Suspects Revisited. Proteomes 3, 3–41.

Sies, H., Berndt, C., and Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. Annu. Rev. Biochem.

Tomanek, L. (2011). Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. Annu. Rev. Mar. Sci. 3, 373–399.

Tsang, C.K., Liu, Y., Thomas, J., Zhang, Y., and Zheng, X.F.S. (2014). Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. Nat. Commun. 5, 3446.

Uchida, K., and Kawakishi, S. (1994). Identification of oxidized histidine generated at the active site of Cu,Zn-superoxide dismutase exposed to H2O2. Selective generation of 2-oxo-histidine at the histidine 118. J. Biol. Chem. 269, 2405–2410.

Veldhoen, N., Ikonomou, M.G., and Helbing, C.C. (2012). Molecular profiling of marine fauna: Integration of omics with environmental assessment of the world's oceans. Ecotoxicol. Environ. Saf. 76, 23–38.

Veltri, K.L., Espiritu, M., and Singh, G. (1990). Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. J. Cell. Physiol. 143, 160–164.

Wang, P., Bouwman, F.G., and Mariman, E.C.M. (2009). Generally detected proteins in comparative proteomics--a matter of cellular stress response? Proteomics 9, 2955–2966.

Wang, Q., Yuan, Z., Wu, H., Liu, F., and Zhao, J. (2013). Molecular characterization of a manganese superoxide dismutase and copper/zinc superoxide dismutase from the mussel Mytilus galloprovincialis. Fish Shellfish Immunol. 34, 1345–1351.

Wood, N., and Streckfus, C.F. (2015). The Expression of Lung Resistance Protein in Saliva: A Novel Prognostic Indicator Protein for Carcinoma of the Breast. Cancer Invest. 33, 510–515.

Yamada, H., Yamada, Y., Adachi, T., Goto, H., Ogasawara, N., Futenma, A., Kitano, M., Miyai, H., Fukatsu, A., Hirano, K., et al. (1997). Polymorphism of extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) gene: relation to the mutation responsible for high EC-SOD level in serum. Jpn. J. Hum. Genet. 42, 353–356.

Yim, M.B., Chock, P.B., and Stadtman, E.R. (1990). Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 87, 5006–5010.

Zapico, S.C., and Ubelaker, D.H. (2013). mtDNA Mutations and Their Role in Aging, Diseases and Forensic Sciences. Aging Dis. 4, 364–380.

Zeinali, F., Homaei, A., and Kamrani, E. (2015). Sources of marine superoxide dismutases: Characteristics and applications. Int. J. Biol. Macromol. 79, 627–637.

Zelko, I.N., Mariani, T.J., and Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Free Radic. Biol. Med. 33, 337–349.