

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

Faculté des Sciences

Département de Biologie Animale

Laboratoire de Biologie Marine

**Induction Expérimentale et Mise au Point d'une Méthode de
Dosage des Métallothionéines chez l'Astérie *Asterias rubens*
(Echinodermata)**

Mémoire présenté en vue
de l'obtention du grade
de Licencié en Sciences Zoologiques

Sébastien JACQUES

Promoteur : Dr. David GILLAN

Septembre, 2002



UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

Faculté des Sciences

Département de Biologie Animale

Laboratoire de Biologie Marine

**Induction Expérimentale et Mise au Point d'une Méthode de
Dosage des Métallothionéines chez l'Astérie *Asterias rubens*
(Echinodermata)**

Mémoire présenté en vue
de l'obtention du grade
de Licencié en Sciences Zoologiques

Promoteur : Dr. David GILLAN

Sébastien JACQUES

Septembre, 2002



Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement le Dr. David Gillan pour m'avoir épaulé et guidé durant cette merveilleuse année. Je le remercie également pour toutes les lectures et relectures de ce travail (Quoi ... encore !!! mais il va le lire combien de fois ! s'écriait ~~Philippe~~ Philippe ☺).

Je remercie également tout autant le professeur Michel Jangoux qui, en m'accueillant dans son laboratoire, m'a permis de travailler dans une ambiance chaleureuse.

De même, je remercie le professeur Philippe Dubois pour ses conseils éclairés et son piquant sens de l'humour.

Je tiens aussi à remercier Robert Vandeloise et le Dr. Séverine Paris-Palacios pour leurs aides et leurs précieux conseils en spectrofluorimétrie.

Un tout grand merci à Phil pour son aide très précieuse lors des dosages de métaux.

Un tout grand merci également à Guillemette, Herwig, Raph et Joan pour leurs aides aussi bien à la récolte et que lors de la dissection des étoiles.

Merci aussi à Patrick et Sonia pour leurs aides lors de mon début en électrophorèse.

Sans oublier Bruno, Geof, Gilles, Didier, Serge, Dev, Delph, Chantal, Viviane, Edith, Guy, Pol, Pol, Ygor, Christine, Patrick, Sonia, Debora, Rebecca et tous les autres membres de Biomar Bruxelles et Mons pour leur compagnie et l'ambiance qui en découle.

Un petit clin d'œil à Caro, Jhoan et Steph pour leur compagnie, leur soutien moral et leurs encouragements lors de cette année qui, pour nous, est le couronnement de 4 années de

Un petit mot aussi pour toutes les personnes qui m'ont supporté et aidé durant ces derniers mois : Ugene, mes frères G., mes parents, ma sœur, AMD duron[®], and last but not least Natasha.

Résumé

Les problèmes environnementaux actuels sont dus en partie aux rejets incontrôlés des activités anthropiques. Malgré une prise de conscience collective, les métaux lourds sont toujours une grande source de pollution marine. Le contrôle de ce type de contamination doit être réalisé par un biomonitoring, et, une espèce adéquate pour la surveillance de la pollution par les métaux lourds dans les écosystèmes côtiers est l'astérie *Asterias rubens*.

Lorsqu'un contaminant entre en contact avec un organisme, ses premiers effets se jouent au niveau sub-cellulaire. Une réponse sub-cellulaire, actuellement beaucoup utilisée en écotoxicologie pour évaluer l'effet des métaux lourds, est l'induction des métallothionéines (MTs), petites protéines complexant les métaux avec une grande affinité. Des protéines semblables ont été observées chez *Asterias rubens* mais doivent encore être caractérisées.

Ce travail consiste à mettre au point une méthode d'évaluation directe, rapide et peu onéreuse capable de doser plusieurs extraits de MTs d'astérie à la fois. Des contaminations expérimentales *in situ* en cadmium et en cuivre ont été réalisées dans le but d'induire (par la nourriture) des MTs chez *Asterias rubens*, et cela à différents stades de maturité sexuelle.

Ce sont les cæcums pyloriques des astéries qui ont été choisis pour la détection de MTs. Une technique mise au point dans ce travail est l'électrophorèse SDS-PAGE, couplée à une analyse densitométrique des bandes. Deux méthodes indirectes (chromatographie et spectrofluorimétrie) ont été utilisées pour valider certaines observations.

Des différences significatives d'intensité de bandes ont été obtenues par la méthode SDS-PAGE choisie, une des plus intéressante étant une augmentation de l'intensité des bandes de 22 à 6 kD pour les astéries contaminées 7 jours au cadmium par rapport aux témoins. La chromatographie a aussi révélé une induction de "MTs" pour une contamination de 42 jours au cadmium. Les résultats obtenus par spectrofluorimétrie sont quant à eux non-conformes à la littérature.

La méthode SDS-PAGE doit encore être améliorée ; il n'y a pas de différence d'intensité de bandes pour les astéries contaminées au cadmium pendant 42 jours, alors que l'induction de "MTs" a été confirmée par chromatographie. Ce défaut peut provenir des étapes de lyophilisation, de carboxyméthylation ou de coloration au bleu de Coomassie. Malgré les trois problèmes soulevés ci-dessus, la méthode électrophorétique SDS-PAGE semble prometteuse pour la détection de MTs. En effet, on peut analyser beaucoup d'échantillons à la fois, en peu de temps, et à moindre coût.

TABLE DES MATIERES

Introduction	p. 7
Avant-propos	
1. Les métaux lourds et l'écotoxicologie	p. 9
2. Les métallothionéines	p. 11
2.1. Définition	
2.2. Régulation et aspects génétiques	p. 15
2.3. Fonction des MTs	
3. Les MTs chez les échinodermes et les astéries	p. 16
4. Méthodes analytiques utilisées pour doser les MTs	p. 17
4.1. Préparation des extraits	
4.2. Dosage des MTs	
4.2.1. Méthodes directes	
4.2.1.1. Immunologie	
4.2.1.2. SDS-PAGE	p. 19
4.2.2. Méthodes indirectes	
But du travail	p. 21
Matériels et méthodes	p. 23
1. Site et dispositif expérimental	
1.1. Le site	
1.2. Le dispositif expérimental	
2. Organismes	p. 25
2.1. Moules	
2.2. Astéries	
3. Contamination des moules et des astéries	p. 27
3.1. Contamination des moules	
3.2. Contamination des astéries	p. 29
4. Dissection des astéries	
5. Extraction des MTs	
6. Dosage des métaux lourds	p. 30

6.1. Etape de minéralisation	
6.2. Configuration du four graphite	p. 31
7. Electrophorèse SDS-PAGE	p. 33
7.1. Carboxyméthylation des MTs avant électrophorèse	
7.2. Préparation des gels de polyacrylamide	
7.2.1. Gel de séparation	p. 35
7.2.1. Gel de concentration	
7.3. Migration	
8. Analyse des gels	p. 37
8.1. Coloration au bleu de Coomassie	
8.2. Observation au GelDoc® 200 de Bio-Rad™	
8.3. Normalisation des données et analyses statistiques	
9. Dosage des protéines	p. 38
10. Chromatographie d'exclusion	
11. Spectrofluorimétrie	p. 41
Résultats	p. 43
1. Echantillonnage	
2. Contamination	p. 45
2.1. Contamination des moules	
2.2. Contamination des astéries	p. 47
3. Electrophorèse SDS-PAGE	p. 49
3.1. Evaluation de la méthode de dosage	
3.2. Analyse des astéries non contaminées	p. 53
3.3. Analyse des astéries contaminées	p. 55
4. Chromatographie	p. 63
5. Spectrofluorimétrie	p. 67
Discussion et conclusions générales	p. 71
Bibliographie	p. 78
Annexe	p. 83

Chapitre I : INTRODUCTION

Avant-propos

Lorsqu'un contaminant entre en contact avec un organisme, ses premiers effets se jouent au niveau sub-cellulaire. Par exemple, par modification de l'intégrité ou de la perméabilité de la membrane cytoplasmique, ainsi que par interaction avec diverses macromolécules cytosoliques. Certaines voies métaboliques essentielles s'en retrouvent ainsi modifiées voire inhibées. Il peut par la suite résulter de ces effets sub-cellulaires divers dysfonctionnements cellulaires et physiologiques pouvant mener à une mortalité plus importante ou à une diminution du potentiel reproductif de l'individu. La mesure de telles réponses au niveau sub-cellulaire peut donc fournir un moyen très sensible pour évaluer l'impact environnemental des polluants et la qualité des eaux. De plus, il est théoriquement possible de mesurer des effets sub-cellulaires avant même qu'ils n'influencent les niveaux d'organisations supérieurs (les niveaux cellulaire, physiologique, individuel, celui de la population et *in fine* celui de la communauté).

Une réponse sub-cellulaire, actuellement beaucoup utilisée en écotoxicologie pour évaluer l'effet des métaux lourds, est l'induction des métallothionéines (MTs), petites protéines complexant certains éléments métalliques comme le cadmium ou le zinc, et ce avec une très grande affinité. Il est de plus en plus évident que l'induction des MTs constitue une réponse directe aux contaminations métalliques de l'environnement. La saturation complète des MTs (le fameux "spillover effect") a été associée à divers processus délétères et a mené au concept d'indicateur précoce ("early-warning indicator") (George & Langston 1994). Dans les cas où des liens de cause à effet ont été établis, il n'est pas difficile de voir la valeur des MTs pour évaluer la santé des individus ou des populations. Par exemple, la saturation des MTs hépatiques chez une espèce de poisson provoque l'inhibition de certaines enzymes membranaires essentiels dans le foie, ce qui peut mener à des problèmes digestifs (George 1989), et chez le polychète *Neanthes arenaceodentata*, l'augmentation du taux de MTs coïncide avec un déclin du potentiel reproductif, ce qui a des répercussions écologiques évidentes (Jenkins & Mason 1988).

Il existe une grande variété de MTs chez les invertébrés. La moule *Mytilus edulis* a par exemple 4 isoformes de MTs de 10 kD et 5 isoformes de 20 kD (Lemoine et al. 2000), alors que l'escargot *Helix pomatia* n'en possède que deux (Dallinger et al. 1997). Les données de la première espèce ne peuvent donc pas être appliquées à l'autre. Il est également important de réaliser que l'induction des MTs ne peut pas être utilisée comme outil écotoxicologique pour tous les organismes. Certaines données concernant des vers et des bivalves suggèrent l'absence de MTs, ou au moins la non induction en réponse à une contamination métallique (Georges & Langston 1994). La méthode de dosage des MTs est également très importante. De nombreux artéfacts peuvent surgir lors de la préparation des MTs, qu'il s'agisse d'une dégradation, d'une oxydation ou d'un déplacement du cadmium complexé par du cuivre. D'une manière générale, avant de pouvoir utiliser l'induction des MTs comme outil écotoxicologique, il est nécessaire de bien connaître la biologie de l'espèce, de réaliser des expériences de contamination expérimentales et de bien choisir sa méthode de dosage.

Asterias rubens, l'astérie qui fait l'objet de ce travail, est une espèce très prometteuse au sujet de ses réponses sub-cellulaires impliquant l'induction des MTs. Non seulement cette espèce semble être un bon bioindicateur de contamination métallique (Temara et al. 1996), et, de plus, certaines études préliminaires ont démontré la présence de MTs et leur inductibilité par certains métaux lourds (Den Besten et al. 1990, Temara et al. 1997). Cependant, de nombreux éléments restent encore inconnus (nombre d'isoformes, séquence protéique, spécificité, type et mode d'induction, etc.) et surtout, aucune méthode de dosage simple permettant de doser de multiples échantillons à la fois n'est disponible.

Dans les pages introductives qui suivent, je ferai tout d'abord quelques considérations générales concernant les métaux lourds et l'écotoxicologie avant d'aborder les métallothionéines en elles-mêmes (définition, rôles et régulation). J'envisagerai par la suite l'état de nos connaissances actuelles sur les MTs d'échinodermes et d'astéries avant d'aborder brièvement les grandes méthodes de dosage des MTs.

1. Les métaux lourds et l'écotoxicologie

Les métaux lourds¹ tel que le zinc, le cuivre et le cadmium sont tous des éléments naturels de la biosphère. Ils proviennent essentiellement de l'érosion, aussi bien mécanique que chimique des roches, du lessivage des sols et des activités volcaniques (Bryan 1984, Laws 1993, Nisbet & Fowler 1995). Il ne faut pas oublier la composante anthropique qui, depuis le début du 19ème siècle, a considérablement accentué la concentration de certains métaux lourds dans l'environnement. Pour la plupart, les différents métaux lourds convergent vers les océans et ce, essentiellement via les cours d'eau. Une fois en milieu marin, la plupart des métaux lourds précipitent suite à l'augmentation de la salinité (Laws 1993, Abel 1991) et se retrouvent principalement dans les sédiments.

Que se soit pour des raisons naturelles ou anthropiques, une augmentation supérieure au bruit de fond (concentrations naturelles usuelles) est appelée contamination. Une contamination ne constitue une pollution que si (1) elle est anthropique et (2) s'il en résulte des effets dommageables pour le milieu, les organismes, la santé humaine, ou les activités humaines (e.g. pêche, tourisme).

Les rejets métalliques anthropiques incontrôlés et abondants ont abouti à de grandes pollutions d'impact majeur. Ainsi pour l'homme, deux exemples japonais tristement célèbres : la maladie de Minamata (empoisonnement de pêcheurs dû au méthylmercure dans les années 50, et qui fit 730 morts et plus de 2000 victimes) et celle d'"Itaï-Itaï" (contamination au cadmium dans les années 40 qui fit plus de 300 victimes, dont 100 morts) ont mené à une prise de conscience du danger généré par ces rejets incontrôlés. De nouvelles lois, disciplines et de nouveaux organismes ont vu le jour afin de mieux réguler et comprendre l'impact des métaux lourds. Parmi ces derniers, l'écotoxicologie est une discipline qui se base sur l'étude des organismes vivants pour déterminer si un biotope est perturbé et si oui de quelle façon.

¹ Le terme métal lourd désigne, dans le présent travail, tout élément du tableau périodique qui présente les propriétés d'éléments métalliques ou semi-métalliques et dont la masse atomique est supérieur à 44. (Warnau 1996)

Il est en effet essentiel de tenir compte des organismes vivants pour déterminer l'état de contamination d'un environnement. Tout d'abord, il est difficile de mesurer directement la concentration d'un métal donné dans l'eau de mer. Sa précipitation et l'effet de dilution font que les concentrations sont généralement de l'ordre du ng ou du $\mu\text{g l}^{-1}$, concentrations limites ou inférieures au seuil de détection analytique actuel. L'hétérogénéité spatiale du milieu aqueux induit une difficulté supplémentaire quant à la validité d'une mesure. La mesure des concentrations en métaux lourds dans les sédiments est plus aisée, mais les métaux lourds dans les sédiments ne sont pas forcément biodisponibles². Cette question a amené les scientifiques à étudier les organismes vivants en parallèle, car ceux-ci et plus particulièrement certains invertébrés, concentrent les métaux efficacement. Le terme de bioindicateur désigne un organisme vivant utilisé pour déterminer la présence, l'abondance et la biodisponibilité des contaminants dans l'environnement par l'intermédiaire des concentrations mesurées dans cet organisme (pris dans sa totalité ou dans un de ses organes et/ou tissus). Selon les critères discutés initialement par Moore (1966) et ultérieurement par d'autres auteurs (pour constituer un outil de qualité et fiable) un bon bioindicateur devrait être :

- Sessile ou sédentaire afin d'être représentatif de la zone étudiée ;
- Largement distribué et abondant dans la zone étudiée, aisément accessible et identifiable taxonomiquement ;
- Présent tout au long de l'année et capable d'être maintenu en vie en laboratoire ;
- De taille suffisante pour permettre l'analyse des contaminants considérés ;
- Un bon accumulateur de métaux et relativement tolérant afin de pouvoir le récolter dans des zones différemment contaminées ;
- Apte à représenter des concentrations métalliques corporelles reflétant celles du milieu, de préférence selon une relation simple.

L'accumulation des métaux lourds dépend énormément du type d'organisme vivant considéré. Certaines espèces accumulent mieux les métaux lourds que d'autres car elles n'ont pas ou peu de moyens d'élimination ; il y a donc bioaccumulation pour ces espèces. La présence de plusieurs espèces bioaccumulatrices le long d'une chaîne trophique a pour résultat une bioamplification (augmentation de la concentration en contaminant à chaque niveau trophique).

² Le terme biodisponible décrit la disponibilité effective de l'élément à être capté par le vivant.

Chez certains organismes l'immobilisation des métaux lourds se réalise par la formation de sphérocristaux, matrice organique limitée par une membrane et complexant les ions bivalents avec des anions phosphates, carbonates ou oxalates (Hopkin 1989). Dans d'autres organismes (comme la moule) les métaux sont accumulés sous forme de granules dans la matrice des lysosomes tertiaires par peroxydation lipidique (Walker et al. 1996). Toutefois, la méthode de détoxification qui semble la plus répandue est assurée par les MTs, petites protéines qui feront l'objet du point suivant.

2. Les métallothionéines

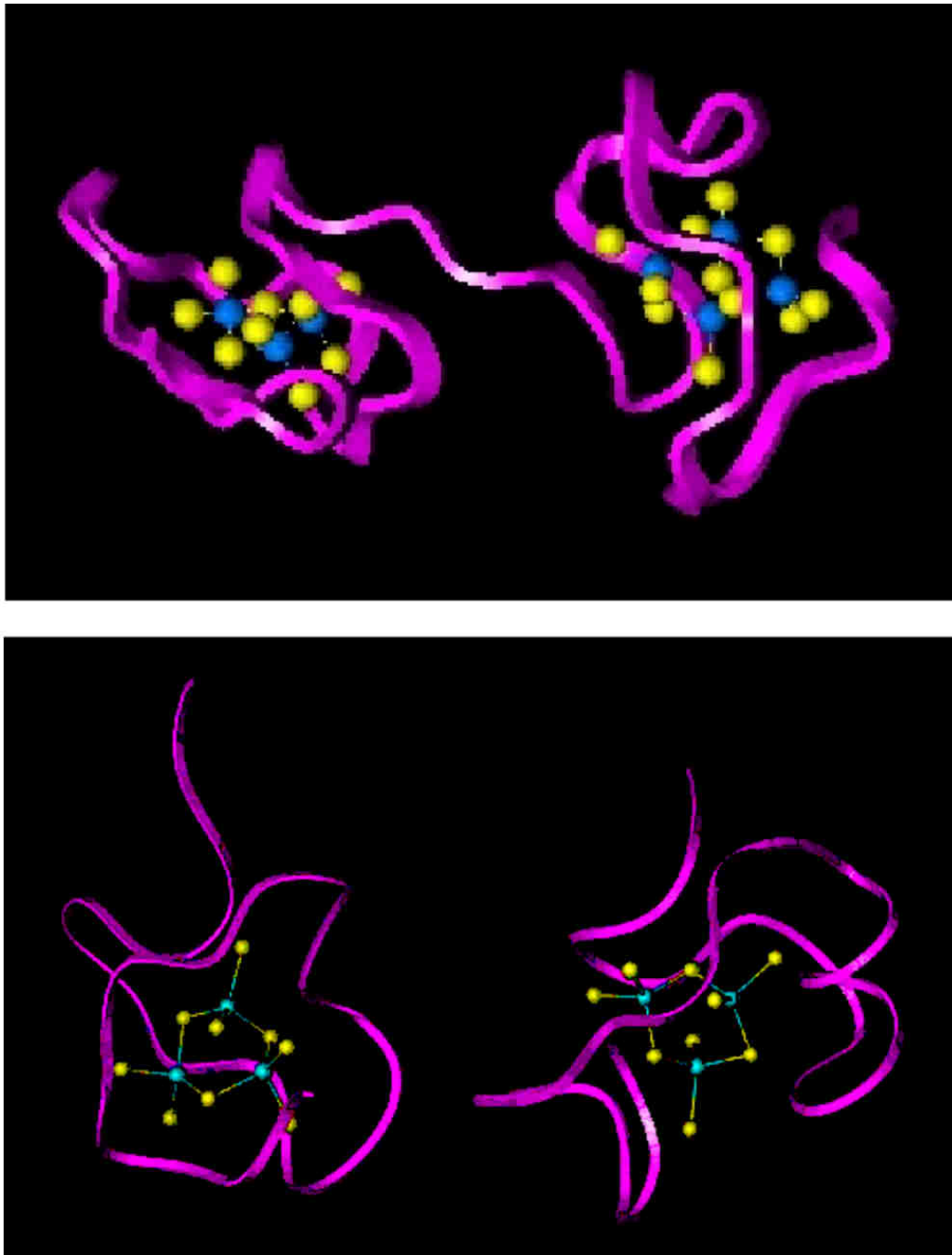
2. 1. Définition

En 1957, Margoshes et Vallee ont isolé du cortex rénal du cheval, une protéine inhabituelle complexant le cadmium. Cette dernière, purifiée, fut nommée métallothionéine (MT) en fonction de son haut contenu en métal et en soufre (Kägi et al. 1974). Sa séquence protéique fut déterminée quelques années plus tard (Kojima et al. 1976). Des MTs, ainsi que d'autres protéines présentant beaucoup de similarités avec les MTs de cheval, ont maintenant été isolées chez une grande quantité d'organismes, incluant les procaryotes, les levures, les champignons, les métaphytes, les mollusques, les crustacés et les vertébrés.

Il a été proposé par Kägi et Nordberg en 1979 que les protéines ayant les mêmes propriétés physiques et chimiques que les MTs de cheval seraient appelées elles-mêmes MTs. Les propriétés les plus importantes sont :

- 1 – un poids moléculaire de 6000 à 7000 Dalton, (lors d'une chromatographie d'exclusion le poids moléculaire apparent est de plus ou moins 10000 Dalton),
- 2 – un haut contenu en métal (sept atomes de cadmium ou de zinc par molécule, douze de cuivre),
- 3 – un taux caractéristique en certains acides aminés (un haut contenu en cystéine (33%) et pas d'acides aminés aromatiques ou d'histidine), et une séquence unique incluant une distribution fixe des cystéines,
- 4 – une absorption caractéristique du complexe SH-cadmium à 250 nm,
- 5 – une résistance à la chaleur.

Fig. 1 : Bien que leurs séquences d'acides aminés soient différentes, les MTs de rat (en haut) et de crabe (en bas) sont semblables dans leurs structures spatiales ; deux groupes d'atomes de Cd (IV) complexés par des cystéines (jaune) sont séparés et entourés par une chaîne polypeptidique. Toutes les cystéines sont impliquées dans la complexation des métaux. Pour le crabe, les deux domaines sont représentés comme entités séparées, car leur orientation relative n'est pas encore connue.



Binz P.-A. & Kägi J.H.R. (1996) poster presentation, *Protein Science* **6**, suppl. 1, p68
(<http://www.unizh.ch/~mtpage/poster/posterevol.html>)

Pour certains groupes d'organismes, la structure des MTs a été étudiée par un ensemble varié de techniques biophysiques et biochimiques incluant l'absorption ultraviolette, la résonance magnétique nucléaire, le séquençage d'acides aminés et la cristallographie (Kägi et al. 1984). (Fig. 1)

Chez les vertébrés, les MTs sont composées de 60 à 68 acides aminés. Elles contiennent 20 cystéines (parfois 21), 19 sont conservées. La séquence de la protéine est divisée en deux domaines, contenant 9 et 11 cystéines, toutes pouvant se lier à respectivement 3 et 4 ions métalliques bivalents. Le gène est quant à lui composé de 3 exons, 2 introns et les sites d'épissage semblent conservés (Roesijadi 1992).

Les MTs sont classifiées en classe I, II ou III en fonction de la localisation des cystéines et de leur mode de synthèse (Fowler et al. 1987) :

- Classe I : Polypeptides dont la position des cystéines est similaire aux MTs du rein de cheval.
- Classe II : Polypeptides dont la position des cystéines est différente de celle des MTs du rein de cheval.
- Classe III : Polypeptides complexant des métaux via des groupes thiols, mais n'étant pas synthétisés par un processus de traduction d'ARN messager. Il s'agit de la cadystine, les phytométallothionéines, les phytochélatines, et la γ -glutamyl-cysteinyl-glycine. Ces substances ont été identifiées chez les plantes et certains champignons.

A ce niveau, il faut noter que de nombreux invertébrés produisent diverses petites protéines, complexant spécifiquement certains métaux et ayant parfois de subtiles différences avec les MTs. Ces protéines ne sont pas encore bien connues et sont parfois difficilement séparables des MTs (Stone and Overnell 1984).

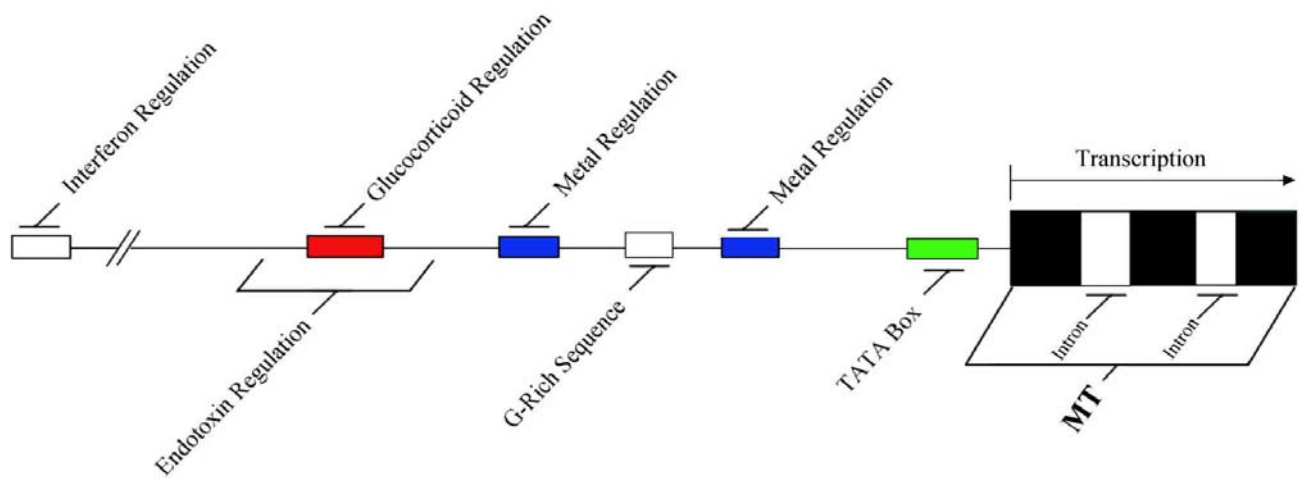


Fig. 2 : Position des éléments régulant la transcription du gène des MTs chez les mammifères.
 (From Hamer, 1986; Harlow et al., 1989)

2. 2. Régulation et aspects génétiques

Plusieurs facteurs, incluant métaux, hormones et interférons, régulent la transcription des MTs (Fig. 2). La présence d'éléments de régulation autres que les métaux, indique que l'expression du gène des MTs est complexe et influencée par des états métaboliques qui ne résultent pas toujours d'une exposition aux métaux (Roesijadi 1992). Par exemple, chez la truite arc-en-ciel, le taux de MTs hépatique fluctue en fonction de l'état gonadique, ceci étant une réponse possible au besoin métabolique en zinc (Olsson et al. 1987). Le stress dû au transport et aux manipulations de laboratoire est aussi connu pour induire les MTs (Baer and Thomas 1990). L'expression de l'ARNm des MTs est régulée en fonction du développement chez les oursins (Wilkinson and Nemer 1987) et les poissons (Olsson et al. 1990).

2. 3. Fonction des MTs

La fonction des MTs, encore énigmatique, serait de jouer un rôle dans la régulation intracellulaire des métaux lourds. La première découverte des MTs étant corrélée à son haut contenu en cadmium, on lui avait donc assimilé un rôle de détoxification vis-à-vis de ce dernier. Pourtant, le contenu en métal des MTs purifiées est très variable et dépend des organismes, des tissus et de l'histoire d'exposition aux métaux lourds. Par exemple les MTs extraites d'un foie humain ont un haut contenu en zinc tandis que dans le même individu, les MTs isolées dans le rein contiennent du cadmium et du cuivre. Ces différences sont probablement dues à l'exposition différente des organes aux métaux lourds mais aussi à l'expression de différentes isoformes de MTs.

Aujourd'hui, sachant que les MTs se retrouvent dans quasi tous les organismes et qu'elles complexent des métaux tels que le zinc et le cuivre, son rôle au niveau cellulaire serait plus en rapport avec un métabolisme général des métaux (essentiels ou non essentiels) pour l'organisme.

3. Les MTs chez les échinodermes et les astéries

Chez les Echinodermes, les séquences des MTs de cinq oursins sont connues. Il s'agit de *Lytechinus pictus*, de *Paracentrotus lividus*, de *Sphaerechinus granularis*, de *Sterechinus neumayeri* et de *Strongylocentrotus purpuratus* (Nemer et al. 1985, Wilkinson and Nemer 1987). D'après ces séquences, les MTs des échinodermes font partie des MTs de classe II, car les séquences présentent des inversions par rapport aux MTs du rein de cheval. Les MTs des oursins sont composées de 64 à 67 acides aminés ; elles contiennent 20 cystéines; la protéine est divisée en deux domaines contenant chacun 9 et 11 cystéines pouvant complexer 3 et 4 ions métalliques bivalents (Binz 2002).

En ce qui concerne les astéries, aucune séquence de MT n'est actuellement connue. Une protéine de faible poids moléculaire, complexant les métaux, résistant à la chaleur et riche en thiols a été détectée dans les caecums pyloriques d'*Asterias rubens* (Den Besten et al. 1990, Temara et al. 1997), mais il reste encore à démontrer qu'il s'agisse d'une MT. En effet, son poids moléculaire exact et sa séquence sont inconnus et on n'a pas encore observé la haute absorbance du complexe métal-SH à 254/280 nm (Viarengo and Nott 1993). On sait également qu'une exposition de 30 jours dans de l'eau de mer contaminée à 20 µg/l de cadmium provoque un doublement de la concentration de cette protéine (Temara et al. 1997). Il a été suggéré (Temara et al. 1997) que cette "MT", aurait une masse moléculaire apparente de 13 et 22 kD, ce qui pourrait impliquer une forme monomère et dimère chez les astéries.

4. Méthodes analytiques utilisées pour doser les MTs

4. 1. Préparation d'extraits

Avant de pouvoir doser les MTs dans un organisme, il faut réaliser un extrait. Pour cela, il faut d'abord choisir l'organe approprié, car tous les organes ne contiennent pas la même quantité de MTs. L'extraction doit être réalisée en un minimum d'étapes pour éviter les pertes. En ce qui concerne les MTs, l'organe est généralement broyé dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases (comme le PMSF) et des anti-oxydants (β -mercaptoethanol) pour protéger les groupes sulfhydryles (groupes $-SH$ provenant des cystéines). Ensuite on se base sur la stabilité thermique des MTs pour purifier les extraits (ceux-ci sont généralement chauffés quelques minutes à $100^{\circ}C$, ce qui provoque la précipitation de beaucoup de protéines mais pas des MTs). On peut également se baser sur la taille des MTs et utiliser des solvants organiques comme l'éthanol ou l'acétone.

4. 2. Dosage des MTs

4.2.1. Méthodes directes

Dans les méthodes de dosages dites 'directes', la chaîne polypeptidique des MTs est identifiée et dosée directement via une réaction colorée. Il n'est généralement pas nécessaire de purifier de façon extrême car la spécificité est obtenue par l'emploi d'anticorps dans les méthodes immunologiques ou par la taille dans les méthodes électrophorétiques (SDS-PAGE).

4.2.1.1. Immunologie

Cette technique fait appel à l'utilisation d'anti-corps spécifiques aux MTs. (Un anti-corps est conçu pour qu'une de ses terminaisons soit spécifique à la protéine recherchée et la seconde à un agent de marquage [Fluorescent, radioactif, ...]). Le problème de cette méthode de dosage est l'obtention d'anti-corps spécifiques, mais il n'en reste que c'est la méthode la plus sensible (pouvant détecter des concentrations de MTs de l'ordre du pico-gramme) et surtout la plus spécifique.

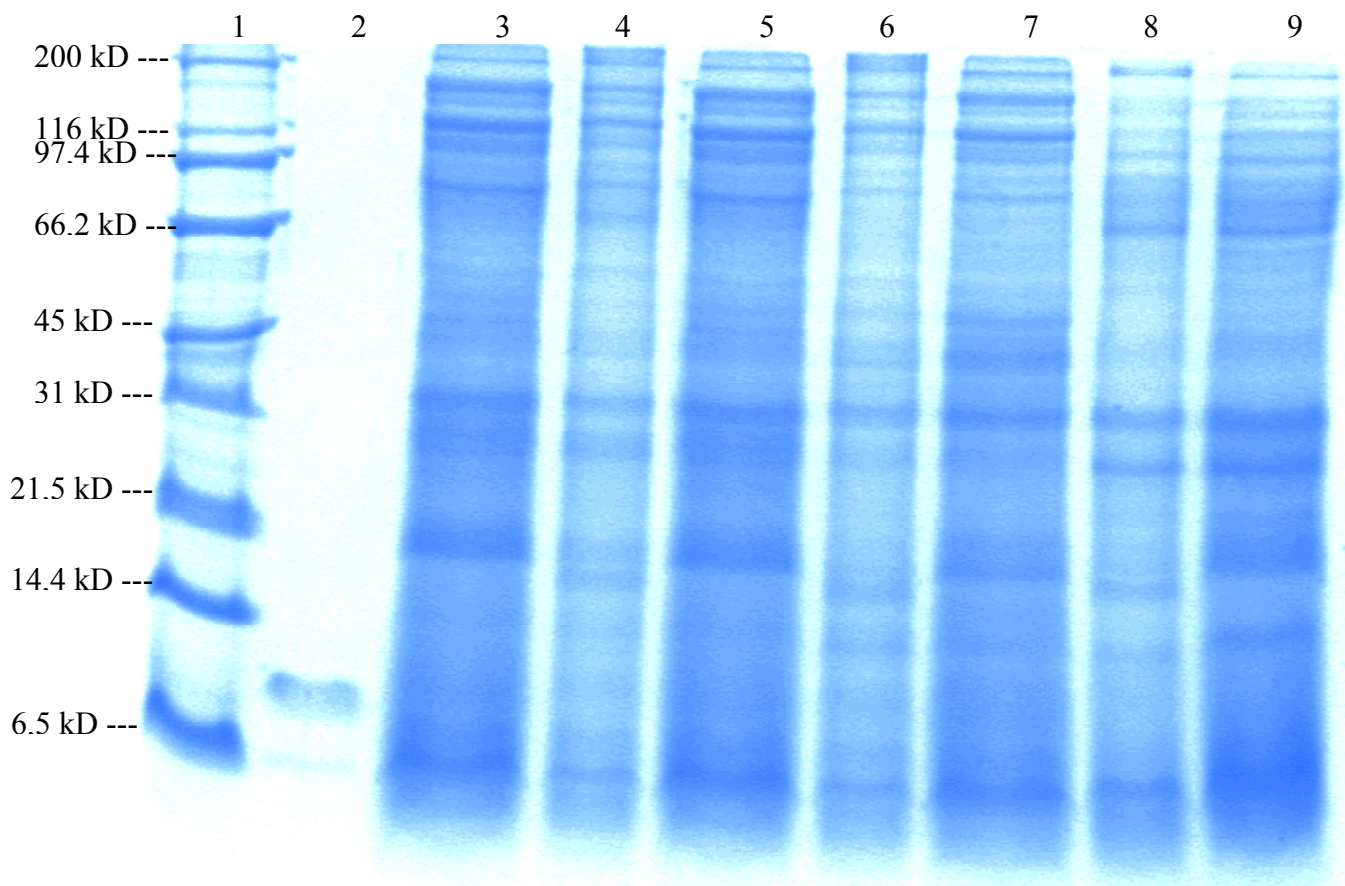


Fig 3 : Exemple de gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (voir matériel et méthodes pour plus de détail). Ligne 1, standard de taille; ligne 2, standard de MT (MT-I (Cd) de foie de lapin); lignes 3 à 9, extraits de caecums pyloriques d'*Asterias rubens*.

4.2.1.2. SDS-PAGE

Dans cette méthode, les protéines chargées négativement (par adjonction de SDS) se déplacent dans un gel de polyacrylamide suite à l'effet d'un champ électrique (c'est l'électrophorèse).

L'électrophorèse sépare donc les différentes protéines d'un échantillon grâce à leurs différences de charge et donc de taille. Pour éviter un bruit de fond trop grand, une purification partielle des extraits est nécessaire. Pour connaître la taille d'une bande sur un gel, il suffit de se référer à un standard de taille que l'on a fait migrer sur le même gel (Fig. 3).

Un gel d'électrophorèse doit être coloré pour pouvoir être analysé. Une coloration classique pour les protéines est l'emploi de bleu de Coomassie. L'utilisation de bromobimanes est aussi possible pour la détection des MTs (Kosower and Kosower 1978).

La méthode SDS-PAGE n'est pas très utilisée pour étudier les MTs. Elle a cependant été utilisée avec succès pour doser les MTs chez le rat (McCormick and Lin 1997).

4.2.2 Méthodes indirectes

Dans les méthodes de dosages dites "indirectes", ce n'est pas la protéine en elle-même qui est détectée, mais ce sont les atomes des métaux complexés, ou les résidus sulfhydryles. Comme les métaux et les résidus sulfhydryles ne sont pas spécifiques aux MTs, il est nécessaire d'obtenir des extraits relativement purs. Pour cela, on emploie en général la chromatographie d'exclusion (Sephadex G-75) suivie ou non d'une HPLC capable de séparer les isoformes des MTs. La chromatographie est une méthode analytique qui est largement utilisée pour la séparation, l'identification et le dosage des constituants chimiques de mélanges complexes. En général, l'échantillon (de 0,5 à 1 ml) est séparé en une cinquantaine de fractions (chacune d' 1 ml).

Les métaux ou les résidus sulfhydryles sont ensuite dosés dans les fractions par spectrométrie d'absorption atomique (AAS) (pour les métaux) et spectrophotométrie ou DPP³ (pour les résidus sulfhydryles) (Brdicka et al. 1933). Connaissant le nombre d'atomes complexés par mole de MT, ou le nombre de -SH par molécule de MT, il est aisé de calculer la concentration en MT dans les extraits de départ.

³ DPP = Polarographie impulsionnelle à goutte pendante.

Une autre méthode de dosage indirecte, la spectrofluorimétrie, se base sur la fluorescence naturelle des MTs quand elles complexent du cuivre (Kägi and Kojima 1987). Une importante émission a alors lieu aux environs de 540 nm (Beltramini et al. 1987). Comme le cuivre montre une haute affinité pour les MTs (supérieure au zinc et cadmium), il peut déplacer les autres métaux des MTs (Chang 1995). Une quantification de la fluorescence à 540 nm permet donc de doser facilement les MTs présentes (Paris-Palacios et al. 2000)

Il est également possible d'utiliser la méthode de saturation métallique. Dans cette méthode indirecte, les extraits sont d'abord saturés d'un métal lourd (Cd, Ag ou Hg) dont l'affinité est en général plus grande que les métaux complexés habituellement par les MTs (Zn et Cu). On ajoute ensuite une résine qui va complexer tous les métaux restés libres et on centrifuge. On procède ensuite au dosage des métaux restant en solution, et on obtient ainsi une estimation de la concentration en MTs des extraits.

Le problème des méthodes indirectes est la difficulté d'obtenir des extraits purs. Des métaux libres et des sulfhydryles provenant de petites molécules interfèrent avec les mesures. De plus ces méthodes sont laborieuses (chromatographie et DPP) et relativement onéreuses (AAS).

Chapitre II : BUT DU TRAVAIL

L'astérie *Asterias rubens* est un bioindicateur de choix pour étudier la contamination métallique de l'environnement. Cette espèce est largement distribuée en Mer du Nord et se retrouve dans tous les sites, propres ou contaminés. Elle est en contact permanent avec le sédiment et se nourrit principalement de filtreurs (moules, huîtres, tuniciers), deux sources évidentes de métaux lourds. Elle accumule efficacement les métaux et sa biologie est bien connue. Ces caractéristiques en font un bon outil écotoxicologique pour l'étude des contaminations métalliques des écosystèmes marins côtiers.

De nombreux travaux ont montré que les marqueurs sub-cellulaires comme les métallothionéines (MTs) constituent une réponse directe aux contaminations métalliques de l'environnement, et cela pour de nombreux invertébrés marins. Ces mêmes travaux soulignent cependant l'importance de bien connaître la biologie de l'espèce, la biochimie des MTs présentes, de bien choisir sa méthode de dosage et de réaliser des expériences de contaminations expérimentales pour valider l'emploi des MTs comme marqueur de contamination. Les travaux de Den Besten et al. (1990) et de Temara et al. (1997) démontrent que des protéines se comportant comme des MTs sont présentes chez les astéries. Cependant, leur caractérisation doit encore être effectuée et les méthodes de dosage utilisées sont difficilement applicables aux études écotoxicologiques devant parfois traiter des centaines d'échantillons.

Le but de ce travail est de mettre au point et d'évaluer une méthode directe, rapide et peu onéreuse capable de doser plusieurs extraits de MTs d'astérie à la fois. Par la même occasion, il s'agit également de caractériser plus avant les MTs d'*A. rubens*. Comme aucun anticorps n'est disponible pour l'instant, la méthode directe de dosage qui a été choisie est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) suivie d'une coloration au bleu de Coomassie. Les bandes du gel sont ensuite dosées par densitométrie. Afin d'obtenir des astéries présentant différents taux de MTs, des expériences de contamination par la nourriture ont été réalisées *in situ*, en employant des moules contaminées au cadmium ou au cuivre. Ces expériences sont réalisées à trois périodes différentes afin de tenir compte de l'état gonadique, facteur pouvant influencer le taux et l'inductibilité des MTs. Deux autres méthodes de dosage (spectrofluorimétrie et chromatographie d'exclusion) sont également testées en parallèle afin de valider certaines observations.

Fig. 4a: Site de contamination (Scharendijke) et de récolte de moules (Wemeldinge).

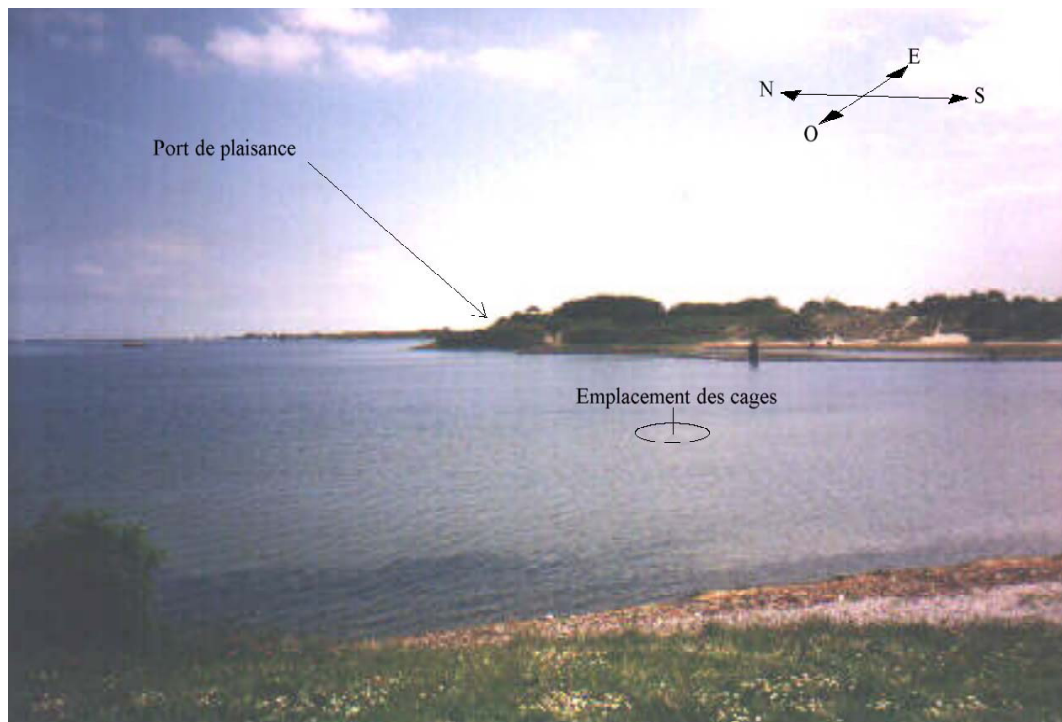


Fig. 4b: Photo de la Baie de Scharendijke. (<http://www.internet-duikclub.net/nederland/duikstek/koepeltje.htm>)

Chapitre III : MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Site et dispositif expérimental

1.1. Le Site

Les expériences de contamination d'astéries ont été effectuées en milieu naturel dans la baie de Scharendijke située sur le bras de mer du Grevelingenmeer en province de Zeeland au Pays-Bas (Fig. 4 a, b). Séparé de la mer du Nord par le Brouwersdam et de l'Oosterschelde par le Grevelingendam, le Grevelingenmeer est devenu un lac d'eau salée. Il n'y a plus ni marées ni courants. Il peut communiquer avec la mer par un tunnel (Spuisluis) situé en dessous du Brouwersdam et avec l'Oosterschelde par une écluse. L'ouverture occasionnelle du tunnel entraîne un renouvellement de l'eau du lac et bien souvent une petite augmentation de son niveau. La salinité y est en général de 28,1 ‰, toutefois de fortes pluies ou une forte évaporation peuvent faire fluctuer ce chiffre.

1.2. Le dispositif expérimental

La facilité d'accès du site ainsi que le fait qu'il n'y ai ni marrées ni courant est propice à la pose de cages. C'est donc à une vingtaine de mètres de la côte que des cages contenant les astéries ont été placées. Pour faciliter leur localisation, une corde partant du bord joue le rôle de fil d'Ariane jusqu'aux cages. Les cages, au nombre de trois et placées côte-à-côte, sont réalisées avec un filet en plastique dur dont les mailles sont de l'ordre du centimètre autour d'une armature rigide. Les dimensions de chaque cage sont de 50 x 50 x 40 cm (l x L x h) avec des pieds de ± 20 cm enfoncés dans le sédiment. La profondeur de l'eau est d'environ 2 mètres à cet endroit de la baie. A chaque visite, les cages sont nettoyées des algues et des organismes encroûtants pour éviter l'obstruction des mailles qui risquerait de provoquer l'asphyxie des astéries présentes.

Fig. 5: Site de récolte de moules (Ambleteuse)



Fig. 6: l'astérie *Asterias rubens* (Linné, 1758)

(Guide de la faune et flore sous-marine de Zelande, R. Sheridan et C. Massin, de la commission scientifique de la LIFRAS)

2. Organismes

2.1. Moules

Les moules utilisées (*Mytilus edulis*, Linné) pour la contamination des astéries ont été prélevées à Ambleteuse (Nord Pas-de-Calais, France) (Fig. 5). Lors de la première expérience de contamination, suite à un problème d'approvisionnement en moules, des moules de Wemeldinge (Zeeland, Pays-Bas) (Fig. 4) ont dû être utilisées.

Les moules ont été récoltées à marée basse dans la zone intertidale et placées dans une caisse. Ramenées au laboratoire de Bruxelles, elles sont nettoyées le jour même et triées en fonction de leur taille (de 40 à 70 mm). Le nettoyage des moules consiste à couper les byssus avec des ciseaux, enlever les éventuelles balanes présentes et rincer le tout pour enlever la vase. Les moules sont ensuite contaminées en aquarium (voir point 3).

2.2. Astéries

Les astéries utilisées dans les expériences de contamination (*Asterias rubens*, Linné, 1758 [Fig. 6]), ont toutes été récoltées à Scharendijke. La récolte est effectuée par des plongeurs en scaphandre autonome. La taille (45 à 100 mm) de chaque astérie est mesurée sous l'eau grâce à un bâton de bois gradué, puis les astéries sont placées dans des sacs de récolte en nylon. Les astéries qui doivent être mises en cage pour débiter l'expérimentation y sont placées directement après la récolte. Les astéries ayant passé un certain temps en cage et devant être analysées sont ramenées à Bruxelles dans des seaux en plastique remplis d'eau de mer récoltée sur place. Durant ce trajet, l'eau est oxygénée par un diffuseur d'air.

Pour un contrôle du site d'expérimentation, des astéries non contaminées ont été récoltées à Ambleteuse et en mer du Nord (durant la campagne de monitoring 02/09 à bord du Belgica) sur le site ZD 2 (51° 37'20 de latitude Nord; 3° 11'30 de longitude Est), via chalutage.

3. Contamination des moules et des astéries

3.1 Contamination des moules

La contamination des moules se déroule en 5 jours. La contamination à lieu au laboratoire de Bruxelles en chambre froide, mise à la température de l'eau du terrain (octobre = 14°C, janvier = 4°C, mai = 14°C). Trois aquariums d'une capacité de 30 litres sont remplis avec 600 moules chacun, ensuite avec de l'eau de mer, jusqu'à 20 litres. Un système de bullage est placé dans chaque aquarium. L'eau du premier aquarium est contaminée avec 100 µl d'une solution stock de cadmium, celle du deuxième aquarium est contaminée avec 20 µl d'une solution stock de cuivre et celle du troisième aquarium est contaminée avec 100 µl d'une solution stock Témoin.

Les trois solutions stock sont réalisées comme suit pour 25 ml :

- Cadmium : 3,26 g de CdCl_2 et 2 ml de HNO_3 . Ajout d'eau Milli-Q (Millipore) jusqu'à 25 ml.
- Cuivre : 5,29 g de CuCl_2 et 2 ml de HNO_3 . Ajout d'eau Milli-Q (Millipore) jusqu'à 25 ml.
- Témoin : 2 ml de HNO_3 et eau Milli-Q (Millipore) jusqu'à 25 ml.

Après 24h, l'eau des aquariums est entièrement renouvelée et contaminée à nouveau. Ceci permet de maintenir la concentration en métaux lourds dans les aquariums, car l'adsorption des métaux sur les parois de l'aquarium et les coquilles des moules en réduit la concentration finale. Les concentrations finales de cadmium et de cuivre dans les aquariums sont respectivement de 400 et 100 µg/l.

Après 5 jours de contamination, les aquariums sont vidés, une dizaine de moules sont prises dans chaque aquarium pour connaître la concentration finale en métaux lourds dans les moules. Le reste des moules est transporté à sec jusqu'au lieu de contamination (Scharendijke) où les moules sont placées dans les cages.

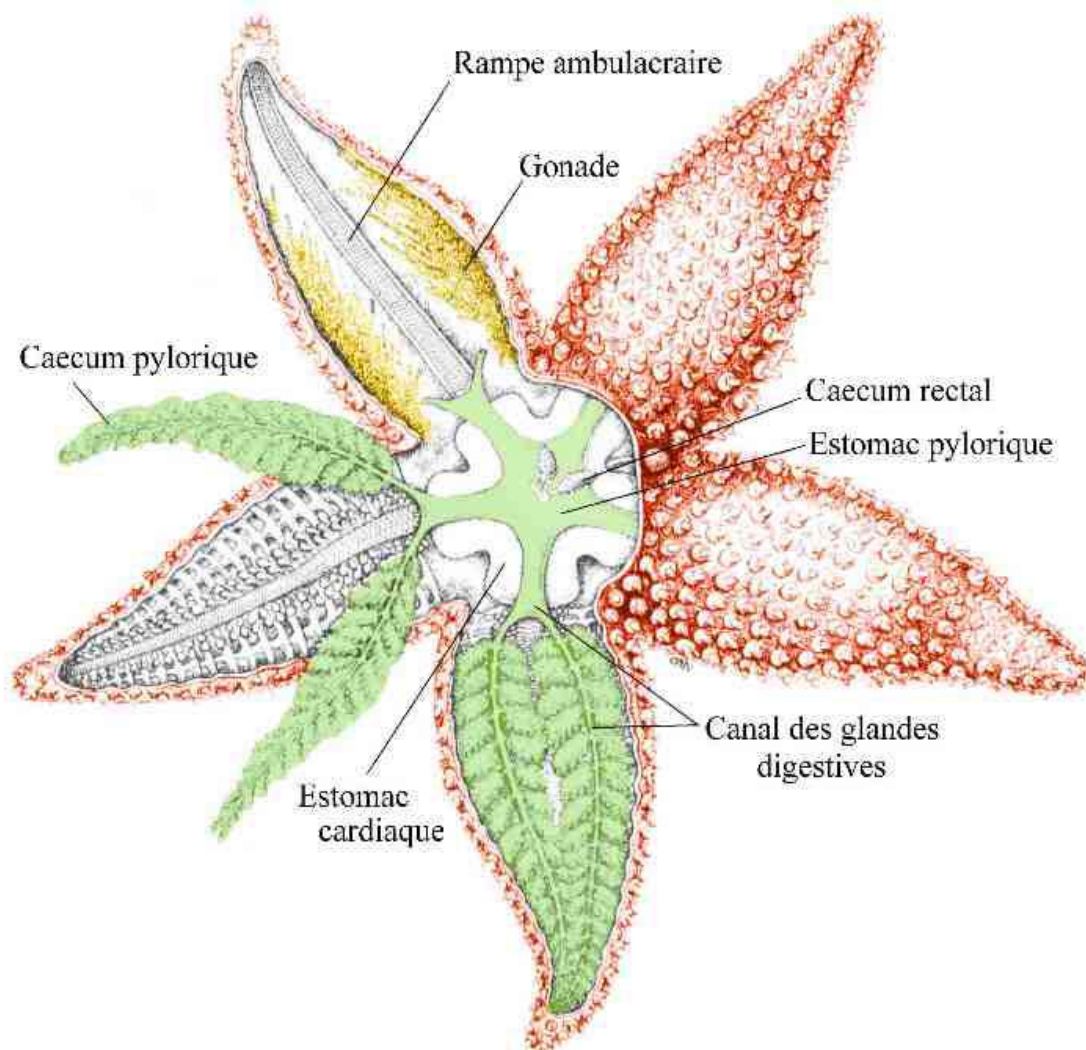


Fig.7 : Anatomie d'*Asterias rubens*, vue depuis la face aborale avec des bras dans différents états de dissection. Les gonades ont été colorées en jaunes, le système digestif pylorique en vert et le tégument en orange. (Invertebrate Zoology, Ruppert/Barnes, sixth edition 1996, Figure 18-11 A, page 933)

3.2 Contamination des astéries

Les astéries sont contaminées via les moules. Chaque astérie dispose d'une moule par jour, les expériences de contamination durant 7, 20 et 40 jours. Il est impossible pour les astéries de se nourrir d'autre chose que de moules contaminées (ou non contaminées pour les astéries témoins).

Les astéries en fin de contamination sont prélevées dans les cages par des plongeurs en scaphandre autonome et placées dans trois sacs de récoltes en nylon clairement identifiables. Le transport s'effectue comme décrit précédemment, les astéries étant placées dans trois seaux distinctement identifiables.

4. Dissection des astéries

Les dissections sont effectuées le jour où les astéries sont ramenées du site de contamination. La dissection est réalisée avec un matériel en Inox 18/10. L'astérie est tout d'abord mesurée de la bouche à l'extrémité du plus long bras à l'aide d'un pied à coulisse en plastique. Après, elle est découpée en deux à la limite oral/aboral (Fig. 7). Les gonades sont mesurées sur papier millimétré et observées entre lame et lamelle afin de déterminer le sexe. Les caecums pyloriques sont enlevés et déposés sur un papier pour en absorber l'eau. Une quantité d'1 ml de caecums est ensuite placée dans un cryotube puis immédiatement congelée dans de l'azote liquide et conservée à -80°C. En vue de déterminer le contenu en cadmium et en cuivre, le reste des caecums est placé dans un crachoir pour ensuite être séché à 60°C pendant 48h (étuve WTC Binder).

5. Extraction des MTs

L'extraction des MTs des caecums pyloriques, est réalisée avec les 1 ml de caecums congelés. Les cryotubes sont pesés avant et après l'extraction pour connaître le poids frais des caecums pyloriques. Une fois sortis des cryotubes, les 1 ml de caecums pyloriques sont ensuite placés dans un tube Falcon de 50 ml contenant 4ml de tampon glycine 0,5 M à 4°C, 5 µl de β-mercaptoéthanol et 43 µl d'une solution de PMSF dans de l'acétone (25 mg de PMSF dans 2,5 ml d'acétone).

Le contenu du tube Falcon est ensuite homogénéisé à l'aide d'un Ultra Turrax (Janke & Kunkel IKA® - Labortechnik, Ultra Turrax T25) pendant 20 secondes à 20500 Tours/minutes. Entre chaque échantillon, la tête de l'Ultra-Turrax est rincée à l'acétone, puis à l'eau Milli-Q, et est séchée avec du papier absorbant. Le contenu du tube Falcon est ensuite transféré dans un tube Nalgene de 10 ml. Les tubes sont centrifugés 15 minutes à 17000 g à $\pm 4^{\circ}\text{C}$ (centrifugeuse Sigma 4k10). Un même volume de surnageant est ensuite transféré dans de nouveaux tubes Nalgene pour, cette fois-ci, une centrifugation de 30 minutes à 17000 g à $\pm 4^{\circ}\text{C}$. Le surnageant est par la suite transféré dans de nouveaux tubes Nalgene avant de placer ces tubes pendant 5 minutes dans un bain d'eau bouillante sur bec Bunzen. Les tubes sont ensuite centrifugés 30 minutes à 17000 g à $\pm 4^{\circ}\text{C}$, les surnageants sont récupérés dans des tubes propres et répartis dans trois ou quatre tubes Eppendorfs qui sont ensuite congelés à -20°C . Pour l'électrophorèse, les extraits sont lyophilisés (lyophilisateur, *Chriss*® Alpha I-5).

6. Dosage des métaux lourds

Pour pouvoir doser le cadmium et le cuivre, 250 mg de caecums pyloriques séchés sont utilisés. Cette quantité de caecums pyloriques sera ensuite "minéralisée" (mise en solution) par micro-ondes puis, les métaux seront dosés par spectrométrie d'absorption atomique (four graphite).

6.1. Etapes de minéralisation

Les 250 mg de tissu séché sont déposés dans des récipients en Téflon, eux-mêmes disposés dans le carrousel d'un micro-onde MILESTONE 1200 mega. Avant la minéralisation proprement dite, 2,5 ml d' HNO_3 suprapur (Merck) et 1 ml d' H_2O_2 30 % suprapur (Merck) sont ajoutés dans les récipients. Pour une minéralisation optimale, le programme suivant, comprenant 5 étapes, a été choisi :

- 1) 6 minutes à une puissance de 250W
- 2) 6 minutes à une puissance de 400W
- 3) 6 minutes à une puissance de 800W
- 4) 6 minutes à une puissance de 300W
- 5) 5 minutes de ventilation.

Les échantillons refroidis sont ensuite retirés du carrousel afin de procéder à leur filtration éliminant ainsi toute éventuelle matière en suspension (reste de caecums non dissous). La filtration est réalisée avec une pompe à vide surmontée par un entonnoir gradué. Le filtre circulaire (Whatman, rétention 1,6 μm , 25 mm de diamètre) est placé entre l'entonnoir gradué et la pompe à vide. Le filtrat récupéré, mis au trait à 25 ml, est dosé par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE).

Pour certifier les résultats des dosages, un matériel de référence a été utilisé (poudre de tissu de moule réf : BCR N° 278R). Les concentrations dans ce matériel de référence sont connues pour les éléments étudiés. Le traitement de la poudre de tissu de moule est identique à celui des échantillons. Les résultats sont garantis avec un écart de moins de 10% au matériel de référence.

6.2. Configuration du four graphite

Le spectromètre est un GTA 100 SpectrAA 640Z de chez Varian. Le mode de calibration est l'ajout dosé, le mode de mesure de l'absorbance est la surface de pic et la correction de bruit de fond est enclenchée. Pour chaque mesure, 3 réplicats sont effectués aussi bien pour les échantillons que pour les standards. Un modificateur (concentration finale en Pd ; 0,018 %, Mg ; 0,009 %, P ; 0,009 %) est utilisé afin d'amener l'analyte vers une phase de stabilité thermique plus élevée et/ou d'augmenter la volatilité des concomitants. Celui-ci est employé pour le dosage du cadmium et du plomb.

Les échantillons du carrousel du SAAE sont amenés dans le four en graphite à l'aide d'un bras automatique muni d'un capillaire. A l'intérieur du four, l'échantillon subit un programme de température composé d'une phase de séchage (ou évaporation) du solvant, suivie d'une décomposition de la matrice (pyrolyse) et de l'atomisation proprement dite.

Les résultats sont directement communiqués à un PC via une interface et un programme de Varian (Spectre AA).

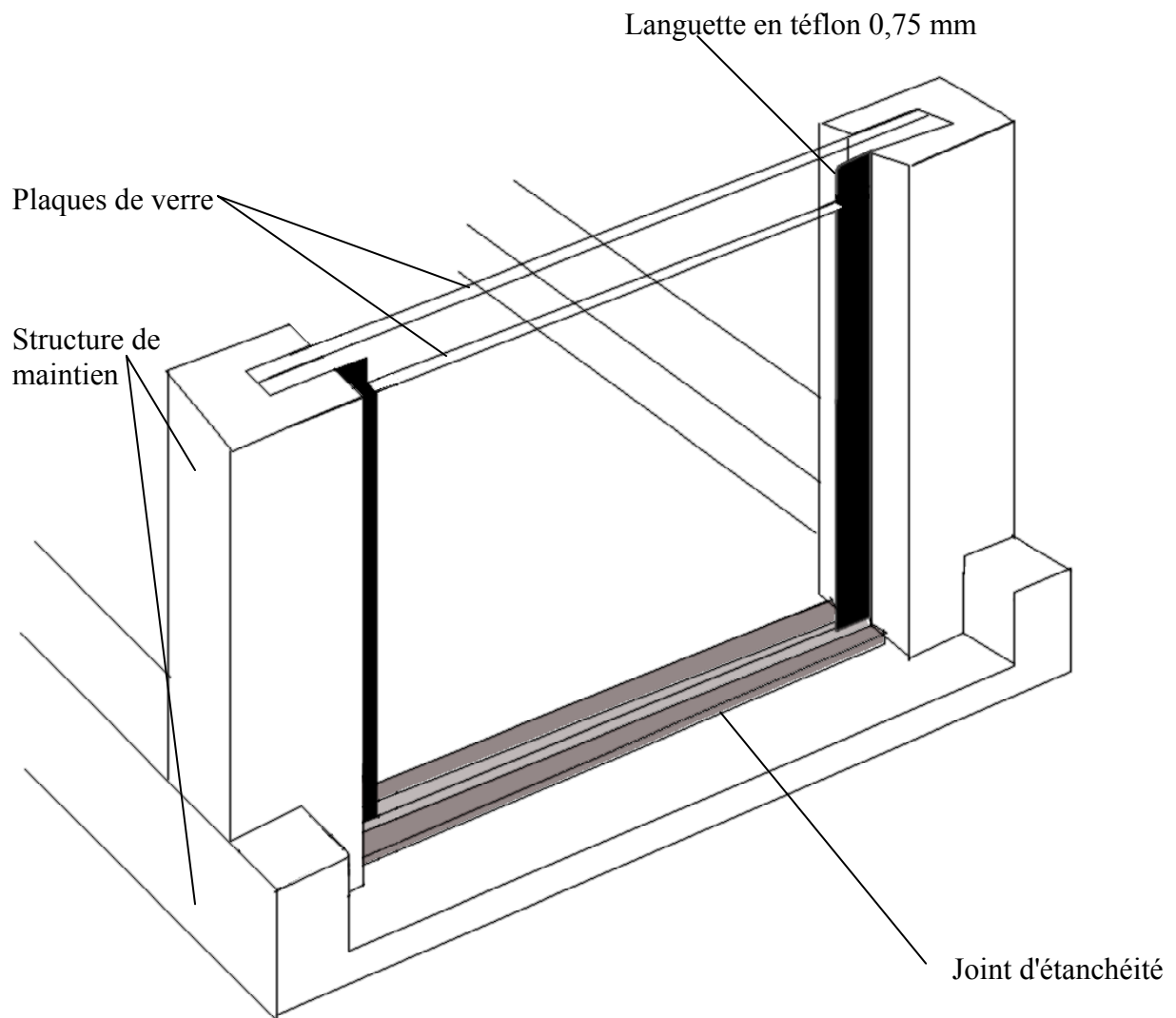


Fig. 8 : Représentation de la préparation d'un gel de polyacrylamide.

7. Electrophorèse SDS-PAGE

7.1. Carboxyméthylation des MTs avant électrophorèse

Comme les MTs sont riches en résidus sulfhydryles (groupes –SH provenant des cystéines), elles forment facilement des liaisons inter et intramoléculaires, ce qui peut provoquer leur agrégation et l'apparition de plusieurs bandes de haut poids moléculaire lors d'un SDS-PAGE. Pour éviter cela, il suffit de bloquer les résidus sulfhydryles avant l'électrophorèse. Pour cela les MTs sont dénaturées (par du SDS), les résidus sulfhydryles sont ensuite maintenus réduits (par du β -mercaptoéthanol) puis carboxyméthylés par de l'acide iodoacétique ((AI) : ICH_2COOH). Le groupe carboxyméthyle ajouté ($-\text{CH}_2\text{COOH}$) bloque les résidus sulfhydryles et empêche leur polymérisation (Otsuka et al. 1988, Kimura et al. 1991).

Pour la carboxyméthylation, 5 ml de tampon Tris-SDS-EDTA-glycérol (Tris 100 mM, EDTA 40 mM, SDS 4%, glycérol 25%, pH 8,8) sont enrichis de 21 μl de β -mercaptoéthanol (β .ME) (60 mM de β .ME au final). Ce tampon ne peut être gardé plus de 24h suite à l'oxydation du β -mercaptoéthanol.

Les extraits lyophilisés sont suspendus dans 200 μl de Tris- β .ME-SDS-EDTA-glycérol, vortexés et centrifugés 1 minute à 8 000 g. 10 μl de surnageant sont ensuite récupérés dans des tubes Eppendorfs et incubés 3 minutes à 100°C, 5 μl d'acide iodoacétique (0,5 M à pH 8) sont ajoutés et les tubes sont incubés à 50 °C pendant 40 minutes. Le volume final des échantillons déposé sur gel est de 20 μl .

7.2. Préparation des gels de polyacrylamide

Les gels d'électrophorèse se composent de deux parties : (1) un gel de concentration ("Stacking gel") d'une hauteur de 5 mm et (2) un gel de séparation d'une dizaine de centimètres de hauteur. Les gels sont coulés entre deux plaques de verre séparées de 0,75 mm par des languettes en téflon. Les gels contiennent 25 puits de chargements (Fig. 8). La composition des gels est optimisée pour obtenir une bonne séparation des petites protéines (Schägger and Von Jagow 1987)

7.2.1. Gel de séparation :

Le gel est réalisé dans un Erlenmeyer où l'on peut former le vide et se compose de : 8,132 ml d'acrylamide-bisacrylamide (48% acrylamide, 1,5% bisacrylamide) ; 13,320 ml de tampon pour gel (Tris 3,0 M, 0,3% SDS, pH 8,45) ; 4,256 ml de glycérol et de 14,052 ml d'eau Milli-Q. Le tout est dégazé pendant 5-10 minutes, puis 200 µl d'ammonium persulfate (100 mg/ml) et 5 µl de TEMED sont ajoutés. Le tout est mélangé et placé entre les plaques de verre avec une pipette pasteur en plastique. Pour une polymérisation optimale, le gel est recouvert avec de l'isopropanol 50%.

7.2.2. Gel de concentration :

Comme pour le gel de séparation, le gel de concentration est conçu dans un Erlenmeyer où l'on peut former le vide. Il se compose de : 8,132 ml d'acrylamide-bisacrylamide (48% acrylamide, 1,5% bisacrylamide) ; 4,256 ml de glycérol et de 14,052 ml d'eau Milli-Q. Ce mélange est dégazé pendant 5-10 minutes. Durant ce temps, on enlève l'isopropanol (avec un papier filtre Whatman n°1). 200 µl d'ammonium persulfate (100 mg/ml) et 5 µl de TEMED, sont ajoutés au gel de concentration dégazé puis il est placé entre les plaques de verre au dessus du gel de séparation. Le peigne est placé pour former les puits dans ce gel de concentration. Le gel polymérise en ± 20 minutes. A cette étape, les gels peuvent être conservés dans un frigo à 5°C (pour la nuit par exemple).

7.3. Migration

La migration est effectuée dans une cuve Protean II[®] xi Cell de Bio-Rad[™]. Le tampon d'anode est composé de Tris 0,2 M, pH 8,9 (Tris base, pH ajusté avec de l'HCl). Le tampon de cathode est composé de Tris 0,1 M, Tricine 0,1 M, SDS 0,1 %, pH 8,25 (Tris Base). Les puits sont chargés avec les échantillons carboxyméthylés après avoir ajouté 2 µl de bleu de bromophénol 0,1 %. Le standard de taille de chez Bio-Rad[™] (Broad Range, réf 161-0317) est préparé comme décrit dans la notice. Les puits étant chargés, la cuve de migration est connectée à un PowerPack 300 (Bio-Rad[™]). La migration est de 30 minutes à 33 volts (voltage constant) puis de 210 minutes à 167 volts (voltage constant). Le temps de migration total est donc de 4 heures. En fin de migration, les plus petites protéines sont toujours sur le gel à plus ou moins 5 mm du bord inférieur.

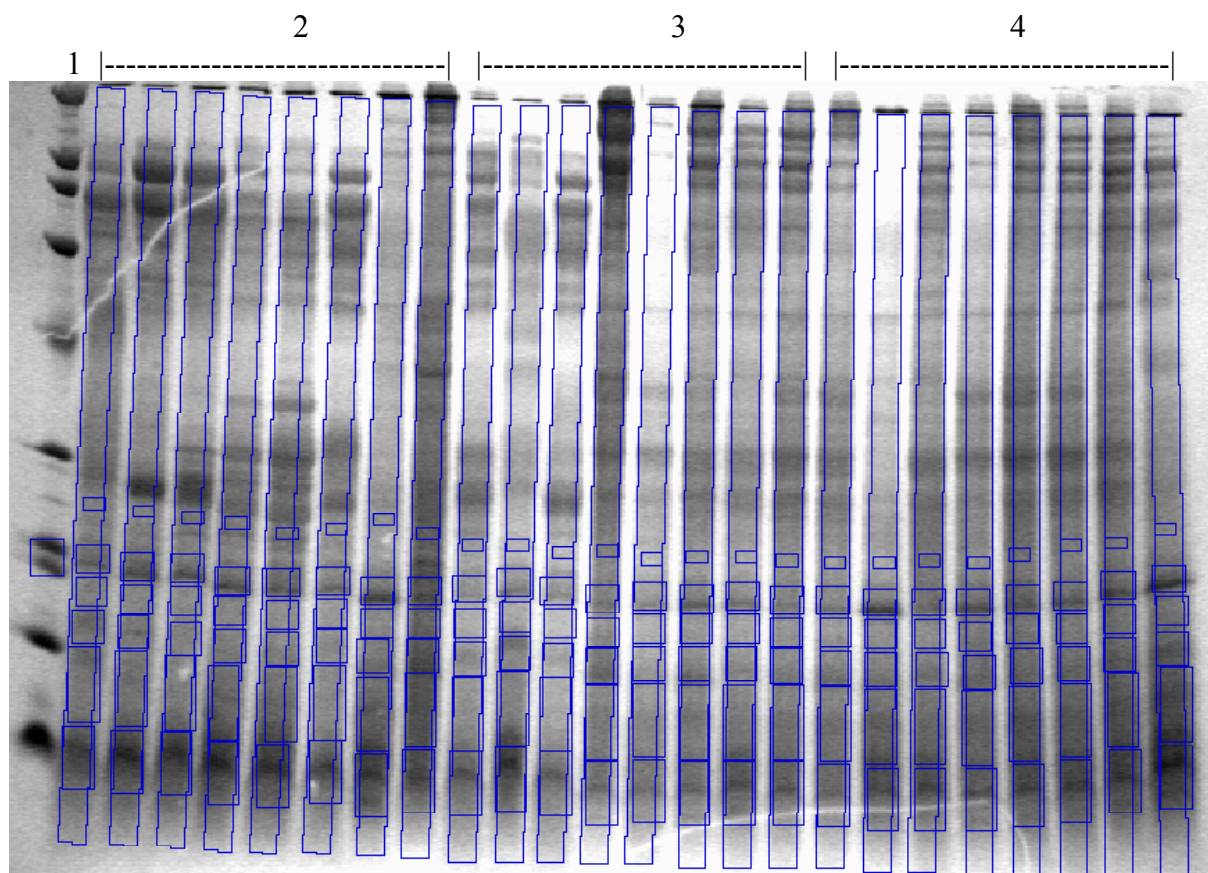


Fig. 9 : Photo réalisée avec le GelDoc[®] 2000 (Bio-Rad[™]) et mesure de la densité optique par Quantity One[®] version 4.3.0 . Sur le gel, on observe : 1- l'échelle du standard de taille ; 2- 8 extraits d'astéries non contaminées, prélevées en Octobre ; 3- 8 extraits d'astéries témoins pour la contamination au cadmium ; 4- 8 extraits d'astéries contaminées au cadmium. Chaque échantillon est analysé pour 5 bandes de 22 kD à 6 kD, pour le bruit de fond et le volume total de la ligne. Un volume autour de la bande des 21,5 kD du standard de taille est tracé pour normalisation.

8. Analyse des gels

8.1. Coloration au bleu de Coomassie

Les gels sont d'abord fixés deux fois 15 minutes, dans du méthanol 40% - acide trichloroacétique (TCA) 15% (40 ml de méthanol, 15 g de TCA, compléter à 100ml avec de l'eau Milli-Q). L'incubation se réalise sous une légère agitation, à température ambiante, et sous éclairage normal.

Les gels sont ensuite colorés 15 minutes dans du Coomassie brillant blue G-250 0,25% - méthanol 50 % - TCA 12,5%.

La décoloration se déroule en 7 incubations de 10 minutes. Les deux premières incubations se font dans du TCA 5%, puis trois dans du méthanol 40% - acide acétique 10% et les deux dernières dans de l'éthanol 10% - acide acétique 5%. (Otsuka et al. 1988, Kimura et al. 1991).

Les gels colorés au bleu de Coomassie peuvent être stockés dans de l'eau Milli-Q.

8.2. Observation au GelDoc[®] 2000 de Bio-Rad[™]

Le gel est déposé sur un écran de conversion UV/ lumière blanche, dans le GelDoc[®] 2000. La photographie du gel est réalisée par une caméra digitale située en haut du GelDoc[®], le gel étant éclairé par le bas (Trans UV). Le programme Quantity One[®] version 4.3.0 est utilisé pour analyser l'image fournie par le GelDoc[®]. C'est en travaillant avec l'outil "Volume" du programme que les bandes sont dosées (des rectangles sont dessinés pour entourer chaque bande) (Fig. 9). Les résultats sont fournis sous forme d'une liste de densités optiques.

La fonction copier – coller, permet d'avoir exactement les mêmes volumes de rectangles d'un gel à l'autre. Pour pouvoir comparer deux bandes de deux gels différents, la densité optique de la bande de 21,5 kD du standard de taille est utilisée pour normaliser les deux gels.

8.3. Normalisation des données et analyses statistiques

Deux types de normalisation ont été testés : la normalisation par la concentration totale des extraits en protéines (voir point suivant) et la normalisation par l'intensité totale sur gel

(par la densité optique du rectangle incluant toutes les bandes d'un échantillon). Après normalisation, les densités optiques sont comparées deux à deux par un test *t* de Student (Excell, Ttest). Pour réaliser ce Ttest, un test F d'homogénéité de la variance (Excell, Ftest) a été réalisé pour savoir si les variances étaient égales ou inégales. Des analyses ANOVA sont également effectuées afin de tester l'influence de la saison, l'influence du site, l'effet de la mise en cage et l'effet de la contamination. Pour ce faire, des test post hoc ont été réalisés, un test de Tukey et un test de Dunnett. Les tests de Tukey ont été réalisés sous le programme STATISTICA (Ver. 5.1 '97) et les tests de Dunnett ont été réalisés par le programme SYSSTAT (Ver. 9).

9. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé avec un spectrophotomètre Spectra-Fluor[®] de Tecan[™] pouvant lire des microplaques via la méthode "microassay" de Sedmark et Grossberg (1977).

La méthode consiste à décongeler les échantillons (échantillons ayant été lyophilisés et resuspendus dans 200 µl de tampon), réaliser une dilution 40 fois avec du tampon glycine (0,5 M pH 8,5) dans une plaque de 96 puits en effectuant des réplicats (n= 3). Ensuite, 10 µl de protéines diluées sont prélevées dans une autre microplaque et 200 µl de bleu de Coomassie sont ajoutés. Le bleu de Coomassie utilisé est composé de 0,06 % de Coomassie G250 dans 1,9 % d'acide perchlorique, filtré sur papier Whatman n°1.

L'absorbance des échantillons est mesurée à 620 nm. Une courbe de calibration est effectuée avec de la bovalbumine (BSA) (fraction V, ref Sigma A8022). La courbe de dilution effectuée est de 300 µg/ml, 150 µg/ml, 60 µg/ml, 15 µg/ml, 0 µg/ml.

10. Chromatographie d'exclusion

Certains extraits de caecums pyloriques ont été analysés par chromatographie d'exclusion afin de confirmer la présence de MTs par une méthode classique. Ces extraits sont les suivants : « J42- T- 6 », « J42- Cu- 8 » et « J42- Cd- 3 ». Ils ont tous été obtenus lors de l'expérience I (octobre- janvier), pendant la contamination de 42 jours.

La chromatographie est effectuée avec une colonne Econo-Colomn[®] de Bio-Rad[™], en verre, de 1,5 x 30 cm (1,3 cm de diamètre interne). La résine utilisée est une Sephadex G-75 normale, gonflée pendant 3h à 90°C avec du tampon dégazé Tris-HCl 20 mM, pH 8,6 (200 ml pour 4 g). La zone de fractionnement de cette résine est de 10000 à 60000 Daltons. Après gonflage, la résine est rincée avec du tampon frais dégazé. La colonne est ensuite nettoyée, calibrée à 45 ml et montée verticalement sur un statif.

Le gel (Sephadex G-75) est ensuite placé en excès dans la colonne en évitant au maximum la formation de bulles. Le tassement de la colonne est effectué avec un flux continu de tampon dégazé. Quand le volume est stabilisé, la colonne est mise à niveau (45 ml) en retirant l'excès de résine avec une pipette pasteur. Un filtre en plastique est délicatement déposé sur le dessus du gel afin de ne pas déformer sa surface lors du dépôt de l'échantillon.

Les échantillons à faire migrer sont injectés (500 µl), puis la colonne est remplie de tampon et la tubulure en amont est connectée au stock de tampon via une pompe péristaltique.

Le flux est contrôlé par la pompe péristaltique et déterminé en mesurant le poids de 4 x 15 gouttes en sortie de colonne et en tenant compte du temps mit pour récolter ces fractions. Le flux est ajusté à 12-14 ml/h.

Le collecteur de fractions utilisé est un Gilson FC 204. Ce détecteur compte les gouttes pour passer d'une fraction à l'autre. Le système de détection est composé d'un spectrophotomètre Gilson 115, comprenant une cellule de 10 mm en Quartz et d'un volume de 40 µl. La détection se fait à 280 nm. Les entrées et sorties sont des tubes en téflon de 0,8 mm de diamètre. Une interface Mac Lab/2e connecte le détecteur à un Macintosh LC630 qui possède le programme Chart V3.2. capable d'analyser les chromatogrammes.

La colonne est calibrée avec du Bleu Dextran (1 mg/ml) pour déterminer le volume mort (V₀) et avec de la cyanocobalamine (= vitamine B12) pour déterminer le volume d'éluion des petites molécules. La calibration est également effectuée avec de la BSA (67 kD), de la ribonucléase A (13,7 kD) et de la MT-I (Cd) de foie de lapin (13,6 kD)

Le contenu en métaux lourds des fractions est dosé par spectrométrie d'absorption atomique électrothermique (SAAE) (voir le point 6.2.).

11. Spectrofluorimétrie

Certains extraits sont analysés par spectrofluorimétrie. Bien que cette méthode soit indirecte (voir introduction), elle offre l'avantage de pouvoir doser 96 échantillons à la fois si l'on dispose d'un spectrofluorimètre à microplaques. Les extraits testés sont les suivants : MT-I (Cd) standard de foie de lapin (réf. Sigma, M7641) et un extrait d'une astérie provenant des aquariums du laboratoire. Des tests préliminaires ont d'abord été effectués avec un spectrofluorimètre à cuvette (SHIMADZU RF-5001 PC). Le spectrofluorimètre utilise la méthode des réseaux pour émettre et analyser les ondes, ce qui entraîne la possibilité d'ondes de seconde harmonique. Pour éviter cela un filtre OY13 a dû être utilisé. Ce filtre coupe les ondes d'excitation jusque 400 nm. Cette précaution élimine l'observation des secondes harmoniques de l'onde d'excitation (p.e. 536 nm lorsque l'on excite à 268 nm). La cuvette employée est en Quartz suprasil[®] et comprend 4 faces optiques. L'excitation se fait à 268 nm et la fluorescence est observée à 547 nm.

Pour observer une fluorescence il faut saturer les MTs avec du cuivre. Pour cela, on prépare donc une solution de Cu^{2+} 1,175 mM (0,471 g de CuSO_4 pour 25 ml). Le volume de la cuvette optique est de 1,5 ml, un ajout de 20 μl de solution de Cu^{2+} 1,175 mM nous amène donc à une concentration de 100 mg Cu^{2+} /l. A cette concentration, une fluorescence d'émission maximum est théoriquement observée (Paris-Palacios et al. 2000).

Les échantillons sont dilués 3 fois (500 μl d'extrait dans 1 ml de tampon glycine 0,5 mM, pH 8,5 et un ajout de 20 μl de Cu^{2+}). La cuvette est nettoyée à l'acétone puis à l'eau Milli-Q et essuyée entre chaque mesure.

Pour observer une fluorescence, on laisse incuber l'échantillon (sous agitation) en présence du Cu^{2+} pendant 20 minutes, dans le noir, à 4°C. Pour obtenir toutes ces conditions, la cuvette est placée dans un bac fermé, rempli de glace, se trouvant sur un plateau agitateur.

Après 20 minutes, la cuvette est sortie de la glace, essuyée avec un mouchoir et placée dans le spectrofluorimètre. L'excitation est continue pendant la mesure du spectre d'émission (fluorescence).

Tableau 1 : Taille et maturité moyenne des astéries utilisées pour les expériences

	n	Taille moyenne en (mm)	Std Dev	Maturité moyenne	Std Dev
J0 Octobre	10	60,90	9,46	4	1,29
J7 T(Cd)	10	63,40	7,76	4	1,03
J7 T(Cu)	10	65,30	7,67	5	1,37
J7 Cd	10	56,80	5,75	6	3,53
J7 Cu	10	67,60	4,40	4	0,95
J42 T	10	73,20	7,47	3	0,64
J42 Cu	10	68,10	9,09	2	0,57
J42 Cd	10	72,80	9,27	2	0,53
J0 Mars	10	65,20	6,63	1	0,27
J0 Ambleteuse	10	55,70	6,95	2	0,66
J0 Belgica	10	55,00	5,81	4	2,20
J20 T	10	64,60	10,00	1	0,73
J20 Cd	10	75,80	10,65	1	0,15
J20 Cu	10	72,40	16,51	2	0,43
J40 T	8	78,50	14,64	1	0,15
J40 Cu	10	65,40	8,51	1	0,36
J40 Cd	7	79,43	5,47	1	0,21
J0 Juin	10	64,40	6,90	2	0,96
J21 T	9	59,67	6,42	4	2,87
J21 Cd	10	65,80	8,20	6	5,12
J21 Cu	10	64,10	12,01	3	1,69
J41 T	7	74,14	7,20	5	1,20
J41 Cd	5	65,60	11,35	3	1,11
J41 Cu	10	67,40	8,40	4	1,97

Maturité : 1 = la longueur de la gonade est égale à la longueur du bras de l'astérie.
 2 = la longueur de la gonade est égale au $\frac{1}{2}$ de la longueur du bras de l'astérie.
 3 = la longueur de la gonade est égale au $\frac{1}{3}$ de la longueur du bras de l'astérie.
 4 = la longueur de la gonade est égale au $\frac{1}{4}$ de la longueur du bras de l'astérie.
 ...

Chapitre IV : RÉSULTATS

1. Echantillonnage

Le tableau 1 résume les 3 grandes expériences de contamination des astéries qui ont été réalisées pour ce mémoire. Ce tableau comprend le nombre d'astéries récoltées, la taille moyenne et la maturité moyenne des astéries (l. du bras/l. de gonade). La première expérience a été réalisée d'octobre à janvier, la deuxième en mars et la troisième de mai à juin.

• **L'expérience I, d'octobre à janvier comprend :**

- Un groupe d'astéries non contaminées de Scharendijke nommé « J0 Octobre »
- Une contamination de 7 jours au cadmium et au cuivre (Novembre) nommée :
 - « J7 T » pour le groupe témoin (Cd et Cu) nourrit avec des moules témoins,
 - « J7 Cd » pour les astéries nourries avec des moules contaminées au cadmium,
 - « J7 Cu » pour les astéries nourries avec des moules contaminées au cuivre.
- Une contamination de 42 jours (13 décembre – 23 janvier) au cadmium et au cuivre nommé :
 - « J42 T » pour les astéries témoins nourries avec des moules témoins,
 - « J42 Cd » pour les astéries nourries avec des moules contaminées au cadmium,
 - « J42 Cu » pour les astéries nourries avec des moules contaminées au cuivre.

• **L'expérience II, réalisée en mars, comprend:**

- Un groupe d'astéries de Scharendijke non contaminées nommé « J0 Mars»
- Un groupe d'astéries d'Ambleteuse non contaminées nommé « J0 Ambleteuse»
- Un groupe d'astéries non contaminées prélevées sur le Belgica nommé « J0 Belgica»
- Une contamination de 20 et 40 jours au cadmium et au cuivre nommé :
 - « J20 T » et « J40 T » pour les astéries témoins,
 - « J20 Cd » et « J40 Cd » pour les astéries contaminées au cadmium,
 - « J20 Cu » et « J40 Cu » pour les astéries contaminées au cuivre.

• **L'expérience III, réalisée en mai – juin, comprend :**

- Un groupe d'astéries de Scharendijke non contaminées nommé « J0 Juin»
- Une contamination de 21 et 41 jours au cadmium et cuivre nommé :
 - « J21 T » et « J41 T » pour les astéries témoins,
 - « J21 Cd » et « J41 Cd » pour les astéries contaminées au cadmium,
 - « J21 Cu » et « J41 Cu » pour les astéries contaminées au cuivre.

Tableau 2 : Concentrations en Cd et en Cu (en µg/g de poids sec) dans les moules utilisées lors de l'expérience I de contamination (octobre-janvier).

Contaminant	Moules à la sortie des aquariums				Moules après 7 jours				Moules après 35 jours			
	Cd		Cu		Cd		Cu		Cd		Cu	
	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type
T	0,51	0,03	5,19	1,36					0,53	0,08	5,45	1,18
Cd	35,50	1,68	3,68	0,31					31,21	2,47	3,89	0,66
Cu	0,43	0,06	20,93	4,42					0,31	0,05	6,08	3,16
T	0,38	0,01	4,28	0,68	0,64	0,09	5,27	0,11	← Moules de Wemeldinge			
Cd	45,43	22,04	4,07	0,78	28,26	5,68	4,75	1,05				
Cu	0,45	0,04	47,71	2,67	0,43	0,03	22,16	7,08				

Tableau 3 : Concentrations en Cd et en Cu (en µg/g de poids sec) dans les moules utilisées lors de l'expérience II de contamination (mars).

Contaminant	Moules à la sortie des aquariums				Moules après 20 jours				Moules après 40 jours			
	Cd		Cu		Cd		Cu		Cd		Cu	
	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type
T	0,29	0,02	6,80	0,24	0,54	0,09	7,02	0,89	0,38	0,01	7,04	0,73
Cd	81,01	5,17	5,05	0,39	32,48	22,20	5,19	0,54	33,96	4,02	5,08	0,46
Cu	0,37	0,08	18,02	2,63	0,62	0,05	10,00	0,34	0,41	0,04	10,32	3,06

Tableau 4 : Concentrations en Cd et en Cu (en µg/g de poids sec) dans les moules utilisées lors de l'expérience III de contamination (mai - juin).

Contaminant	Moules à la sortie des aquariums				Moules après 21 jours				Moules après 41 jours			
	Cd		Cu		Cd		Cu		Cd		Cu	
	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type
T					0,41	0,10	5,54	0,27	0,31	0,03	4,26	0,68
Cd					68,96	8,56	3,68	0,28	47,60	35,89	162,04	222,20
Cu					0,45	0,03	7,33	0,40	0,41	0,06	5,02	0,59

2. Contamination

2.1 Contamination des moules

Les astéries utilisées dans les expériences ont été contaminées par leur nourriture, en employant des moules contaminées.

Les tableaux 2, 3 et 4, récapitulent les contaminations (concentrations moyennes en $\mu\text{g/g}$ de poids sec, $n= 3$) observées après l'incubation de 5 jours en aquarium et la décontamination des moules au cours des expériences en milieu naturel.

Lors des premières expériences de contamination, la prédation des astéries a été sous-estimée. Nous n'avons donc pas de données pour les 7 jours de décontamination. Suite à un problème d'approvisionnement en moules d'Ambleteuse, des moules de Wemeldinge (Zeeland) ont dû être utilisées pour la première expérience (astéries J42). Le tableau indique qu'il n'y a pas de différences significatives entre les concentrations métalliques des deux lots de moules utilisés.

Pour l'expérience III, un oubli de récolte d'échantillon en début d'expérience nous prive des résultats du contenu en métaux à la sortie des aquariums (Tableau 4).

Tableau 5 : Concentrations moyennes en Cd et en Cu, en $\mu\text{g/g}$ de poids sec dans les astéries non contaminées (n = 10)

	J 0			
	Cd		Cu	
	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type
Expérience I	0,53	0,13	52,32	25,07
Expérience II	0,66	0,31	49,12	8,57
Expérience III	0,39	0,33	77,22	24,93
Ambleteuse	0,86	0,26	11,63	3,16
Belgica	0,39	0,12	19,44	6,58

Tableau 6 : Concentrations moyennes en Cd et en Cu, en $\mu\text{g/g}$ de poids sec dans les astéries utilisées dans l'expérience I de contamination

Contaminant	J 0				J 7				J 42			
	Cd		Cu		Cd		Cu		Cd		Cu	
	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type
T(Cu)	0,53	0,13	52,32	25,07	1,48	0,32	36,99	17,89	0,29	0,16	30,93	4,88
T(Cd)					0,43	0,13	41,45	15,91				
Cd					17,86	15,92	32,37	15,68	5,13	3,13	27,88	9,16
Cu					1,49	0,15	62,84	33,85	0,16	0,07	34,39	13,32

Tableau 7 : Concentrations moyennes en Cd et en Cu, en $\mu\text{g/g}$ de poids sec dans les astéries utilisées dans l'expérience II de contamination

Contaminant	J 0				J 20				J 40			
	Cd		Cu		Cd		Cu		Cd		Cu	
	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type
T	0,66	0,31	49,12	8,57	1,47	1,23	53,78	35,70	0,93	0,39	29,16	6,47
Cd					1,19	0,14	39,40	15,20	3,10	3,80	35,95	20,32
Cu					0,55	0,23	59,77	25,15	0,79	0,20	70,08	25,57

Tableau 8 : Concentrations moyennes en Cd et en Cu, en $\mu\text{g/g}$ de poids sec dans les astéries utilisées dans l'expérience III de contamination

Contaminant	J 0				J 21				J 41			
	Cd		Cu		Cd		Cu		Cd		Cu	
	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type	Conc. Moyenne	Ecart type
T	0,39	0,33	77,22	24,93	0,48	0,31	47,19	21,13	0,55	0,10	32,91	12,57
Cd					8,09	4,22	67,40	26,61	11,70	4,01	77,81	47,73
Cu					0,55	0,31	67,01	39,11	0,54	0,18	49,49	28,42

2.2. Contamination des astéries

Le tableau 5, résume le contenu (concentrations moyennes en $\mu\text{g/g}$ de poids sec, $n=10$) en cuivre et en cadmium chez des astéries non contaminées, provenant de Scharendijke (expériences I, II et III), d'Ambleteuse et de la mission Belgica 02/09.

Les tableaux 6, 7 et 8, récapitulent le contenu en cadmium et en cuivre des astéries utilisées dans les contaminations expérimentales. « J0 » indique qu'il s'agit d'astéries non contaminées, retirées au début de l'expérience (données du tableau 5).

Lors de la première expérience de contamination, suite à une mortalité élevée des moules et des astéries contaminées au cuivre après 7 jours, cette expérience a été réitérée. Cela explique la présence en « J7 » de deux témoins, « T(Cd) » et « T(Cu) » pour respectivement les contaminations en cadmium et cuivre.

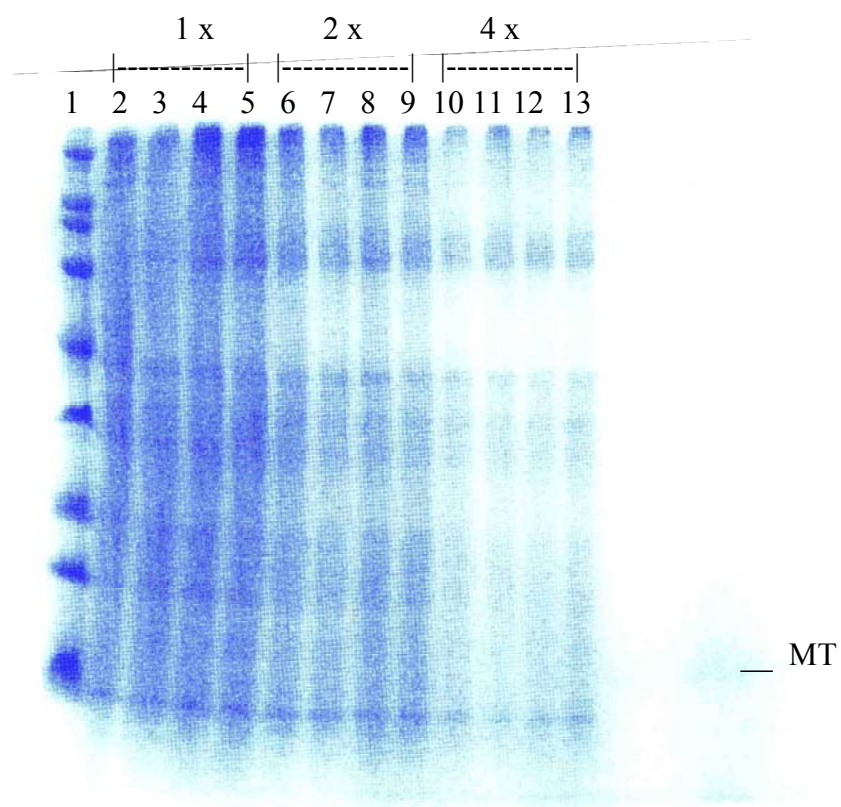


Fig. 10 : Migration de « J42- 4- Cd » pour évaluer la méthode de dosage densitométrique. Ligne 1, standard de taille ; ligne 2 à 5, extrait d'astérie non dilué ; ligne 6 à 9, extrait d'astérie dilué 2x ; ligne 10 à 13 extrait d'astérie dilué 4x. Une MT-I (Cd) standard de foie de lapin de chez Sigma (ref M7641) a été mise à raison de 16 μg par puits.

3. Electrophorèse SDS-PAGE

3.1. Evaluation de la méthode de dosage par densitométrie

Lorsqu'un extrait est déposé sur gel, on voit en général une dizaine de bandes. Dans ce travail, on ne s'intéresse qu'aux bandes inférieures à 22 kD car les MTs sont de petites protéines d'environ 10 kD (22 kD a été analysé car il peut exister des formes dimères comme le suggère Temara et al. (1997)).

Afin d'évaluer la méthode d'analyse densitométrique proposée, un extrait d'astérie (J42- Cd- 4) a été dilué 2 x et 4 x. Quatre réplicats de chacune de ces dilutions, ainsi que l'extrait non dilué, ont été déposés dans les puits d'un gel (Fig. 10). Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie comme décrit dans « Matériels et méthodes » (8.1.), et 4 bandes sont dosées pour chaque extrait (les bandes 6 kD, 14 kD, 18 kD et 22 kD). La différence de densité optique des différentes dilutions est très hautement significative (< 0.001 , test de *t* Student).

L'intensité des bandes est ensuite portée en graphique en fonction de la dilution (voir figures 11 à 14 ci-dessous).

Figure 11 : Bandes des 22 kD

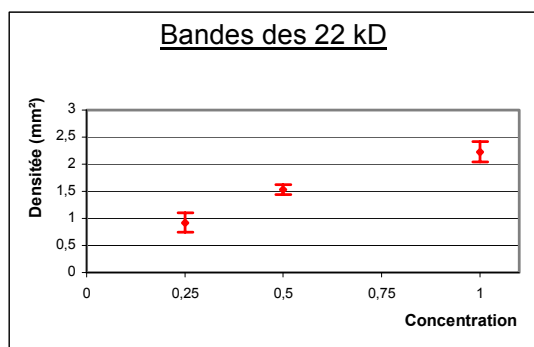


Figure 13 : Bandes des 14 kD

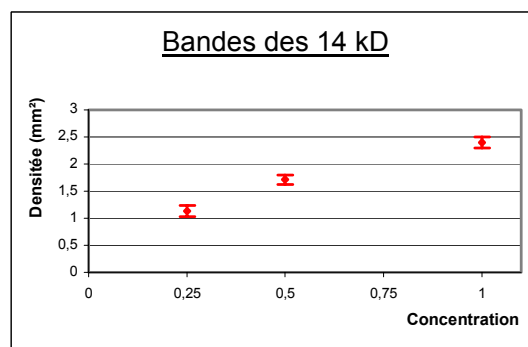


Figure 12 : Bandes des 18 kD

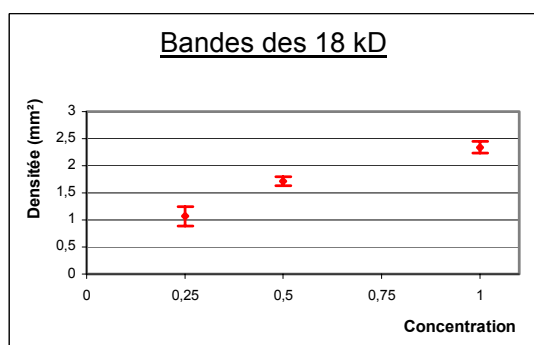
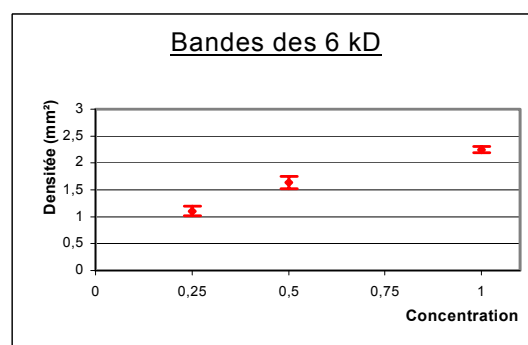


Figure 14 : Bandes des 6 kD



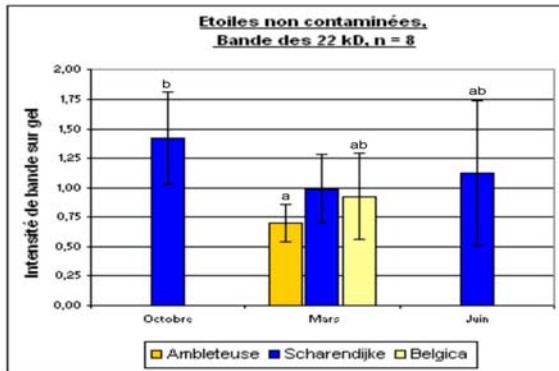
Pour évaluer la méthode, deux autres tests ont été réalisés.

Pour le premier test, un même extrait d'astérie (J0 Octobre) a été déposé sur deux gels de migration différents. Si on effectue un test de comparaison (t de Student) on remarque qu'il n'y a aucune différence significative dans les intensités mesurées et cela pour les deux types de normalisations (via les protéines totales des extraits et via la densité optique totale sur gel).

Pour le deuxième test, un gel de migration a été photographié 2 fois avec le GelDoc[®] 2000. La différence entre les deux photographies est le réglage de la caméra (contraste – iris). Si on compare les bandes de ces deux photos, on remarque des différences significatives. Afin d'éviter ces différences, tous les gels ont été photographiés avec les mêmes réglages de caméra.

La limite de détection du système a été évaluée en employant des MTs de foie de lapin (MT-I (Cd), Sigma M7641). Cette limite est estimée à 16 μ g de MTs par puits de gel. En dessous de cette limite, la bande est indistinguable du bruit de fond.

Figure 15
Normalisation via le contenu en protéines



Normalisation via la densité totale des bandes

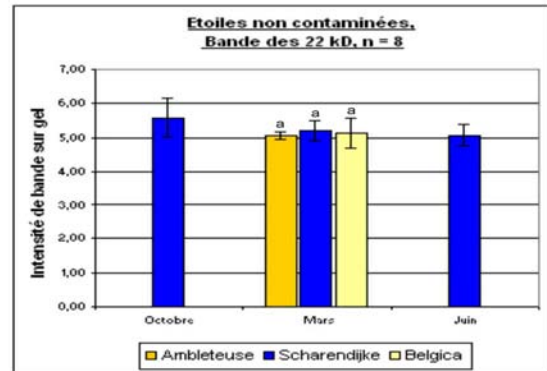
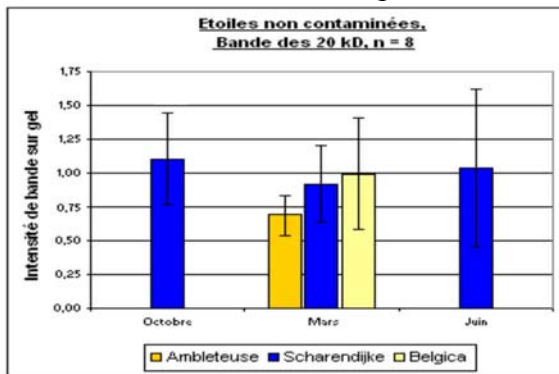


Figure 16
Normalisation via le contenu en protéines



Normalisation via la densité totale des bandes

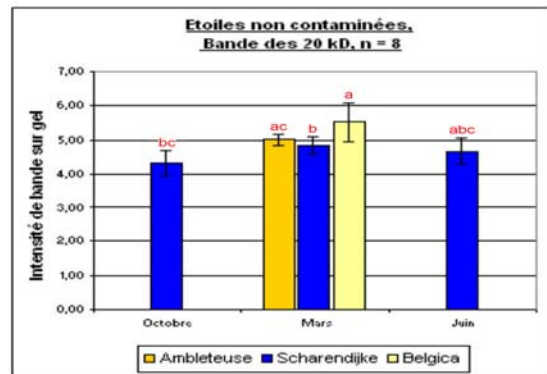
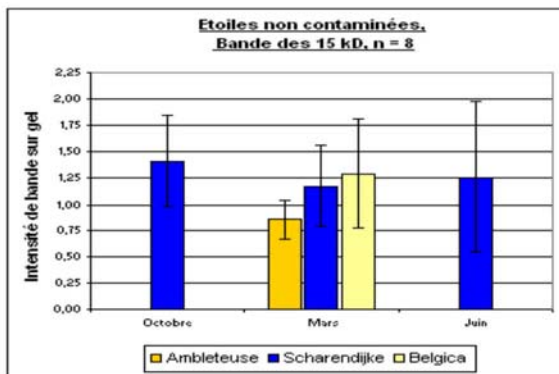


Figure 17
Normalisation via le contenu en protéines



Normalisation via la densité totale des bandes

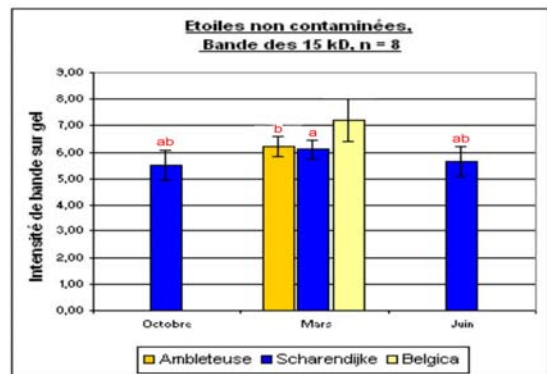
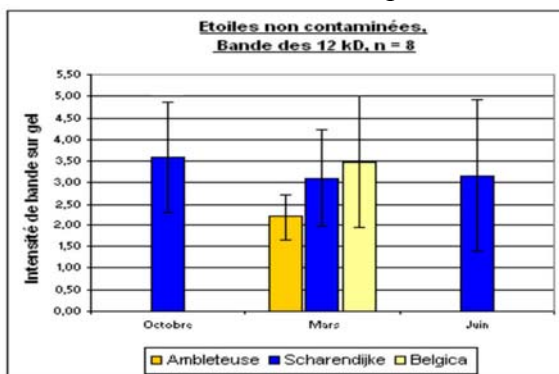
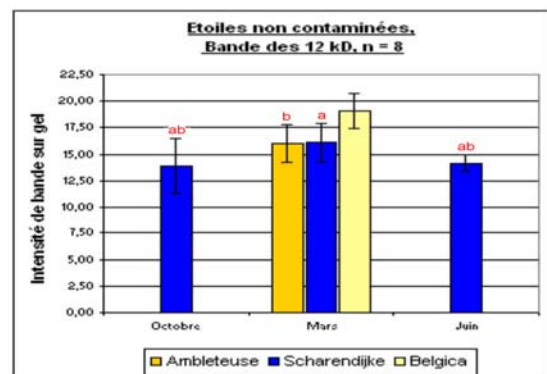


Figure 18
Normalisation via le contenu en protéines



Normalisation via la densité totale des bandes



3.2. Analyse des astéries non contaminées

Les figures 15 à 19 montrent les résultats des analyses densitométriques pour les 5 bandes analysées (6 à 22 kD) et les 5 groupes d'astéries. Ces 5 groupes sont constitués des astéries J0 de Scharendijke (J0 Octobre, J0 Mars, J0 Juin) et de 2 groupes d'astéries provenant de sites différents (J0 Ambleteuse et J0 Belgica). Toutes les données ont été normalisées par le contenu en protéines des extraits ou par la valeur de densité optique de la totalité de la bande de migration.

On remarque tout d'abord de grandes différences en fonction de la méthode de normalisation (protéines totales des extraits par rapport à l'intensité totale sur gel). Ces différences seront examinées dans le chapitre discussion.

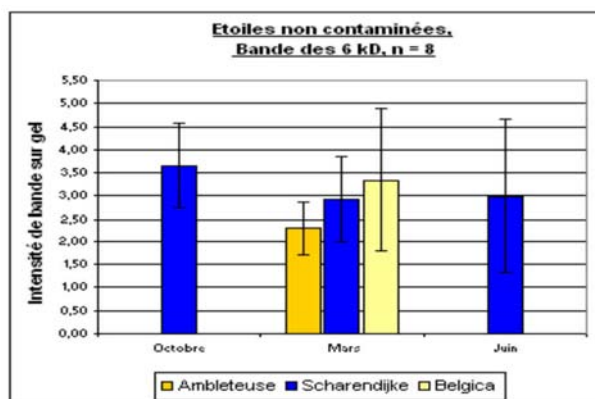
Peu importe la méthode de normalisation, on constate que des variations 'naturelles' de la densité des bandes peuvent se produire au sein d'une population donnée. Par exemple, à Scharendijke (si on examine la normalisation par protéines) l'intensité des bandes reste généralement constante, sauf pour les bandes des 22 kD où l'on constate une diminution significative entre octobre et mars.

On constate également que des différences peuvent être établies entre populations. Par exemple, pour les bandes des 15 kD en mars, la densité des bandes des astéries prélevées en ZD2 (Belgica) est plus importante que pour Scharendijke.

Les résultats des analyses statistiques sont représentés sur les graphiques en rouge pour les tests ANOVA et en noir pour les tests *t* de Student. Les différences significatives (< 0.05) sont notées de la façon suivante : toutes les colonnes qui partagent la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles.

Figure 19

Normalisation via le contenu en protéines



Normalisation via la densité totale des bandes

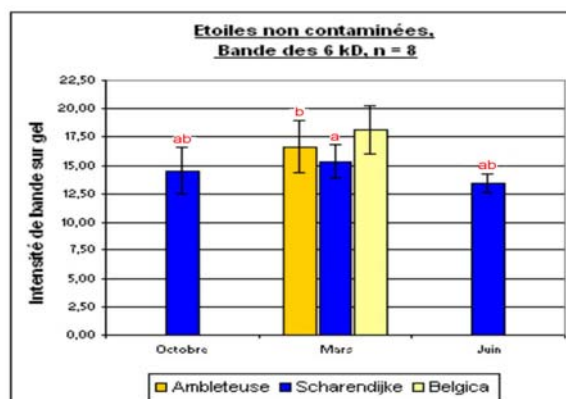
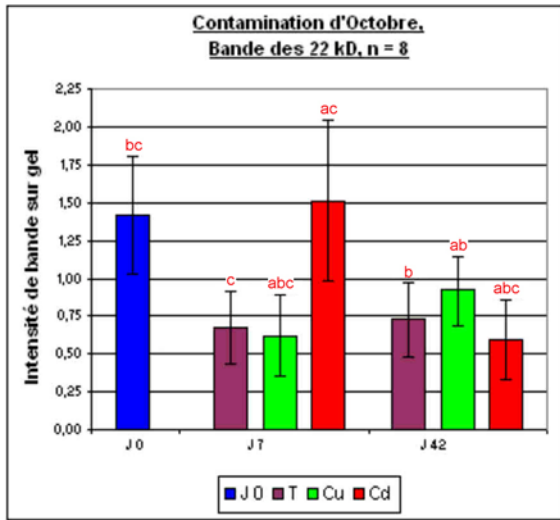


Figure 20

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes

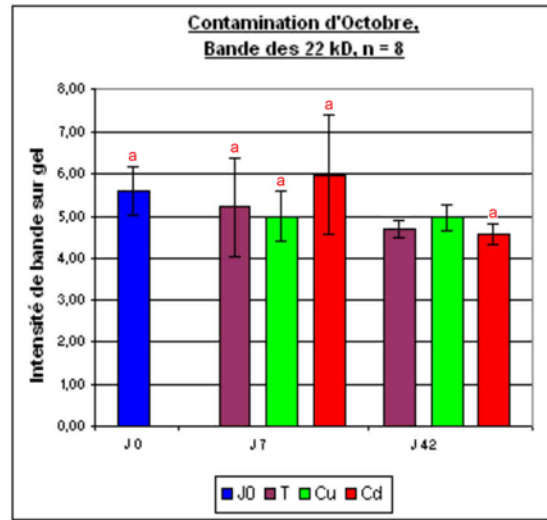
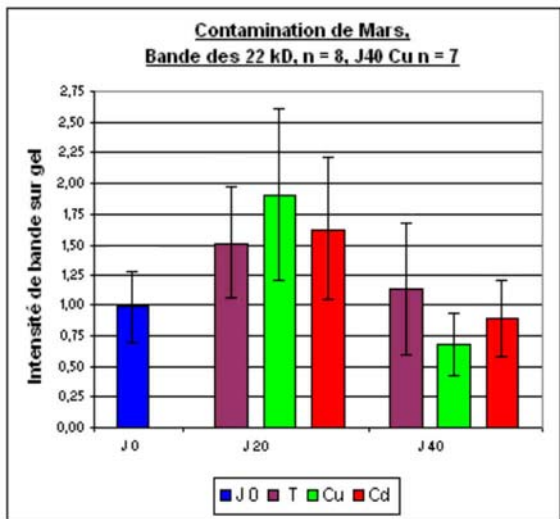


Figure 21

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes

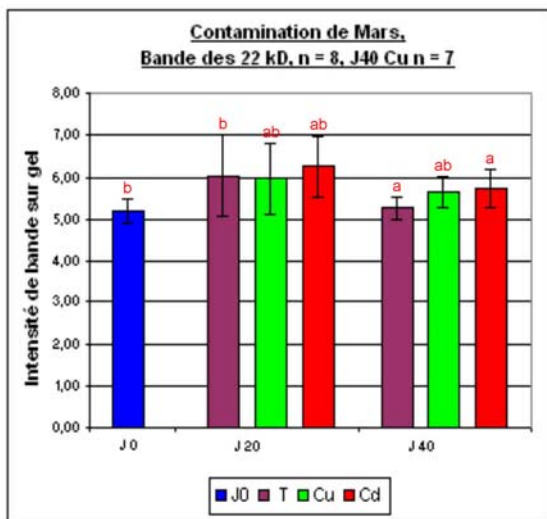
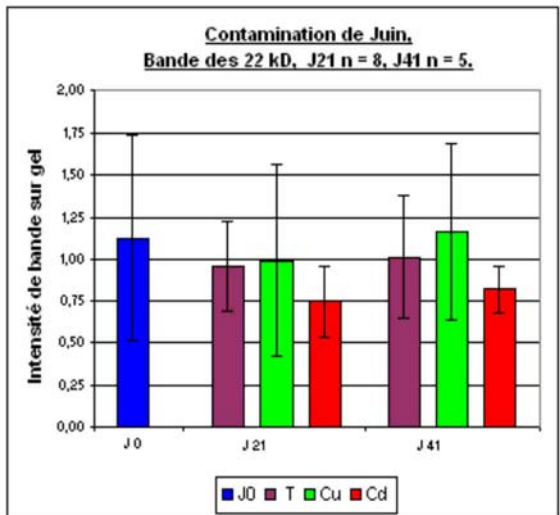
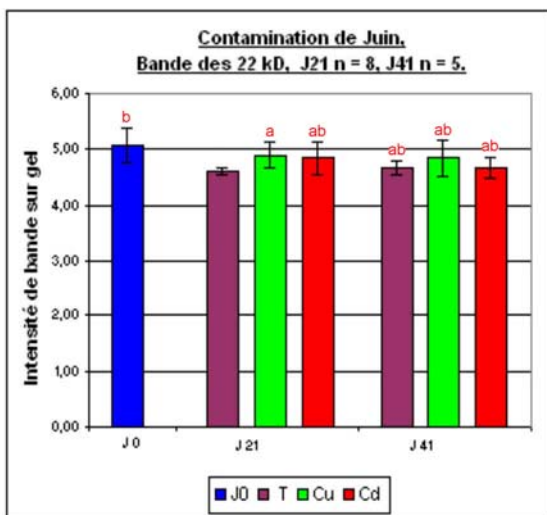


Figure 22

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes



3.3. Analyse des astéries contaminées

Les résultats des analyses densitométriques sont répartis en 3 expériences de contamination (I : octobre, II : mars, III : juin) pour lesquelles 5 bandes (22 kD, 20 kD, 15 kD, 12 kD, 6 kD) ont été analysées. Les 15 graphiques sont représentés dans les figures 20 à 34.

- Les figures 20 à 22 présentent les résultats pour la bande de 22 kD,
- Les figures 23 à 25 présentent les résultats pour la bande de 20 kD,
- Les figures 26 à 28 présentent les résultats pour la bande de 15 kD,
- Les figures 29 à 31 présentent les résultats pour la bande de 12 kD,
- Les figures 32 à 34 présentent les résultats pour la bande de 6 kD.

Les graphiques représentent la densité optique des bandes, normalisée par le contenu en protéines des extraits ou la densité optique totale, en fonction du nombre de jours d'incubation en cage.

« J0 » représente les astéries qui n'ont pas été en cage.

« T » représente les astéries contrôles de l'expérience de contamination.

« Cu » représente les astéries contaminées au cuivre.

« Cd » représente les astéries contaminées au cadmium.

« J7 » comprend les astéries restées 7 jours en cage.

« J42 » comprend les astéries restées 42 jours en cage.

« J20 » comprend les astéries restées 20 jours en cage.

« J40 » comprend les astéries restées 40 jours en cage.

« J21 » comprend les astéries restées 21 jours en cage.

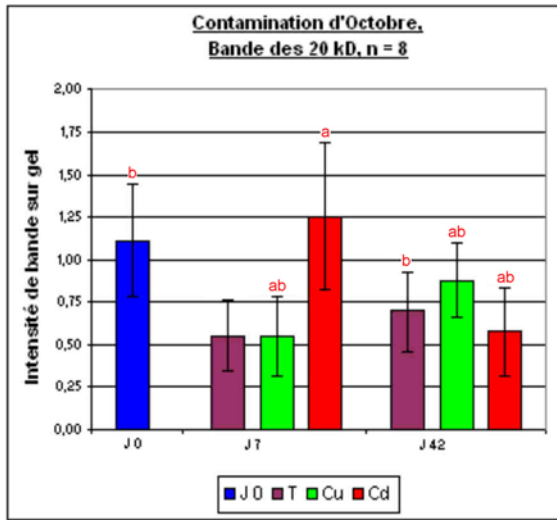
« J41 » comprend les astéries restées 41 jours en cage.

Les résultats des analyses statistiques sont représentés sur les graphiques en rouge pour les tests ANOVA et en noir pour les tests *t* de Student. Les différences significatives (< 0.05) sont notées de la façon suivante : toutes les colonnes qui partagent la même lettre ne sont pas significativement différentes entre elles.

Aucune différence significative entre mâles et femelles n'a été relevée.

Figure 23

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes

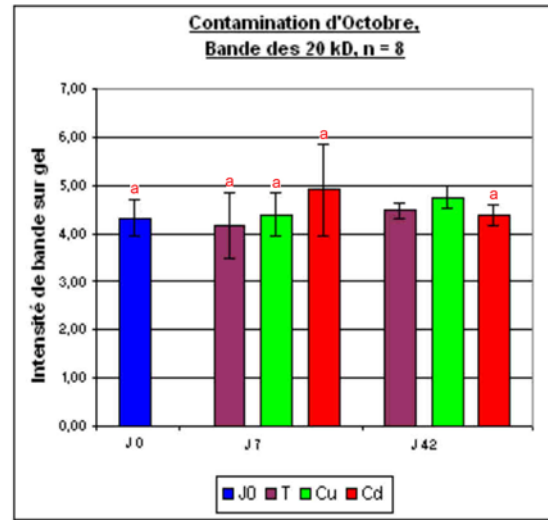
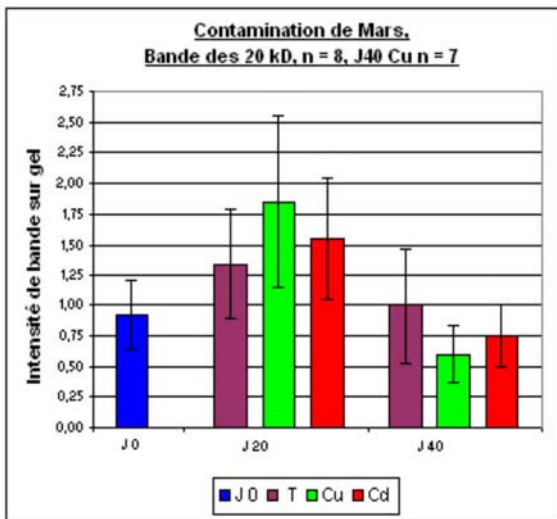


Figure 24

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes

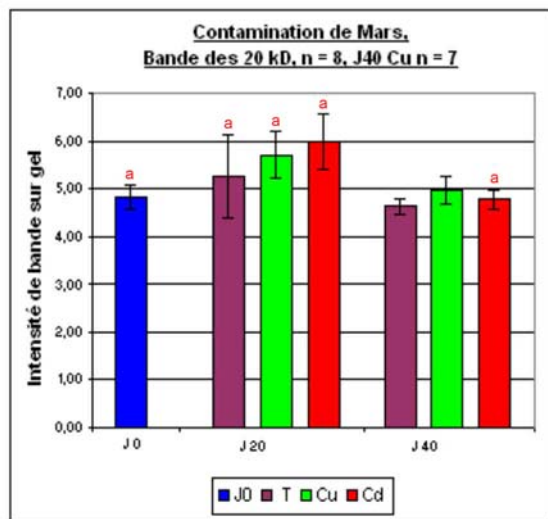
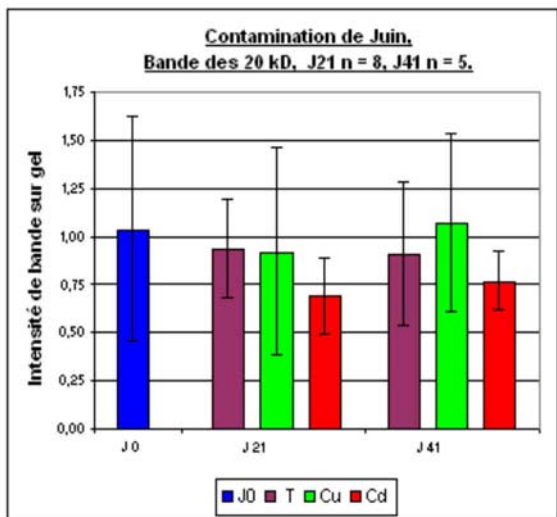
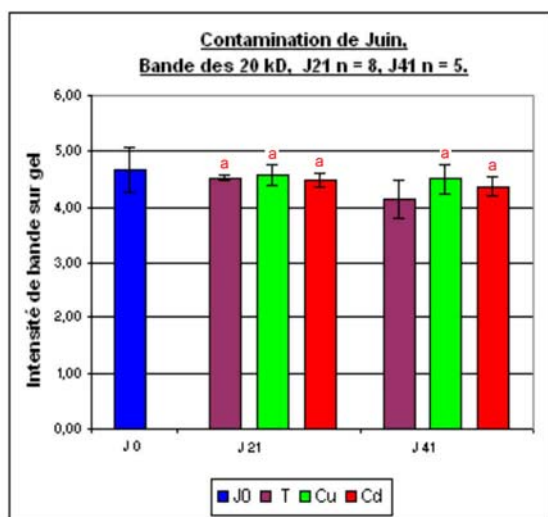


Figure 25

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes



Comme pour les astéries non contaminées, on constate de grandes différences entre les types de normalisations. Les variations les plus intéressantes du point de vue de l'induction des MTs sont les suivantes :

- Augmentation significative de la densité pour toutes les bandes (22 à 6 kD), observée à J7 (octobre), entre les astéries témoins et celles contaminées au Cd (doublement, pour la normalisation par les protéines) (figures 20, 23, 26, 29, 32).

- Augmentation significative de la densité pour la bande des 20 kD, observée à J42 (octobre) et J40 (mars), entre les astéries témoins et celles contaminées au Cu (normalisation par l'intensité totale) (figures 23 et 24).

- Diminution significative de la densité pour la bande des 12 kD, observée à J42 (octobre), entre les astéries témoins et celles contaminées au Cd (normalisation par l'intensité totale) (figure 29).

- Augmentation significative de la densité pour la bande des 12 kD, observée à J20 (mars), entre les astéries non contaminées et les astéries témoins (effet cages) (figure 31).

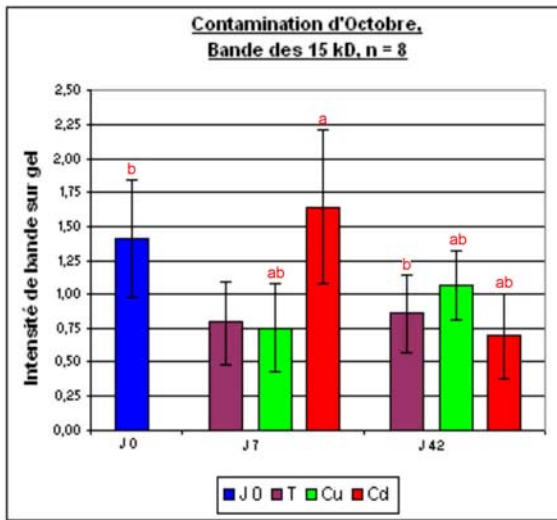
- Augmentation significative de la densité pour la bande des 6 kD, observée à J40 (mars), entre les astéries témoins et celles contaminées au Cd (normalisation par l'intensité totale) (figure 30 et 33).

- Diminution significative de la densité pour la bande des 6 kD, observée à J42 (octobre), entre les astéries témoins et celles contaminées au Cd (normalisation par l'intensité totale) (figure 32).

La valeur de tous les tests statistiques (tests F, tests *t* de Student, ANOVA) se trouvent en annexe, ainsi que les moyennes et les écarts types.

Figure 26

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes

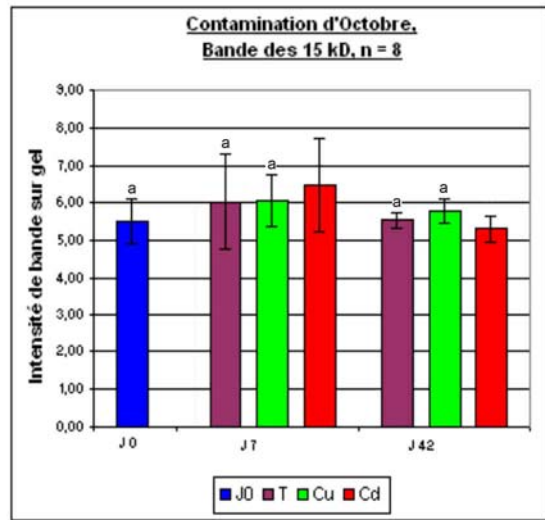
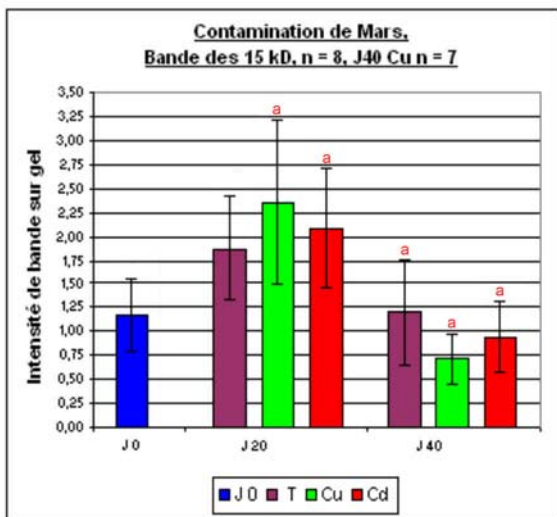


Figure 27

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes

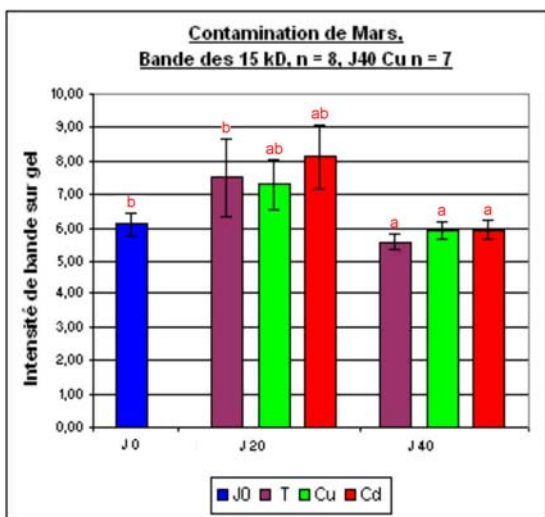
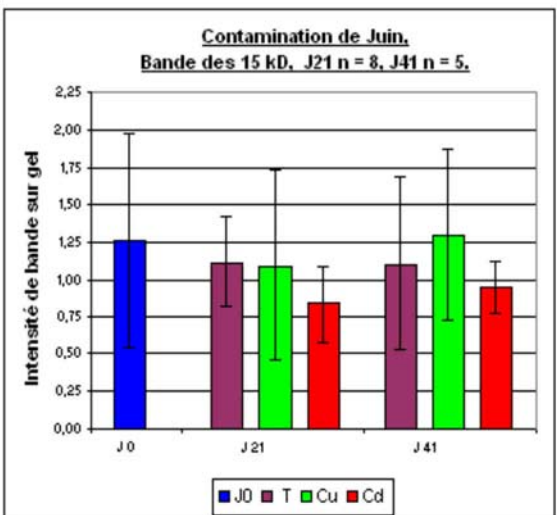


Figure 28

Correction via le contenu en protéines



Correction via la densité totale des bandes

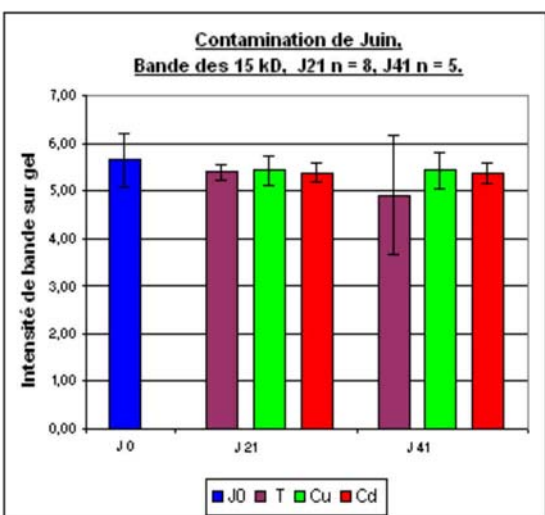


Figure 29

Correction via le contenu en protéines | Correction via la densité totale des bandes

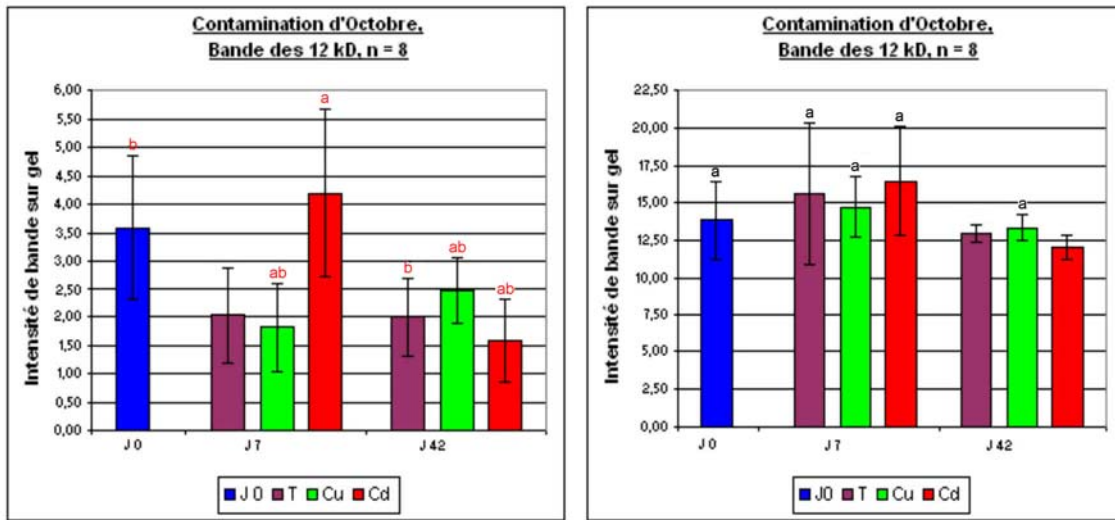


Figure 30

Correction via le contenu en protéines | Correction via la densité totale des bandes

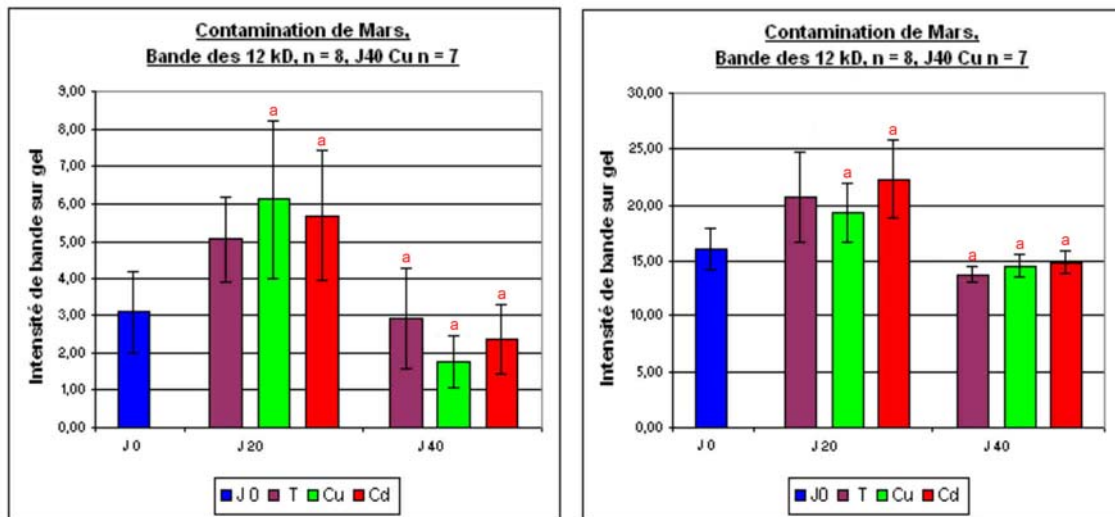


Figure 31

Correction via le contenu en protéines | Correction via la densité totale des bandes

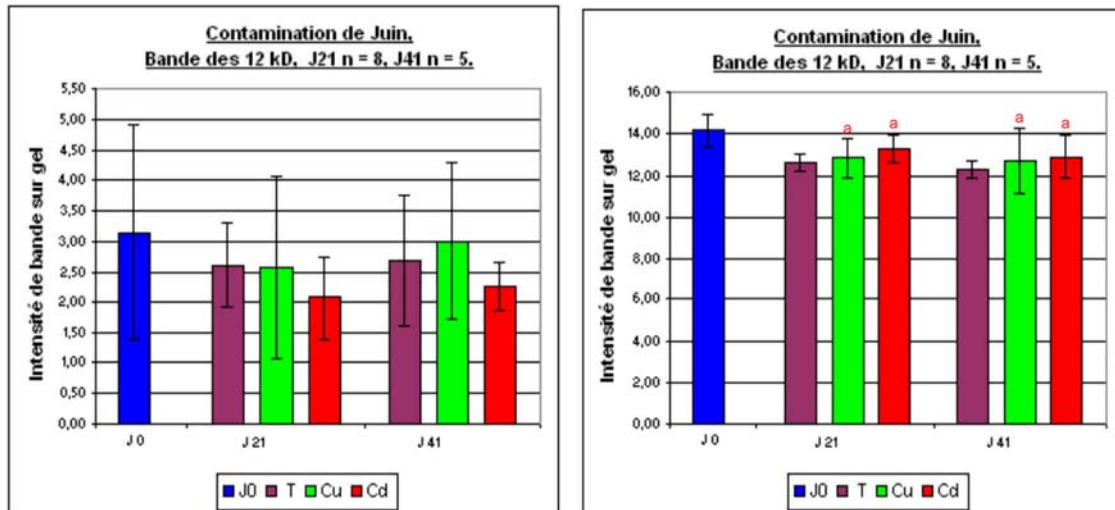


Figure 32

Correction via le contenu en protéines | Correction via la densité totale des bandes

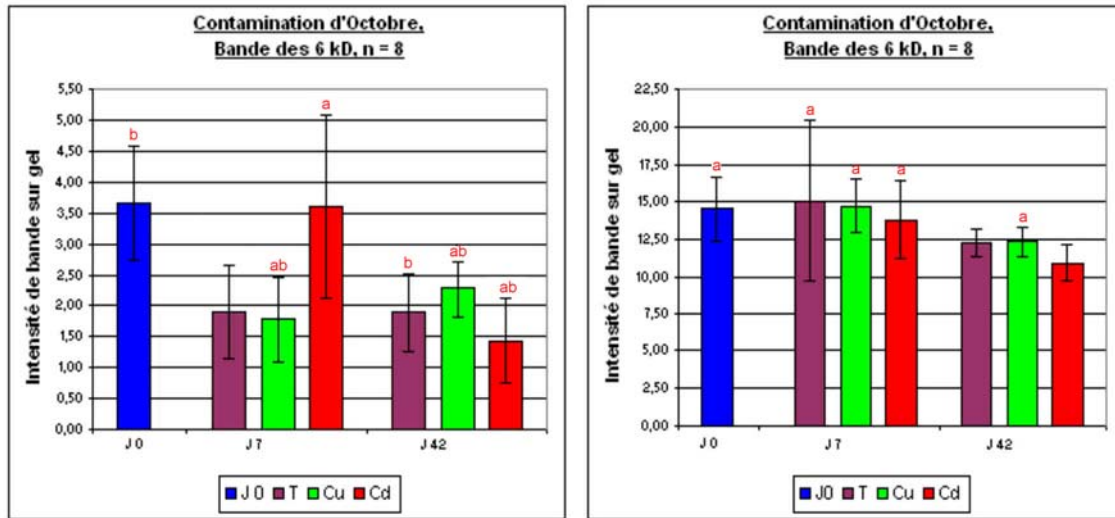


Figure 33

Correction via le contenu en protéines | Correction via la densité totale des bandes

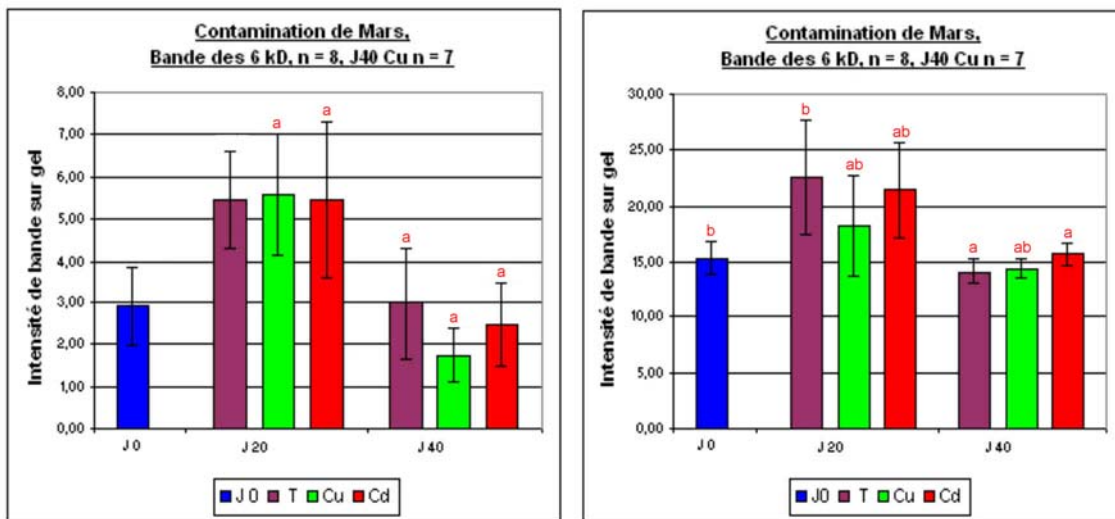


Figure 34

Correction via le contenu en protéines | Correction via la densité totale des bandes

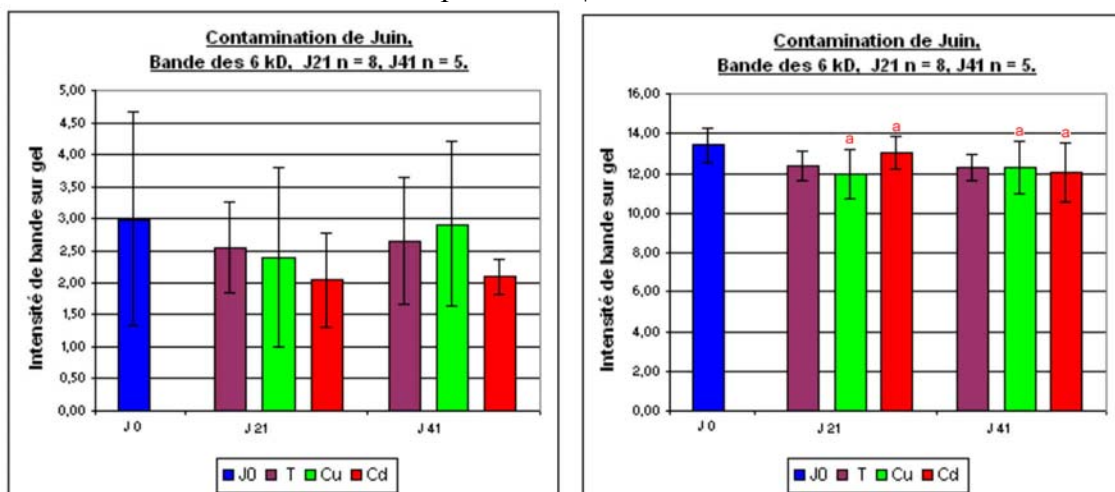


Figure 35

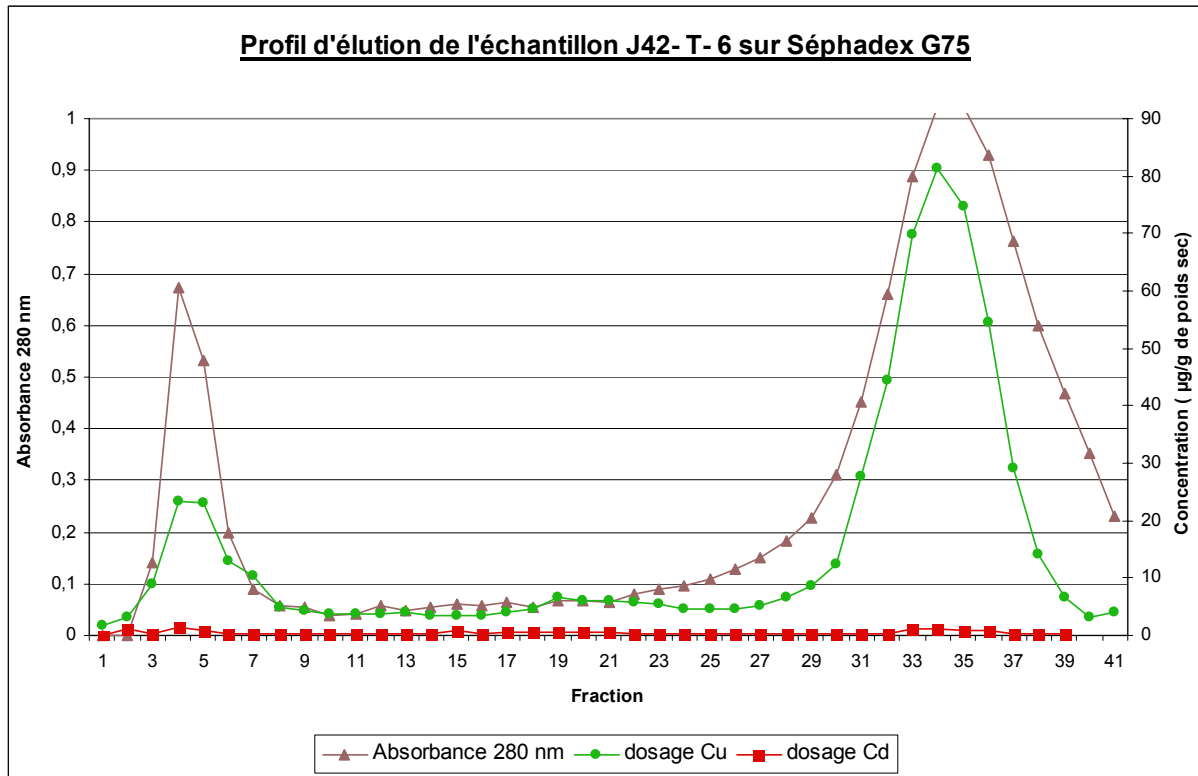
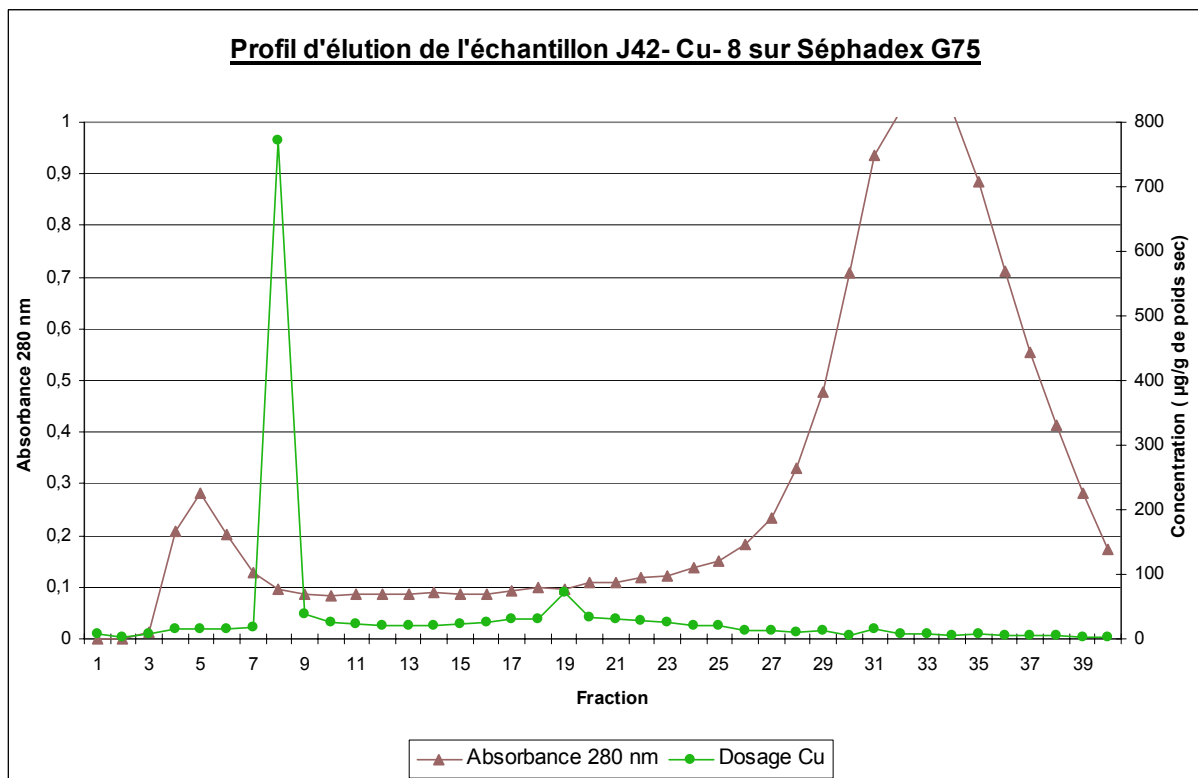


Figure 36



4. Chromatographie

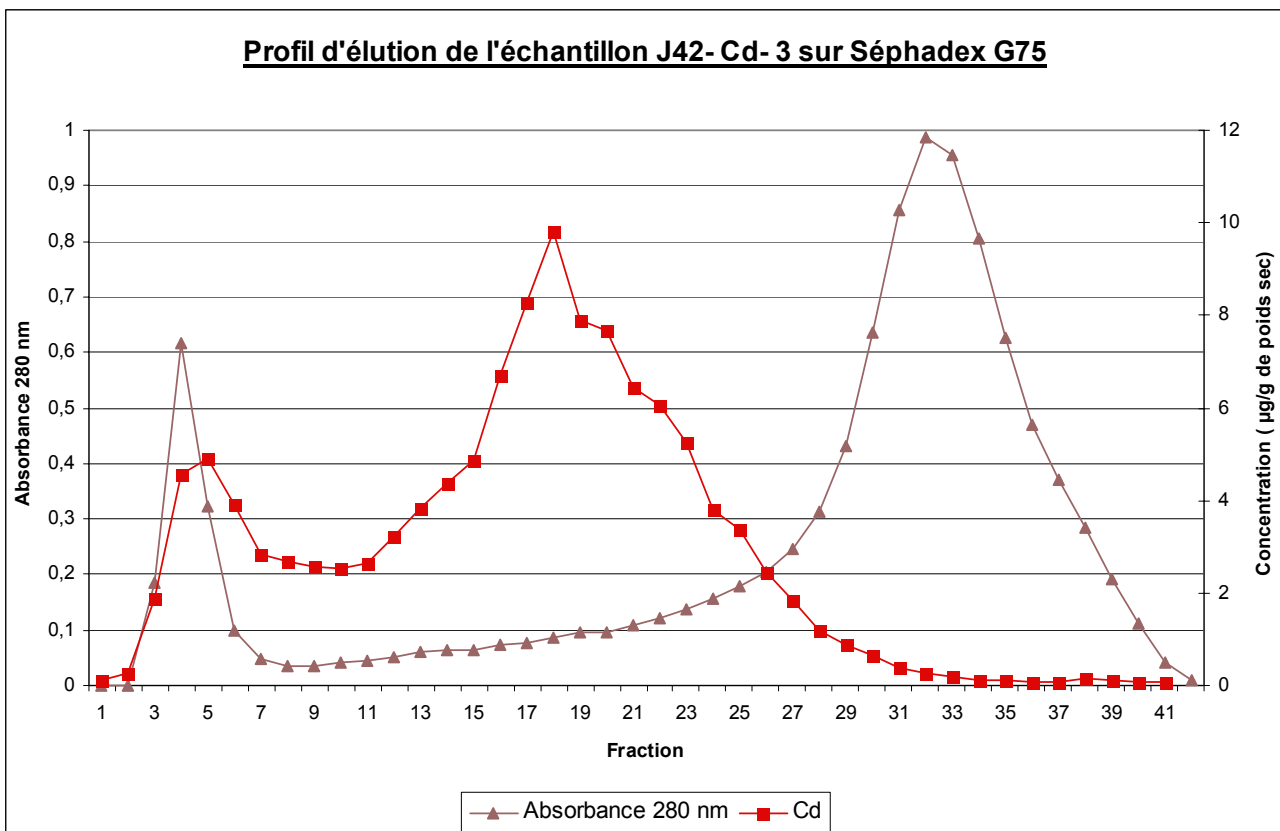
Trois extraits ont été séparés par chromatographie sur Séphadex G-75. Il s'agit des extraits J42- T- 6, J42- Cu- 8 et de J42- Cd- 3. Les chromatogrammes sont représentés dans les figures 35 à 37. Si on regarde les valeurs d'absorbance on constate que les chromatogrammes sont classiques pour des extraits de MTs: un pic d'absorbance, localisé dans les premières fractions (1 à 9) et correspondant aux grosses molécules, une zone de faible absorbance sensé contenir les MTs (fraction 10 à 25), et, un deuxième pic d'absorbance correspondant aux petites molécules (fraction 26 à 41).

Si on dose le Cd dans les fractions de l'échantillon J42- Cd- 3, on observe un pic de Cd dans la zone de faible absorbance (Fig. 37). Ce pic de Cd observé à la figure 37 nous montre que de petites protéines thermostables complexant le Cd (des "MTs") ont bien été induites.

Le dosage du Cu dans les fractions de l'échantillon J42- Cu- 8 ne révèle par contre qu'une très faible induction des MTs.

La figure 38 reprend toutes les données des chromatographies dans un seul graphique.

Figure 37



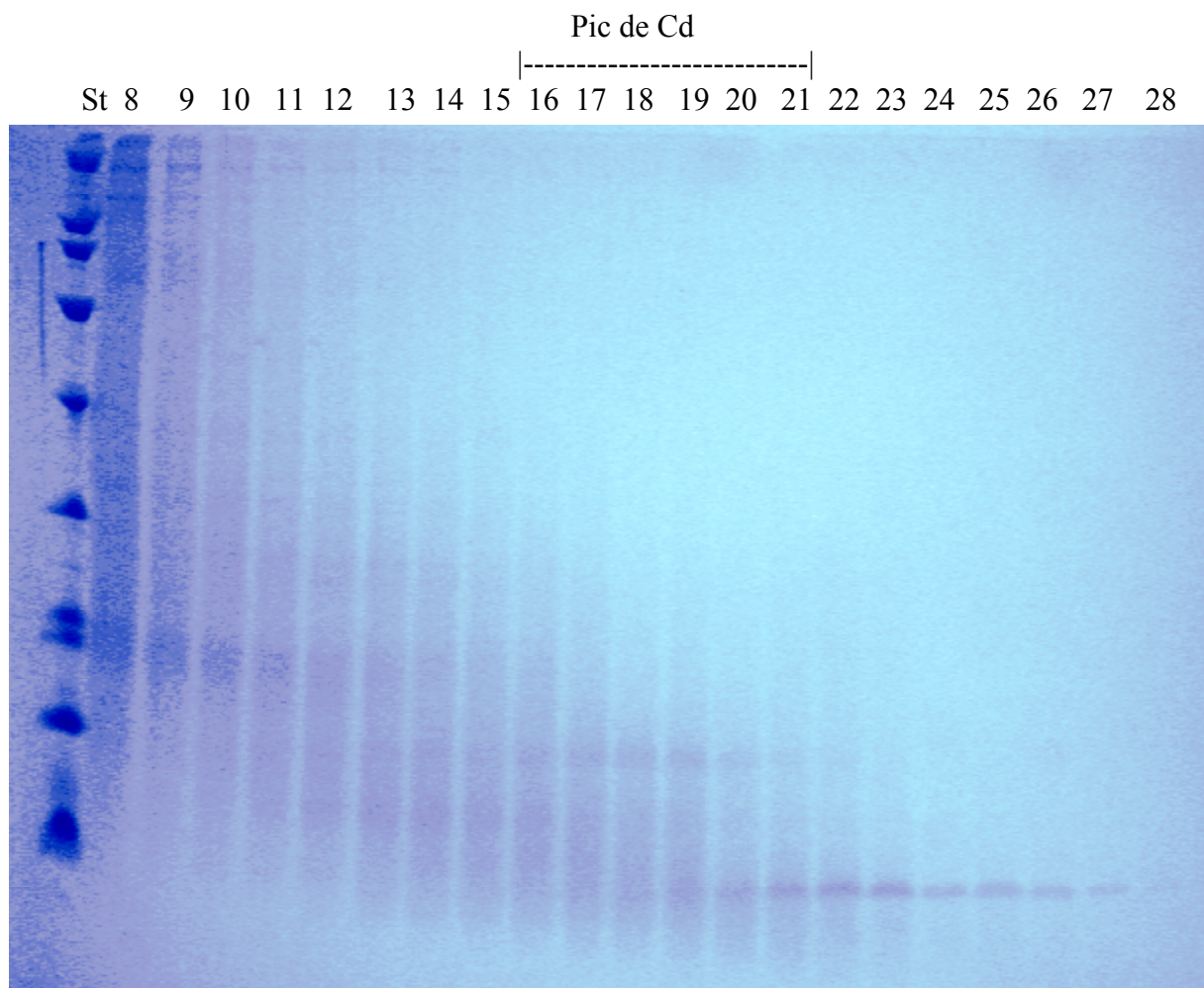


Fig. 39 : Electrophorèse réalisée avec les fractions de chromatographie de l'échantillon 'J42-Cd-3'. Les fractions mises sur le gel sont celles de 3 à 25.

Lorsque les fractions de la chromatographie de l'extrait J42- Cd- 3, sont séparées par électrophorèse SDS-PAGE (les fractions de 1 ml ont tout d'abord été lyophilisées puis ont été resuspendues dans 20 µl de Tris-β.ME-SDS-EDTA-glycérol), on constate que le pic de cadmium observé dans cet extrait (fractions 16 à 19) correspond à la bande de 14 kD (Fig. 39).

Figure 38

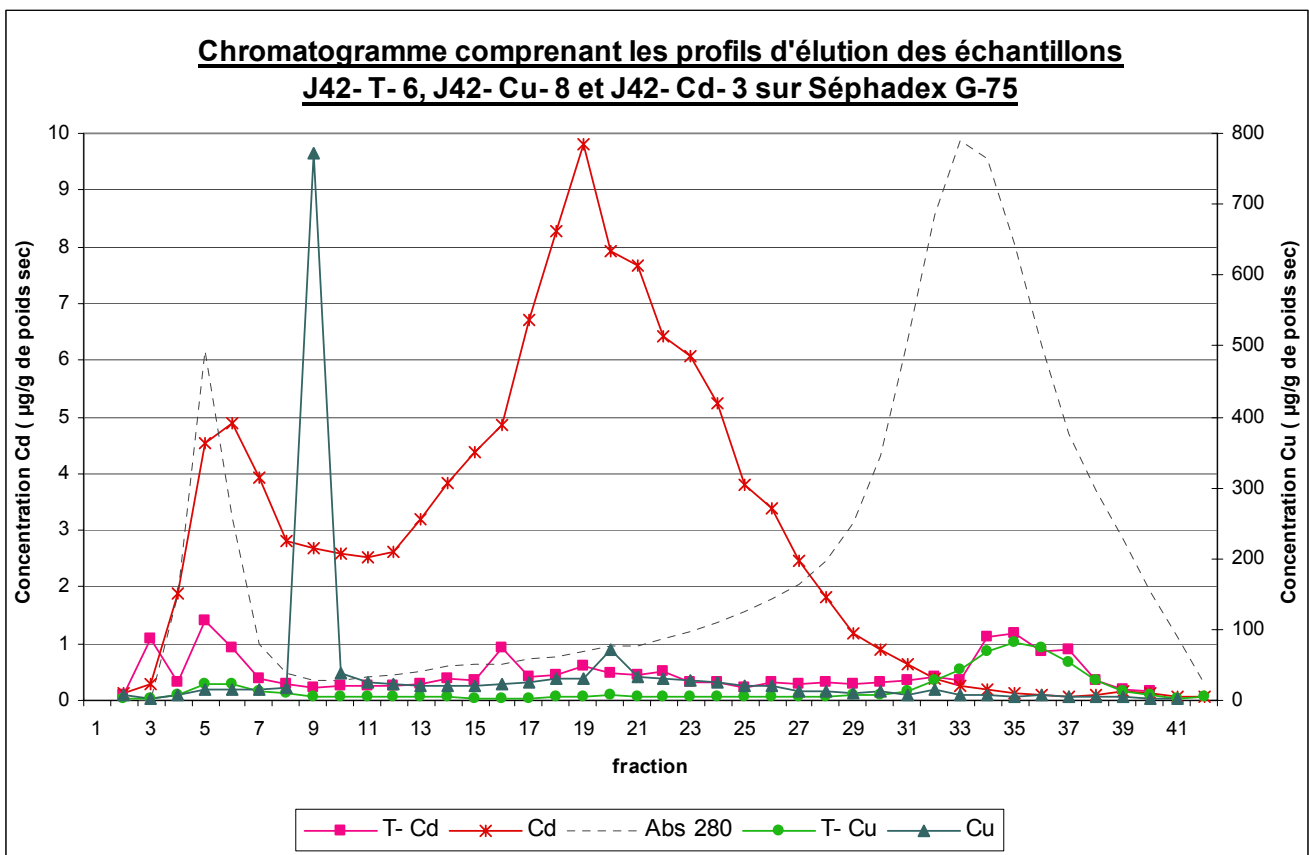


Figure 40

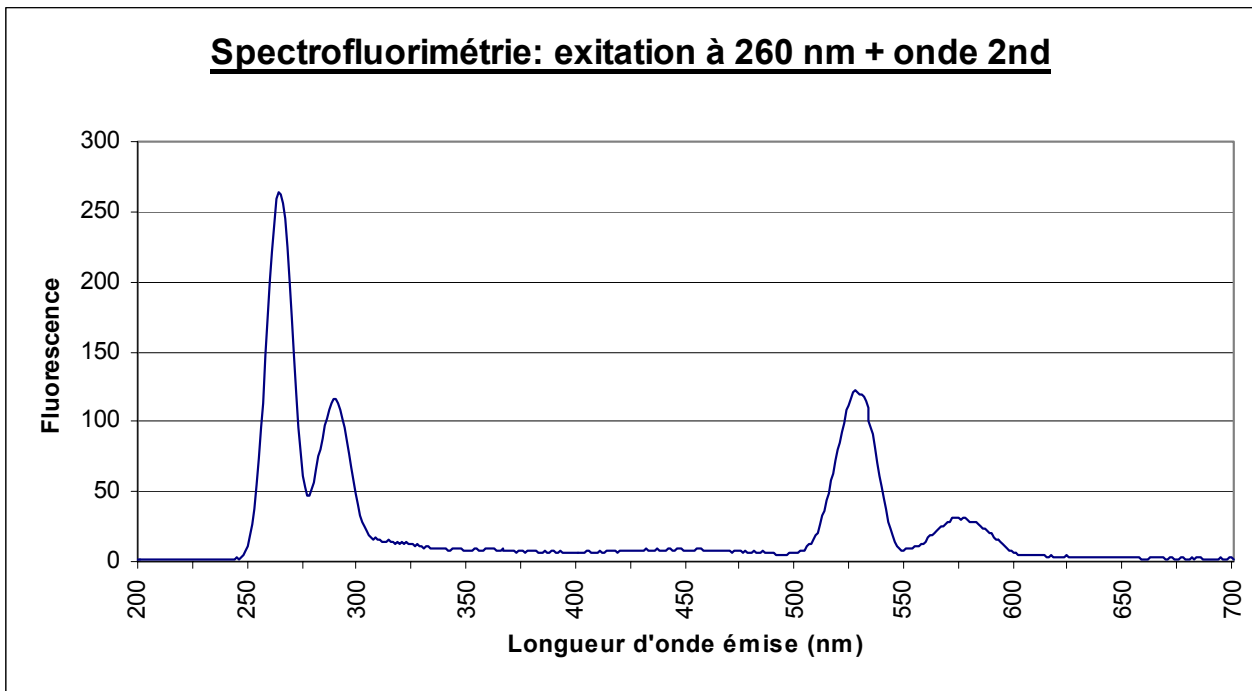
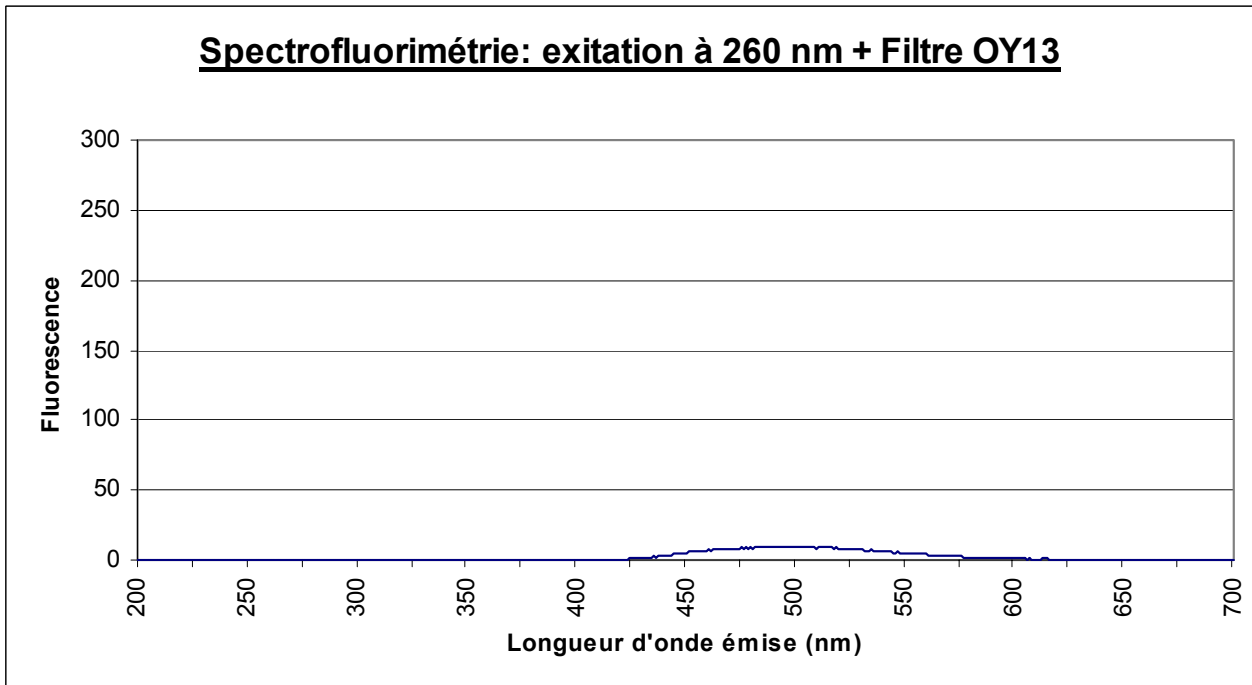


Figure 41



5. Spectrofluorimétrie

Les figures 40, 41 et 43, 44, correspondent à des spectres d'émission suite à une excitation à une longueur d'onde déterminée (260 ou 300 nm).

Les figures 40 et 41 illustrent le problème des ondes de secondes harmoniques, les spectres ayant été obtenus pour un tampon de glycine. L'échelle de fluorescence a été maintenue pour mieux visualiser les différences avant et après la pose du filtre OY13 censé supprimer ces ondes. Rem : les ondes de secondes harmoniques sont générées par certains appareils contenant un réseau optique qui décompose la source lumineuse. Ce phénomène n'existe pas dans les spectrofluorimètres dont la lumière est décomposée par prisme.

La figure 42 montre un spectre d'absorbance d'un échantillon de caecum pylorique d'*Asterias rubens* à une longueur d'onde de 550 nm (filtre OY13 utilisé). L'erreur d'analyse des réseaux utilisés étant de ± 5 nm, cette longueur d'onde inclut les 547 nm qui sont sensés être employés. L'échelle d'absorbance est exprimée en %. On voit que l'échantillon absorbe bien la lumière entre 290 et 300 nm (plutôt qu'à 268 nm). Les mesures ont donc été effectuées par la suite avec une lumière d'excitation de 300 nm.

Figure 42

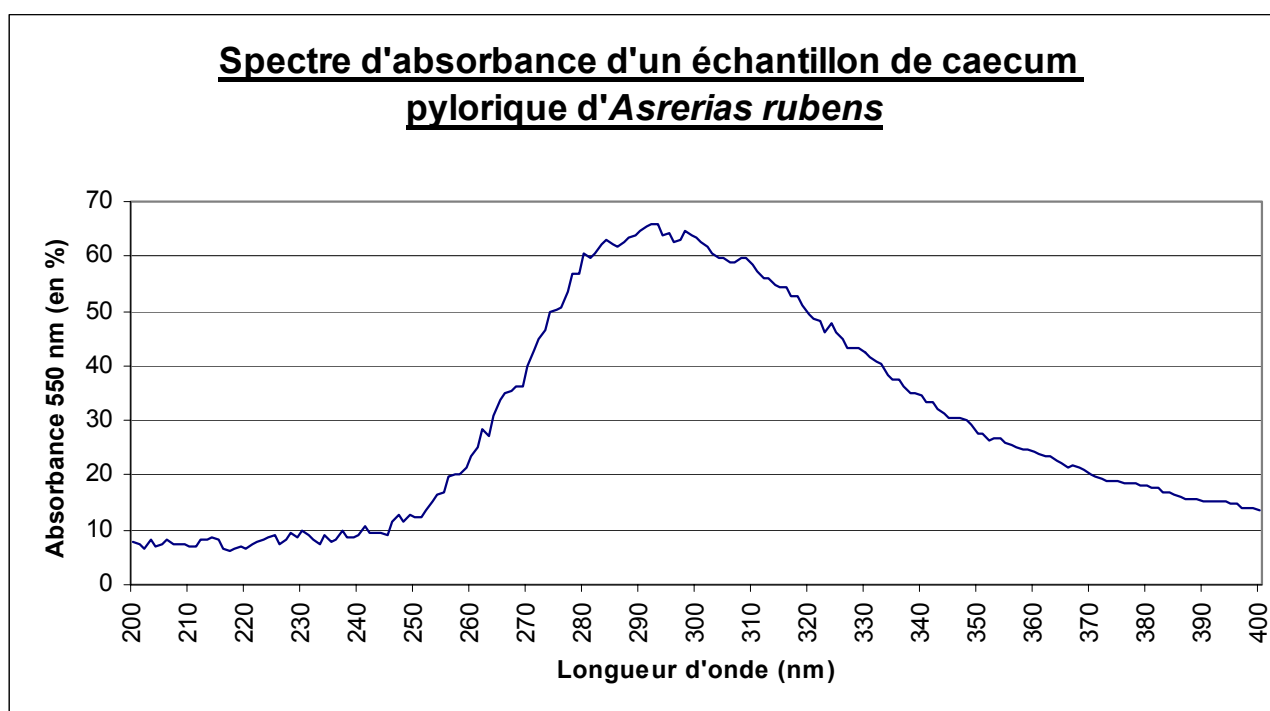


Figure 43

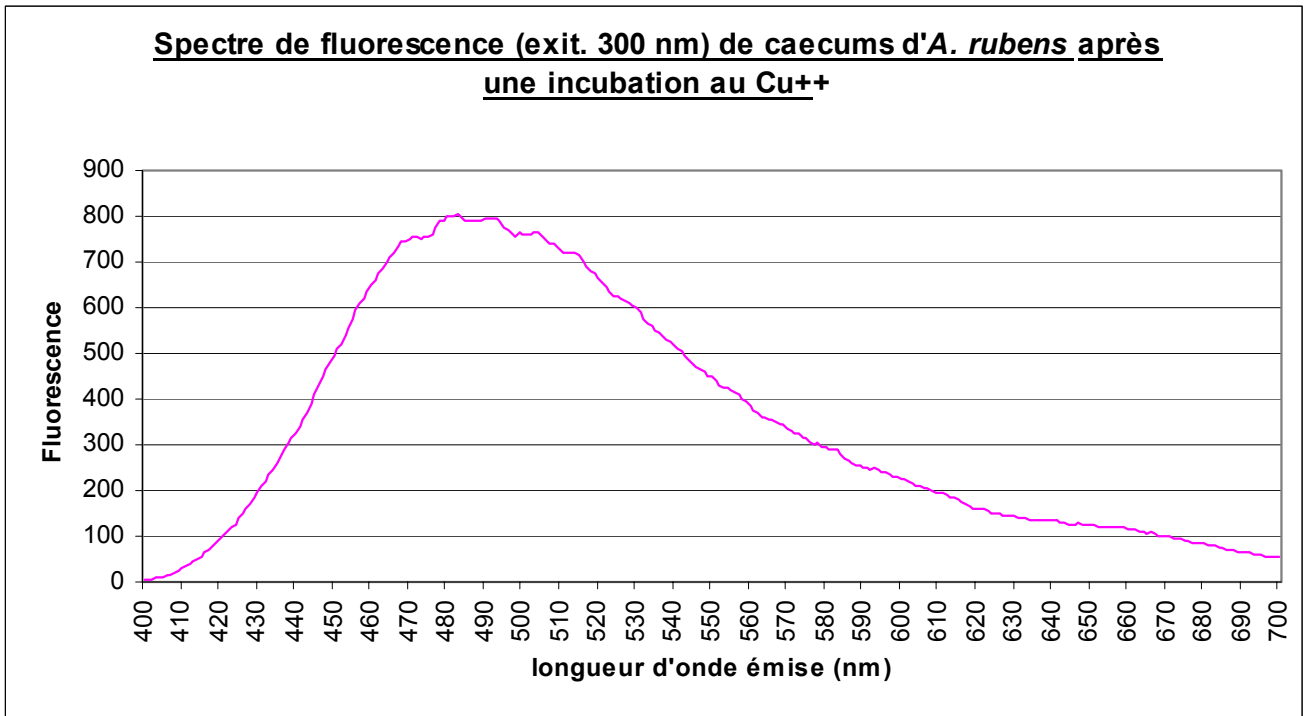
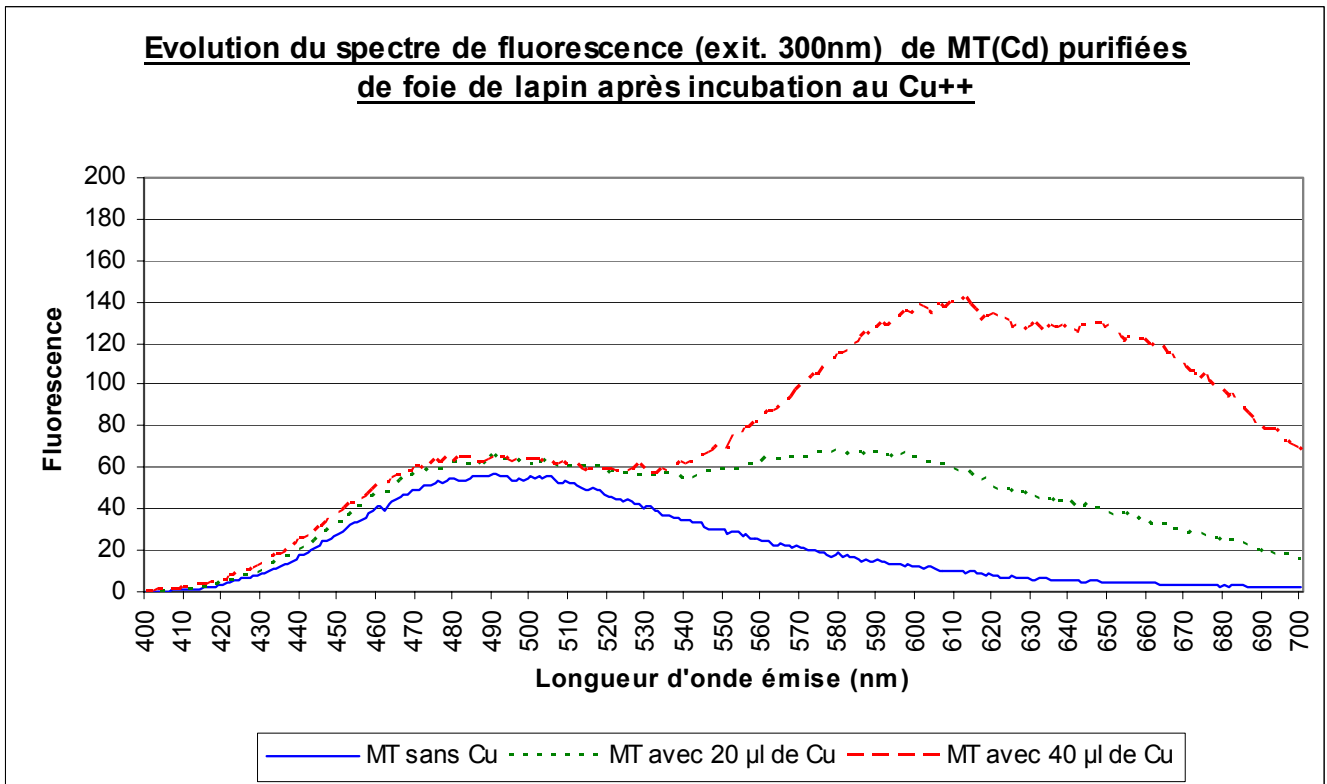


Figure 44



La figure 43 montre le spectre de fluorescence d'un extrait de caecum d'astérie après une incubation en présence de Cu^{2+} , comme décrit dans le protocole. Ce spectre a été obtenu après une excitation à 300 nm. Le pic de fluorescence observé n'est pas situé à 547 nm, comme prévu dans la littérature, mais à 490 nm. De plus, aucune différence n'est observée avec l'échantillon témoin ne contenant pas de cuivre. Le pic de 490 nm n'évolue pas non plus en fonction du temps.

La figure 44 expose les spectres de fluorescence d'un échantillon de MT-I (Cd) de foie de lapin avant et après des incubations au Cu^{2+} , comme décrit dans le protocole. Ces spectres ont été obtenus après une excitation à 300 nm. Sans ajout de Cu^{2+} on constate, comme pour l'extrait de caecums pyloriques, un pic de fluorescence à 490 nm. Après adjonction de 20 μl de Cu^{2+} , on constate l'apparition d'un deuxième pic à 590 nm puis, après adjonction de 40 μl de Cu^{2+} d'un pic à 630 nm.

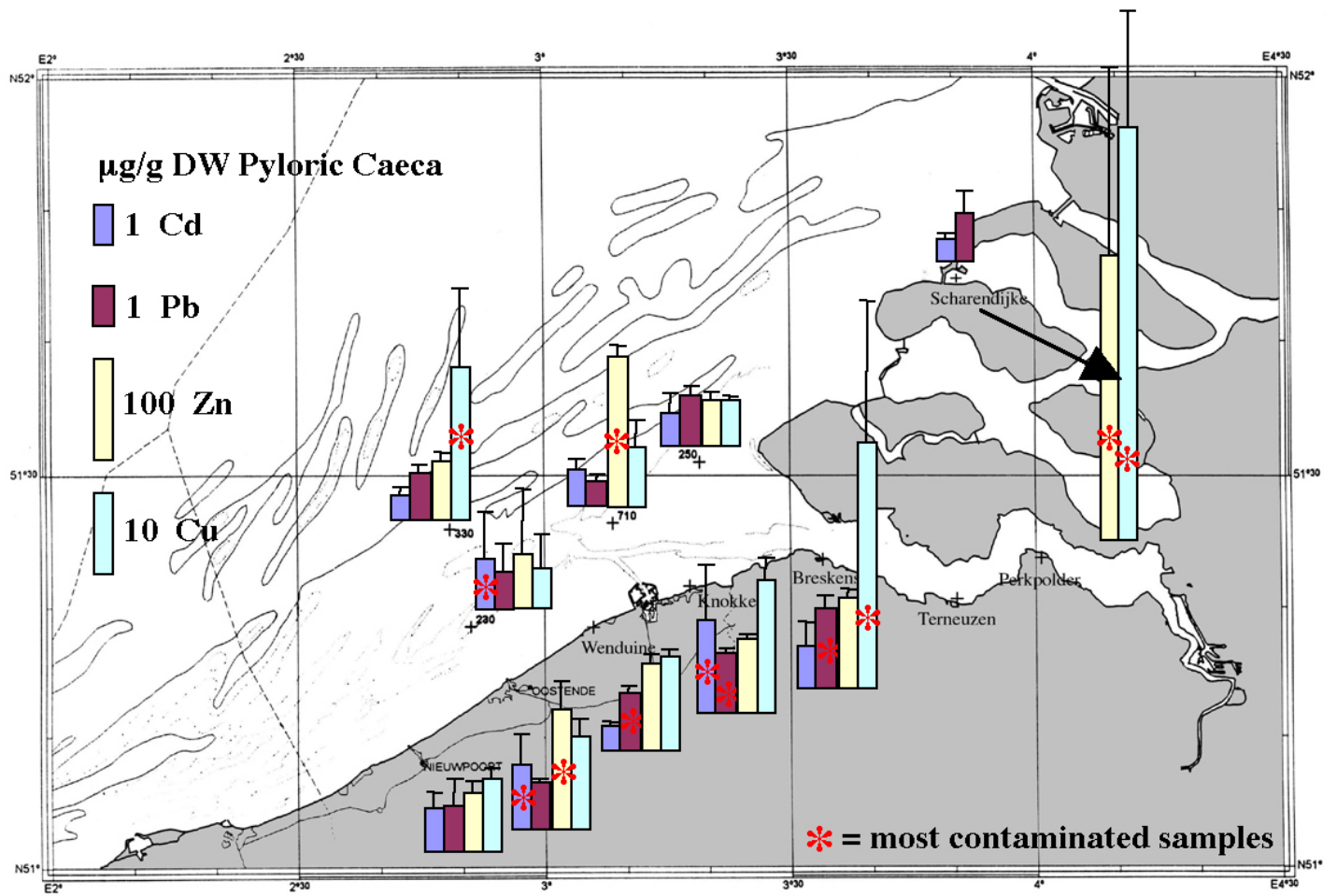


Fig. 45: Contenu en métaux lourds dans les caecums pyloriques d'*Asterias rubens* en mer du Nord.

Chapitre V : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Avant de discuter de la méthode de dosage proposée dans ce travail, il est important de noter que les contaminations expérimentales se sont généralement bien déroulées. Les moules données aux astéries contiennent jusqu'à 200 fois plus de cadmium que les moules prélevées dans l'environnement, et, pour le cuivre, elles en contiennent jusqu'à 4 fois plus (les moules sont très sensibles au cuivre et des mortalités importantes ont été observées si on dépasse $100\mu\text{g de Cu}^{2+} \text{ l}^{-1}$ pour les contaminations). Les astéries ayant consommé ces moules ont des concentrations en Cd dans les caecums pyloriques qui sont au minimum de 15 fois les valeurs observées dans la nature. En ce qui concerne le cuivre, les astéries ont des taux de 1,5 à 2 fois plus que les valeurs "naturelles". Ceci s'explique par le fait que Scharendijke est malheureusement une des zones les plus contaminées en Cu de la mer du Nord (voir Fig. 45). Cette zone a néanmoins été choisie pour sa facilité d'accès et ses faibles concentrations en cadmium dans les astéries.

Pour les contaminations de 40 jours en mars et en juin, une certaine mortalité a été observée, surtout pour la contamination au cadmium. La perte de 50% des astéries contaminées au cadmium en juin (J41) peut avoir été provoquée par une addition de facteurs : forte contamination au cadmium (23 fois plus que le taux de base), augmentation de la température de l'eau, asphyxie due à une colonisation des cages par des algues et des organismes encroûtants. Cette succession d'événements pourrait être la cause de cette mortalité élevée.

L'indice gonadique, très simple à calculer, montre que les 3 expériences de contamination ont bien été effectuées à trois stades différents, c'est-à-dire avant la maturité gonadique, au pic de maturité, et en post-ponte. On peut remarquer que les astéries du site ZD2 récoltées lors de la campagne Belgica 02/09, ont une maturité sexuelle retardée par rapport aux astéries de la côte. Ce fait peut être expliqué par une différence de température de l'eau en profondeur. Une des priorités de ce travail a été d'obtenir des astéries à différents stades de maturité, et cela pour pouvoir tenir compte d'une éventuelle influence saisonnière (due aux hormones) sur l'induction des MTs par les métaux.

Concernant l'évaluation de la technique SDS-PAGE proposée, deux choses importantes sont à souligner: tout d'abord des MTs sont détectables par le système (test effectué avec des MTs de foie de lapin) et ensuite, les extraits préparés contiennent des quantités de MTs qui devraient être visibles sur gel. En effet, le taux de base des MTs dans les caecums pyloriques d'*A. rubens* de Scharendijke est estimé à 4 mg/g de poids sec (Temera et al. 1997). Comme les caecums pyloriques sont constitués d'environ 70 % d'eau (Temara et al. 1997) cela fait 1,2 mg de MT/ g de poids frais. Comme environ 1 g de tissu frais est utilisé pour faire les extraits on peut estimer que ceux-ci contiennent de 0,4 à 0,48 mg de MTs par ml (en fin de préparation l'extrait à un volume de 3 à 2,5 ml). Après lyophilisation de 750 µl et resuspension dans 200 µl de tampon, on peut estimer que 10 µl de cet extrait final (quantité carboxyméthylé et déposée sur gel) contiennent de 15 à 18 µg de MTs. Cette fourchette est un taux de base (astéries témoins) comprenant toutes les pertes de MTs qui auraient pu survenir lors de la préparation. Comme la limite de détection a été estimée à 16 µg de MTs la méthode proposée est donc théoriquement apte à détecter les MTs présentes dans les extraits.

Les résultats de la chromatographie de l'échantillon J42- Cd- 3 montrent très clairement que l'induction des MTs par le cadmium a effectivement bien eu lieu (Fig. 37). De petites protéines thermostables de 14 - 15 kD complexant du cadmium sont donc présentes dans cet extrait alors que l'extrait témoin n'en contient pas. Si on regarde les résultats des analyses SDS-PAGE correspondants (J42) on ne constate aucune différence significative pour la bande 14 kD entre les témoins et les astéries contaminées au cadmium. Ceci signifie que la méthode d'analyse densitométrique proposée présente certains défauts. Tout d'abord, il se pourrait que l'étape de lyophilisation ne soit pas adaptée. En effet lors de la resuspension du résidu lyophilisé dans 200 µl de tampon, la force ionique pourrait être tellement élevée qu'elle provoquerait une précipitation et donc une perte de MTs. Un autre problème pourrait être l'étape de carboxyméthylation. Pour être efficace, elle doit se dérouler à un pH de 8,5. Comme la solution d'acide iodoacétique préparée pour cette carboxyméthylation ne fait que 2 ml (le produit est cher et se dégrade vite), le pH est testé avec un papier pH, ce qui n'est pas très précis. Une mauvaise carboxyméthylation pourrait amener les MTs à polymériser, ce qui fait qu'elles se trouveraient donc dans la partie du gel non analysé. Un troisième problème pourrait être la coloration utilisée. En effet, le bleu de Coomassie G-250 se fixe sur les protéines en partie par interactions électrostatiques entre les groupes SO_3^- du Coomassie et les acides aminés lysine, arginine et histidine, chargés positivement (Tal et al. 1985). La séquence protéique des MTs d'astéries n'est pas encore connue, mais il est raisonnable de penser qu'elle

Fig. 46: Séquence d'acides aminés des MTs d'oursins.

10 20 30 40 50 60
| | | | | |

MT de *Lytechinus pictus*
MPGPDV**K**CFC **C**RDG**K**ECACG GGECCITG**K**C **C**KEGDR**T**CCG **K**CSNAACK**C**A DG**K**CEGACA CTMG**N**CTC

MT de *Paracentrotus lividus*
PDT**K**CVCCQD **G**KQCP**C**AGQ**E** CCITG**K**CC**K**D GASVCCGTCS NAACK**T**GGC **K**CEGGCVCTE GN**C**TC

MTa de *Strongylocentrotus purpuratus*
MPDV**K**CV**C**CK **E**G**K**ECAC**F**GQ **D**CC**K**T**G**EC**C**K **D**GTCCGICTN A**A**C**K**ANG**C**K **C**SGGC**S**TEG **N**C**A**C

MTb de *Strongylocentrotus purpuratus*
MPDV**K**CV**C**CK **E**GN**E**CACTGQ **D**CC**T**IG**K**CC**K** **D**GTCCG**K**CS**N** A**A**C**K**TCADGC **T**CGSGC**S**CTE **G**NC**P**C

MTa de *Sphaerechinus granularis*
PGPDV**K**CVCC **Q**DG**K**EC**P**CK**G** GECCITG**S**CC **K**EGDGLCC**G**K **C**SNAACK**C**AD **G**CKCGSGC**S**C **T**LG**N**CTC

MTb de *Sphaerechinus granularis*
PGPDV**K**CVCC **Q**DG**E**EC**P**CK**G** GECCITG**T**CC **K**EGDGLCC**G**K **C**SNAACK**C**AD **G**CKCGSGC**S**C **T**LG**N**CTC

MT de *Sterechinus neumayeri*
MPDV**K**CV**C**CK **E**G**K**ECAC**K**G**K** **E**CC**T**T**G**EC**C**K **D**GTCCG**K**CTN A**A**C**K**CAD**G**C**K** **C**SGGC**S**TEG **N**C**A**C

Source: Swiss-Prot: http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?MT_LYTPI; http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?MT_PARLI; http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?MTA_STRPU; http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?MTB_STRPU; http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?MTA_SPHGR; http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?MTB_SPHGR ; http://www.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?MT_STENE

Fig 47

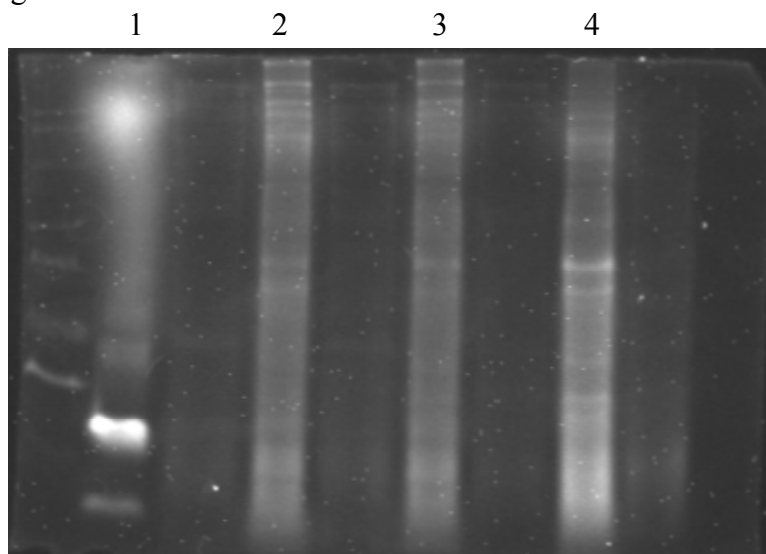


Fig. 47: Test de coloration au bromobimane (Thiolite).

1 : MT-I (Cd) foie lapin,
2 : Extrait J42- T,
3 : Extrait J42- Cu,
4 : Extrait J42- Cd.

se rapproche fortement de celle de l'oursin. Si on regarde ces séquences (Fig. 46), on remarque qu'il n'y a en moyenne que 7 acides aminés chargés positivement sur les 65 qui composent la protéine, alors que les MTs-I de mammifères en contiennent 8 (sur 61). On pourrait donc penser que le bleu de Coomassie n'est pas le colorant le plus adéquat pour la coloration des MTs d'échinodermes. Deux autres colorants ont été essayés dans ce travail, il s'agit de l'argent et du bromobimane. La coloration à l'argent n'était pas très adéquate du fait d'un bruit de fond très élevé, de plus certaines bandes visibles au bleu de Coomassie ne sont pas visibles avec la coloration à l'argent. Les bromobimanes sont des molécules hétérocycliques découvertes en 1978 par Kosower (Kosower et Kosower 1978). Ces molécules ont la propriété d'être fluorescentes lorsqu'elles sont couplées à des groupements thiols. En effet, durant les tests de coloration que j'ai effectués avec du bromobimane, j'ai pu remarquer que les MT-I de foie de lapin présentent une forte fluorescence, malheureusement les extraits de caecums pyloriques non carboxyméthylés ne présentaient qu'un faible signal (Fig. 47). Malgré les trois problèmes soulevés ci-dessus, la méthode électrophorétique SDS-PAGE semble prometteuse pour la détection de MTs. De fait, on peut analyser beaucoup d'échantillons à la fois en peu de temps et à moindre coût. Le problème que pourrait constituer la lyophilisation peut être contourné en employant une autre méthode de concentration: la précipitation à l'éthanol par exemple (Viarengo et al. 1997). Le problème mentionné concernant la carboxyméthylation pourrait être résolu en ajustant le pH de plus grands volumes d'acide iodoacétique avec un pH-mètre. Quant au problème de coloration, il pourrait être résolu par l'emploi de colorants ne dépendant pas du taux d'acides aminés basiques de la protéine. Il existe par exemple le "SYPRO Protein Stain" (RPN5801, Amersham) qui colore le manteau de SDS qui entoure les protéines lors d'une électrophorèse. Il est également possible de coupler le SDS-PAGE avec les techniques immunologiques (emploi d'anti-corps spécifiques dans un Western Blot).

Les deux méthodes de normalisation utilisées dans ce travail, toutes deux utilisant le bleu de Coomassie, mènent à des résultats différents. Ces différences peuvent être expliquées par les pertes qui ont eu lieu entre la resuspension des extraits lyophilisés (les protéines sont dosées dans ces extraits pour le premier type de normalisation) et la photographie des gels (c'est à ce moment qu'a lieu le deuxième type de normalisation). Ces pertes ont lieu lors des divers pipetages ainsi que lors de la carboxyméthylation en elle-même. De ce point de vue, la meilleure méthode de normalisation serait celle qui normalise à la fin, sur gel, via l'intensité totale des bandes. On peut constater d'ailleurs que ce type de normalisation produit

généralement de plus petits écarts-types que la normalisation où l'on dose les protéines dans les extraits. De plus, le SDS employé en électrophorèse déploie les protéines sur gel et permet donc une meilleure exposition (auparavant inaccessible par la structure tertiaire et quaternaire de la protéine) des acides aminés basiques au Coomassie. Il faut remarquer que les méthodes de normalisation se basant sur le contenu en protéines des extraits ne sont peut-être pas les meilleures. En effet, si on prend deux mêmes volumes de caecums pyloriques, l'un provenant d'une astérie qui n'a pas beaucoup mangé et l'autre d'une astérie qui vient de se nourrir, il est évident que la quantité de protéines présentes sera différente. Une normalisation en fonction du poids sec des caecums peut être utilisée, mais deux mêmes poids sec de caecums peuvent également contenir des quantités différentes de protéines. Il faudrait donc utiliser une normalisation se basant sur un élément des caecums pyloriques qui ne varie qu'en fonction du nombre de cellules. L'ADN, variant de façon linéaire en fonction du nombre de cellules, pourrait être utilisé. Cette méthode de normalisation devrait être beaucoup plus précise que celles précédemment citées.

Malgré les problèmes décrits ci-dessus, des différences significatives d'intensité de bande entre astéries témoins et expérimentales ont été remarquées par la méthode SDS-PAGE proposée. Par exemple, pour les échantillons de J7 (octobre) une augmentation significative est observée pour toutes les bandes. S'agit-il de plusieurs protéines induites par le cadmium après seulement 7 jours ou simplement d'un artefact de normalisation ? Seules d'autres expériences de contamination couplées à d'autres méthodes de coloration et de normalisation pourront répondre à cette question. Si elle se confirme cette augmentation significative d'intensité pour les bandes de 22 à 6 kD pourrait être très intéressante pour réaliser un biomonitoring à très court terme (à l'échelle de la semaine).

La méthode de dosage indirecte des MTs par spectrofluorimétrie n'a pas donné de résultats concluants. De nombreux tests ont été effectués avec une MT-I de foie de lapin, mais aucune fluorescence à 547 nm n'a été détectée. Ceci pourrait être expliqué par le fait que c'est le cuivre monovalent qui forme les complexes les plus fluorescents, et que du cuivre bivalent a été employé dans ce travail (Paris-Palacios 2000). De nouveaux essais sont donc envisageables, en utilisant du cuivre monovalent à la place du cuivre bivalent.

Conclusions générales

Ce travail s'est intéressé à l'induction et au dosage des métallothionéines (MTs) chez *Asterias rubens*. Concernant l'induction des MTs, les études chromatographiques réalisées dans ce travail ont démontré qu'une induction de petites protéines thermostables complexant du cadmium (des "MTs") a pu être effectuée dans les cæcums pyloriques d'*Asterias rubens* en nourrissant celles-ci pendant 42 jours avec des moules contaminées au cadmium. L'induction possible des MTs avant 42 jours reste encore à vérifier. De même, bien que les échantillons correspondant à 20 jours de contamination n'ont pas encore été analysés, il semblerait que l'utilisation de moules contaminées au cuivre n'ai mené à aucune induction de MTs après 42 jours. Concernant le dosage des MTs, une méthode directe utilisant l'électrophorèse (SDS-PAGE) a été mise au point. Cette méthode, pouvant détecter des standards de MTs de vertébrés, n'est pas encore apte à détecter les MTs induites chez *Asterias rubens*. Avant de pouvoir utiliser cette méthode en routine pour doser des MTs chez les astéries, il s'agira de résoudre les problèmes qui ont été soulevés. Néanmoins, la méthode électrophorétique proposée semble prometteuse pour la détection des MTs dans de multiples échantillons à la fois en peu de temps et surtout à faible coût.

Bibliographie

- ABEL PD (1991) Approaches to measuring the toxicity of pollutants to marine organisms. In: ABEL PD, AXIAK V (eds) *Ecotoxicology and the Marine Environment*. Ellis Horwood Ltd, New York, pp. 19-38
- BAER KN and THOMAS P (1990) Influence of capture stress, salinity and reproductive status on zinc associated with metallothionein-like proteins in the livers of three marine teleost species. *Mar Environ Res* 29: 277-287
- BELTRAMINI M, MÜNGER K, GERMANN UA, LERCH K (1987) Luminescence emission from the Cu(I)-thiolate complex in metallothioneins. *Experientia Supp. Vol Metallothionein II*. 52: 237-241
- BINZ PA (2002) Metallothionein home page of the department of Biochemistry of the University of Zürich, <http://www.unizh.ch/~mtpage>
- BRDICKA R, BREZINA M, KALOVS V (1933) Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part XXXI - A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. *Collect Czech Chem Commun* 5: 112-128
- BRYAN GW (1984) Pollution due to heavy metals and their compounds. In *Marine Ecology* Vol 5, ed. O. Kinne. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 1289-1431
- CHANG KM (1995) Metallothionein: potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Mar Pollut Bull* 31(4): 411-415
- DALLINGER R, BERGER B, HUNZIKER P, KÄGI JHR (1997). Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature* 388:237
- DEN BESTEN PJ, HERWIG HJ, ZANDEE DI, VOOGT PA (1990) Cadmium accumulation and metallothionein-like proteins in sea star *Asterias rubens*. *Arch. Environ Contam Toxicol* 19: 858-862

FOWLER BA, HILDEBRAND CE, KOJIMA Y, WEBB M (1987) Nomenclature of metallothionein. In: Metallothionein II, edited by J.H.R. Kagi and M. Kojima. Birkhauser-Verlag, Basel, 99. 19-22

GEORGE SG, LANGSTON WJ (1994) Metallothionein as an indicator of water quality – assessment of the bioavailability of cadmium, copper, mercury and zinc in aquatic animals at the cellular level. In : Sutcliffe, DW, editor. *Water and stress indicators in marine and freshwater system: linking levels of organisation*. p 138-153. Amleside, Cumbria: Freshwater Biological Association, 1994.

GEORGE SG (1989) Cadmium effects on plaice liver xenobiotic and metal detoxification systems: dose-response. *Aquatic Toxicology*, 15, 303-310

HAMER DH (1986) Metallothionein. *Ann Rev Biochem* 55: 913-51

HOPKIN SP (1989) *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Barking (UK): Elsevier Applied Science.

JENKINS KD, MASON AZ (1988) Relationships between subcellular distributions of cadmium and perturbations in reproduction in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *Aquatic Toxicology*, 12: 229-244

KÄGI JHR, KOJIMA Y (1987) Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Exp Supp Metallothionein II* 52: 25-61.

KÄGI JHR, HIMMELHOCH SR, WHANGER PD, BETHUNE JL, VALLEE BL (1974) Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition and metal content. *J Biol Chem* 249: 3537-3542.

KÄGI JHR, VASAK M, LERCH K, GILG DEO, HUNZIKER P, et al. 1984. *Environ Health Perspect* 54: 93-103.

KIMURA M, SHINZI K, FUMINORI O (1991) Detection of Carboxymethyl-metallothionein by Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymol* 205:114-119

KOJIMA Y, BERGER C, VALLEE BL, KÄGI JHR (1976) Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-1B. *Proc natn Acad Sci USA* 73: 3413-3417

KOSOWER NS AND KOSOWER EM (1978) Thiol labeling with bromobimanes. *Methods in Enzymol* 143: 76-84

LAWS EA (1993) Metals. In: *Aquatic Pollution: An introductory text*, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, pp. 351-415

LEMOINE S, BIGOT Y, SELLOS D, COSSON RP, LAULIER M (2000) Metallothionein isoforms in *Mytilus edulis* (Mollusca, Bivalvia): Complementary DNA characterization and quantification of expression in different organs after exposure to cadmium, zinc, and copper. *Mar Biotechnol* 2: 195-203

MCCORMICK CC AND LIN LY (1997) Quantification and identification of metallothioneins by gel electrophoresis and silver staining. *Methods in Enzymol* 205: 71-78

NEMER M, WILKINSON DG, TRAVAGLINI EC, STERNBERG EJ, BUTT TR (1985) Sea urchin metallothionein sequence: key to an evolutionary diversity. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 4992-4994

NISBET EG AND FOWLER CMR (1995) Is metal disposal toxic to deep oceans, *Nature* 375:715

OLSSON PE, HAUX C, FÖRLIN I (1987) Variations in hepatic zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol Biochem* 3: 39-47

- OLSSON PE, ZAFARULLAH M, FOSTER R, HAMOR T, GEDAMU L (1990) Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Eur J Biochem 193: 229-235
- OTSUKA F, KOIZUMI S, KIMURA M, OHSAWA M (1988) Silver staining for carboxymethylated metallothioneins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 168:184-192
- PARIS-PALACIOS S, BIAGIANTI-RISBOURG S, FOULEY A, VERNET G (2000) Metallothioneins in liver of *rutilus rutilus* exposed to Cu²⁺, analysis by metal summation, SH determination and spectrofluorimetry. Comp Biochem Physiol Part C 126: 113-122
- ROESIJADI G (1992) Review Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquatic Toxicology 22: 81-114
- SCHÄGGER H and VON JAGOW G (1987) Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal Biochem 166: 368-379
- STONE H and OVERNELL J (1984) Minireview Non-metallothionein cadmium binding proteins. Comp biochem Physiol, Vol. 80C, n° 1, pp. 9-14
- TAL M, SILBERSTEIN A, NUSSER E (1985) Why does Coomassie brilliant blue R Interact differently with different Proteins? J. Biol. Chem. **260**, 9976–9980
- TEMARA A, LEDENT G, WARNAU M, PAUCOT H, JANGOUX M, DUBOIS P (1996) Experimental cadmium contamination of *Asterias rubens* (Echinodermata) Mar Ecol Prog Ser 140: 83-90
- TEMARA A, WARNAU M, DUBOIS P, LANGSTON WJ (1997) Quantification of metallothioneins in the common asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) exposed experimentally or naturally to cadmium. Aquatic Toxicology 38: 17-34

VIARENGO A, PONZANO E, DONDERO F, FABBRI R (1997) A simple spectrophotometric Method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to mediterranean and antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, Vol. 44, n°1, pp. 69-84

VIARENGO A and NOTT JA (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochen Physiol* 104C: 355-372

WALKER CH, HOPKIN SP, SIBLY RM, PEAKALL DB (1996) Principles of ecotoxicology. Taylor & Francis, Gunpowder square, London, pp. 321

WARNAU M (1996) Valeur bioindicative des adultes et effets des contaminations métalliques sur les stades prémétamorphiques de l'échinide *Paracentrotus lividus*, espèce-clé des herbier à *posidonia oceanica* de Méditerranée. Thèse de Doctorat, ULB

Wilkinson dg and Nemer m (1987) Metallothionein gene Mta and MTb expressed under distinct quantitative and tissue-specific regulation in sea urchin embryos. *Mol Cell Biol* 7: 48-58

Annexe

Moyennes et écarts types pour la bande de 22 kD

Expérience I	Vol		n	Vol/ prot		Vol/ lt	
	moyenne	St dév		moyenne	St dév	moyenne	St dév
J0	4,33	0,40	8	1,42	0,39	5,58	0,57
J7 T(Cu)	2,49	0,23	8	0,67	0,24	5,21	1,17
J7 T(Cd)	2,92	0,37	8	1,01	0,21	5,27	1,89
J7 Cu	2,78	0,56	8	0,62	0,27	5,00	0,58
J7 Cd	4,35	0,55	8	1,52	0,53	5,97	1,42
J42 T	2,88	0,41	8	0,73	0,25	4,69	0,20
J42 Cu	2,50	0,13	8	0,92	0,23	4,97	0,31
J42 Cd	2,86	0,21	8	0,59	0,26	4,56	0,24

Expérience II	Vol		n	Vol/ prot		Vol/ lt	
	moyenne	St dév		moyenne	St dév	moyenne	St dév
J0 Belgica	1,99	0,19	8	0,92	0,37	5,13	0,45
J0 Ambleteuse	2,12	0,47	8	0,70	0,16	5,06	0,12
J0	2,42	0,19	8	0,99	0,29	5,20	0,29
J20 T	3,65	0,90	8	1,51	0,46	6,04	0,98
J20 Cu	4,60	0,76	8	1,91	0,70	5,96	0,86
J20 Cd	3,99	1,00	8	1,63	0,59	6,25	0,72
J40 T	2,47	0,29	8	1,13	0,54	5,26	0,28
J40 Cu	2,62	0,29	7	0,68	0,26	5,65	0,38
J40 Cd	2,08	0,12	8	0,89	0,31	5,74	0,44

Expérience III	Vol		n	Vol/ prot		Vol/ lt	
	moyenne	St dév		moyenne	St dév	moyenne	St dév
J0	3,01	0,49	8	1,12	0,62	5,07	0,31
J21 T	2,40	0,33	8	0,96	0,27	4,61	0,06
J21 Cu	2,71	0,28	8	0,99	0,57	4,90	0,23
J21 Cd	1,95	0,13	8	0,74	0,21	4,85	0,29
J41 T	2,59	0,15	5	1,01	0,37	4,67	0,11
J41 Cu	3,19	0,30	5	1,16	0,52	4,85	0,32
J41 Cd	2,75	0,25	5	0,82	0,14	4,67	0,19

Bande des 22 kD	Student		Student		F		F		F			
	DO	*	DO/Prot	*	DO/IT	*	DO	*	DO/Prot	*	DO/IT	*
J0 Oct <-> J0 Ambl	0,0000	*	0,0008	*	0,0363	*	0,6880		0,0279	*	0,0006	*
J0 Oct <-> J0 Mars	0,0000	*	0,0249	*	0,1157		0,0596		0,4682	*	0,1048	
J0 Oct <-> J0 Bel	0,0000	*	0,0200	*	0,1014		0,0722		0,8980		0,5566	
J0 Oct <-> J0 Juin	0,0000	*	0,2640		0,0425	*	0,6105		0,2483		0,1379	
J0 Ambl <-> J0 Mars	0,1340		0,0251	*	0,2411		0,0257	*	0,1200		0,0308	*
J0 Ambl <-> J0 Bel	0,4657		0,1418		0,6788		0,0316	*	0,0366	*	0,0025	*
J0 Ambl <-> J0 Juin	0,0026	*	0,0949		0,9428		0,9135		0,0018	*	0,0222	*
J0 Mars <-> J0 Bel	0,0005	*	0,6973		0,7182		0,9232		0,5490		0,2849	
J0 Mars <-> J0 Juin	0,0120	*	0,5918		0,3988		0,0202	*	0,0675		0,8802	
J0 Bel <-> J0 Juin	0,0004	*	0,4477		0,7535		0,0250	*	0,2019		0,3555	

Bande des 22 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J7 T(Cd)	0,0000 *	0,0186 *	0,6616	0,8160	0,1321	0,0050 *
J0 Oct <-> J7 T(Cu)	0,0000 *	0,0004 *	0,4330	0,1499	0,2141	0,0759
J0 Oct <-> J7 Cd	0,9217	0,6932	0,4898	0,4444	0,4405	0,0274 *
J0 Oct <-> J7 Cu	0,0000 *	0,0003 *	0,0589	0,4167	0,3671	0,9649
J0 Oct <-> J42 T	0,0000 *	0,0007 *	0,0025 *	0,9695	0,2459	0,0137 *
J0 Oct <-> J42 Cd	0,0000 *	0,0002 *	0,0010 *	0,1008	0,3197	0,0390 *
J0 Oct <-> J42 Cu	0,0000 *	0,0074 *	0,0179 *	0,0066 *	0,1993	0,1344
J7 T(Cd) <-> J7 T(Cu)	0,0150 *	0,0100 *	0,9473	0,2219	0,7783	0,2246
J7 T(Cd) <-> J7 Cd	0,0000 *	0,0312 *	0,4131	0,3216	0,0282 *	0,4611
J7 T(Cd) <-> J7 Cu	0,5635	0,0069 *	0,7090	0,2994	0,5261	0,0056 *
J7 T(Cd) <-> J42 T	0,8649	0,0283 *	0,4214	0,7865	0,7132	0,0000 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cd	0,7281	0,0037 *	0,3267	0,1535	0,5900	0,0000 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cu	0,0146 *	0,4588	0,6760	0,0113 *	0,8118	0,0001 *
J7 T(Cu) <-> J7 Cd	0,0000 *	0,0010 *	0,2621	0,0334 *	0,0510	0,6220
J7 T(Cu) <-> J7 Cu	0,2127	0,6939	0,6439	0,0301 *	0,7228	0,0826
J7 T(Cu) <-> J42 T	0,0335 *	0,6569	0,2510	0,1401	0,9311	0,0001 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cd	0,0042 *	0,5320	0,1594	0,8267	0,7959	0,0005 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cu	0,9628	0,0516	0,5861	0,1460	0,9653	0,0024 *
J7 Cd <-> J7 Cu	0,0001 *	0,0008 *	0,1037	0,9614	0,1023	0,0301 *
J7 Cd <-> J42 T	0,0000 *	0,0018 *	0,0380 *	0,4670	0,0608	0,0000 *
J7 Cd <-> J42 Cd	0,0001 *	0,0006 *	0,0256 *	0,0208 *	0,0852	0,0001 *
J7 Cd <-> J42 Cu	0,0000 *	0,0159 *	0,0883	0,0010 *	0,0467 *	0,0007 *
J7 Cu <-> J42 T	0,6715	0,4270	0,1940	0,4385	0,7882	0,0124 *
J7 Cu <-> J42 Cd	0,6900	0,8326	0,0765	0,0186 *	0,9232	0,0356 *
J7 Cu <-> J42 Cu	0,2040	0,0322 *	0,9162	0,0009 *	0,6906	0,1242
J42 T <-> J42 Cu	0,0335 *	0,1246	0,0508	0,0060 *	0,8966	0,2725
J42 T <-> J42 Cd	0,9072	0,3062	0,2411	0,0938	0,8631	0,6328
J42 Cu <-> J42 Cd	0,0008 *	0,0186 *	0,0099 *	0,2117	0,7625	0,5278

J0 Mars <-> J20 T	0,0060 *	0,0162 *	0,0487 *	0,0005 *	0,2624	0,0052 *
J0 Mars <-> J20 Cd	0,0028 *	0,0161 *	0,0038 *	0,0003 *	0,0847	0,0315 *
J0 Mars <-> J20 Cu	0,0001 *	0,0072 *	0,0432 *	0,0016 *	0,0350 *	0,0115 *
J0 Mars <-> J40 T	0,6778	0,5228	0,7103	0,2740	0,1269	0,9135
J0 Mars <-> J40 Cd	0,0006 *	0,5324	0,0127 *	0,2705	0,8643	0,3068
J0 Mars <-> J40 Cu	0,1415	0,0495 *	0,0232 *	0,2626	0,7712	0,5266
J20 T <-> J20 Cd	0,4782	0,6783	0,6274	0,7902	0,5182	0,4304
J20 T <-> J20 Cu	0,0367 *	0,2050	0,8695	0,6579	0,2841	0,7330
J20 T <-> J40 T	0,0073 *	0,1496	0,0615	0,0078 *	0,6663	0,0040 *
J20 T <-> J40 Cd	0,0016 *	0,0068 *	0,4441	0,0000 *	0,3389	0,0521
J20 T <-> J40 Cu	0,0144 *	0,0009 *	0,3262	0,0147 *	0,1835	0,0337 *
J20 Cd <-> J20 Cu	0,1880	0,3996	0,4750	0,4803	0,6630	0,6514
J20 Cd <-> J40 T	0,0031 *	0,1030	0,0052 *	0,0042 *	0,8281	0,0249 *
J20 Cd <-> J40 Cd	0,0009 *	0,0077 *	0,1076	0,0000 *	0,1167	0,2238
J20 Cd <-> J40 Cu	0,0055 *	0,0018 *	0,0688	0,0085 *	0,0609	0,1396
J20 Cu <-> J40 T	0,0000 *	0,0266 *	0,0565	0,0215 *	0,5153	0,0090 *
J20 Cu <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0022 *	0,5251	0,0001 *	0,0500	0,1016
J20 Cu <-> J40 Cu	0,0001 *	0,0012 *	0,3918	0,0353 *	0,0266 *	0,0638
J40 T <-> J40 Cd	0,0055 *	0,2968	0,0210 *	0,0347 *	0,1714	0,2601
J40 T <-> J40 Cu	0,1789	0,1370	0,1719	0,4722	0,2847	0,1973
J40 Cd <-> J40 Cu	0,0020 *	0,1764	0,6836	0,0340 *	0,6511	0,7210

Bande des 22 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Juin <-> J21 T	0,0113 *	0,4974	0,0040 *	0,2939	0,0427 *	0,0002 *
J0 Juin<-> J21 Cd	0,0004 *	0,1371	0,1575	0,0021 *	0,0123 *	0,8448
J0 Juin<-> J21 Cu	0,1557	0,6542	0,2287	0,1465	0,8495	0,4108
J0 Juin <-> J41 T	0,0523	0,7183	0,0192 *	0,0390 *	0,3379	0,0639
J0 Juin<-> J41 Cd	0,3024	0,2160	0,0247 *	0,1979	0,0130 *	0,3595
J0 Juin<-> J41 Cu	0,4728	0,9137	0,2345	0,3666	0,7878	0,9061
J21 T <-> J21 Cd	0,0056 *	0,1046	0,0559	0,0257 *	0,5713	0,0003 *
J21 T <-> J21 Cu	0,0592	0,8898	0,0082 *	0,6707	0,0628	0,0017 *
J21 T <-> J41 T	0,2515	0,7656	0,2430	0,1633	0,4307	0,1187
J21 T <-> J41 Cd	0,0649	0,3189	0,5728	0,6187	0,2385	0,0072 *
J21 T <-> J41 Cu	0,0011 *	0,3659	0,1742	0,9506	0,1191	0,0003 *
J21 Cd <-> J21 Cu	0,0000 *	0,2922	0,6875	0,0625	0,0189 *	0,5284
J21 Cd <-> J41 T	0,0000 *	0,1270	0,2194	0,6456	0,1994	0,0835
J21 Cd <-> J41 Cd	0,0000 *	0,5145	0,2417	0,1287	0,4463	0,4417
J21 Cd <-> J41 Cu	0,0004 *	0,1536	0,9975	0,0485 *	0,0416 *	0,7759
J21 Cu <-> J41 T	0,3982	0,9403	0,0580	0,2728	0,4140	0,1891
J21 Cu <-> J41 Cd	0,7953	0,4491	0,0798	0,8784	0,0172 *	0,7871
J21 Cu <-> J41 Cu	0,0128 *	0,5951	0,7262	0,7654	0,9098	0,4045
J41 T <-> J41 Cd	0,2537	0,3123	0,9723	0,3775	0,0915	0,3185
J41 T <-> J41 Cu	0,0042 *	0,6121	0,2711	0,2116	0,5174	0,0662
J41 Cd <-> J41 Cu	0,0350 *	0,2223	0,3057	0,6941	0,0272 *	0,3491
J21 T <-> J21 T bis	0,1454	0,3147	0,1543	0,4532	0,6194	0,1665
J21 Cd <-> J21 Cd	0,0000 *	0,1065	0,1406	0,6205	0,4567	0,2540
J21 Cu <-> J21 Cu	0,2849	0,8135	0,1319	0,4890	0,9111	0,2525
J0 Oct <-> J0 Oct	0,0009 *	0,1390	0,0788	0,4822	0,3323	0,5252

ANOVA Tukey - Bande des 22 kD**Comparaison période**

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	0,784264	2	0,392132	1,908134	0,173209
Error	4,315618	21	0,205506		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	1,122409	2	0,561205	3,337346	0,055136
Error	3,531338	21	0,168159		

Comparaison site

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	0,380316	2	0,190158	2,311774	0,123763
Error	1,727381	21	0,082256		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	0,079066	2	0,039533	0,391590	0,680815
Error	2,120046	21	0,100955		

ANOVA Dunnett - Bande des 22 kD

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_22\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: PROT N: 24 Multiple R: 0,775 Squared multiple R: 0,600

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_22\$	2,813	2	1,407	15,767	0,000
Error	1,874	21	0,089		

COL/ - ROW OCT_J0_22\$

1 J0 oct

2 J42 T

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT

Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,089 with 21 df. Dunnett One Sided Test.

Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	-0,697
3	-0,752

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,000
3	0,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_22\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: IT N: 24 Multiple R: 0,458 Squared multiple R: 0,210

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_22\$	3,206	2	1,603	2,794	0,084
Error	12,051	21	0,574		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_22\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: PROT1 N: 24 Multiple R: 0,766 Squared multiple R: 0,587

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_22\$	4,058	2	2,029	14,896	0,000
Error	2,860	21	0,136		

COL/ - ROW OCT_J7_22\$

1 J7 Cd

2 J7 Cu

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT1

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,136 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,845
2	-0,051
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000
2	0,945
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_22\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: IT1 N: 24 Multiple R: 0,373 Squared multiple R: 0,139

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_22\$	4,194	2	2,097	1,702	0,207
Error	25,878	21	1,232		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_22\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: PROT2 N: 24 Multiple R: 0,506 Squared multiple R: 0,256

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_22\$	0,441	2	0,220	3,611	0,045
Error	1,282	21	0,061		

COL/ - ROW OCT_J42_22\$
 1 J42 Cd
 2 J42 Cu
 3 J42 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT2

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,061 with 21 df. Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of mean differences from control:

1	-0,135
2	0,195
3	0,000

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,457
2	0,220
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_22\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: IT2 N: 24 Multiple R: 0,587 Squared multiple R: 0,344

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_22\$	0,716	2	0,358	5,510	0,012
Error	1,364	21	0,065		

COL/ - ROW OCT_J42_22\$
 1 J42 Cd
 2 J42 Cu
 3 J42 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT2

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,065 with 21 df. Dunnett Two Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	-0,136	1	0,472
2	0,279	2	0,072
3	0,000	3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_22\$ (3 levels)
J0 mar, J20 T, J40 T

Dep Var: PROT3 N: 24 Multiple R: 0,472 Squared multiple R: 0,222

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_22\$	1,174	2	0,587	3,004	0,071
Error	4,104	21	0,195		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_22\$ (3 levels)
J0 mar, J20 T, J40 T

Dep Var: IT3 N: 24 Multiple R: 0,554 Squared multiple R: 0,307

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_22\$	3,481	2	1,741	4,656	0,021
Error	7,850	21	0,374		

 COL/ - ROW MARS_J0_22\$

1 J0 mars
 2 J20 T
 3 J40 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT3

Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,374 with 21 df. Dunnett One Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000	1	1,000
2	0,834	2	0,012
3	0,055	3	0,488

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_22\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: PROT4 N: 24 Multiple R: 0,287 Squared multiple R: 0,082

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_22\$	0,653	2	0,327	0,940	0,407
Error	7,301	21	0,348		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_22\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: IT4 N: 24 Multiple R: 0,151 Squared multiple R: 0,023

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_22\$	0,360	2	0,180	0,245	0,785
Error	15,399	21	0,733		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_22\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_22\$	3	1	2

Dep Var: PROT5 N: 23 Multiple R: 0,444 Squared multiple R: 0,197

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_22\$	0,769	2	0,385	2,459	0,111
Error	3,128	20	0,156		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_22\$ (4 levels)
 , J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_22\$	3	1	2

Dep Var: IT5 N: 23 Multiple R: 0,522 Squared multiple R: 0,272

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_22\$	1,035	2	0,518	3,737	0,042
Error	2,771	20	0,139		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_22\$ (4 levels)
 , J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J0_22\$	3	1	2

Dep Var: PROT6 N: 21 Multiple R: 0,174 Squared multiple R: 0,030

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_22\$	0,116	2	0,058	0,281	0,758
Error	3,702	18	0,206		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_22\$ (4 levels)
 , J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J0_22\$	3	1	2

Dep Var: IT6 N: 21 Multiple R: 0,748 Squared multiple R: 0,560

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_22\$	0,958	2	0,479	11,456	0,001
Error	0,752	18	0,042		

 COL/ - ROW JUIN_J0_22\$

1 J0 juin
 2 J21 T
 3 J41 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT6

Dunnett Test with control = 2,000

Using model MSE of 0,042 with 18 df. Dunnett One Sided Test.

Matrix of mean differences from control:

1	0,459
2	0,000
3	0,057

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000
2	1,000
3	0,424

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_22\$ (3 levels)
 J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: PROT7 N: 24 Multiple R: 0,286 Squared multiple R: 0,082

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_22\$	0,276	2	0,138	0,932	0,409
Error	3,112	21	0,148		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_22\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: IT7 N: 24 Multiple R: 0,530 Squared multiple R: 0,281

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_22\$	0,376	2	0,188	4,106	0,031
Error	0,962	21	0,046		

COL/ - ROW JUIN_J21_22\$

1 J21 Cd
 2 J21 Cu
 3 J21 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT7

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,046 with 21 df. Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of mean differences from control:

1	0,235
2	0,288
3	0,000

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,071
2	0,025
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_22\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_22\$	3	1	2

Dep Var: PROT8 N: 15 Multiple R: 0,382 Squared multiple R: 0,146

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_22\$	0,293	2	0,146	1,024	0,389
Error	1,714	12	0,143		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_22\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_22\$	3	1	2

Dep Var: IT8 N: 15 Multiple R: 0,390 Squared multiple R: 0,152

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_22\$	0,107	2	0,054	1,078	0,371
Error	0,597	12	0,050		

Moyennes et écarts types pour la bande de 20 kD

Expérience I	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	3,38	0,53	8	1,11	0,33	4,33	0,38
J7 T(Cu)	2,04	0,39	8	0,55	0,21	4,17	0,69
J7 T(Cd)	2,30	0,43	8	0,79	0,17	4,23	1,86
J7 Cu	2,44	0,41	8	0,54	0,23	4,41	0,45
J7 Cd	3,62	0,59	8	1,26	0,43	4,91	0,94
J42 T	2,76	0,42	8	0,69	0,24	4,48	0,16
J42 Cu	2,39	0,11	8	0,88	0,22	4,76	0,23
J42 Cd	2,76	0,23	8	0,57	0,26	4,39	0,21

Expérience II	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0 Belgica	2,13	0,22	8	1,00	0,41	5,52	0,56
J0 Ambleteuse	2,09	0,42	8	0,69	0,15	5,01	0,17
J0	2,25	0,17	8	0,92	0,28	4,83	0,25
J20 T	3,21	0,88	8	1,34	0,45	5,27	0,87
J20 Cu	4,45	0,78	8	1,85	0,71	5,72	0,50
J20 Cd	3,81	0,85	8	1,55	0,50	5,98	0,58
J40 T	2,19	0,31	8	1,00	0,47	4,64	0,16
J40 Cu	2,32	0,35	7	0,60	0,23	4,98	0,29
J40 Cd	1,74	0,16	8	0,75	0,26	4,79	0,20

Expérience III	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	2,79	0,59	8	1,04	0,59	4,67	0,40
J21 T	2,35	0,29	8	0,94	0,26	4,53	0,05
J21 Cu	2,53	0,28	8	0,92	0,54	4,57	0,18
J21 Cd	1,81	0,07	8	0,69	0,20	4,49	0,14
J41 T	2,31	0,30	5	0,91	0,38	4,15	0,34
J41 Cu	2,96	0,26	5	1,07	0,47	4,50	0,27
J41 Cd	2,58	0,29	5	0,77	0,16	4,37	0,16

Bande des 20 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J0 Ambl	0,0001 *	0,0058 *	0,0010 *	0,5626	0,0516	0,0447 *
J0 Oct <-> J0 Mars	0,0003 *	0,2465	0,0075 *	0,0072 *	0,6827	0,3083
J0 Oct <-> J0 Bel	0,0001 *	0,5593	0,0002 *	0,0356 *	0,5896	0,3274
J0 Oct <-> J0 Juin	0,0545	0,7721	0,0969	0,7878	0,1616	0,9066
J0 Ambl <-> J0 Mars	0,3586	0,0591	0,1163	0,0268 *	0,1143	0,2886
J0 Ambl <-> J0 Bel	0,8085	0,0785	0,0385 *	0,1128	0,0161 *	0,0048 *
J0 Ambl <-> J0 Juin	0,0156 *	0,1396	0,0527	0,3990	0,0019 *	0,0350 *
J0 Mars <-> J0 Bel	0,2686	0,6773	0,0069 *	0,4780	0,3469	0,0532
J0 Mars <-> J0 Juin	0,0344 *	0,6184	0,3584	0,0038 *	0,0761	0,2579
J0 Bel <-> J0 Juin	0,0156 *	0,8709	0,0036 *	0,0199 *	0,3769	0,3867

Bande des 20 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J7 T(Cd)	0,0005 *	0,0300 *	0,8893	0,6054	0,1052	0,0004 *
J0 Oct <-> J7 T(Cu)	0,0000 *	0,0012 *	0,5903	0,4416	0,2268	0,1374
J0 Oct <-> J7 Cd	0,3998	0,4644	0,1343	0,7894	0,5119	0,0297 *
J0 Oct <-> J7 Cu	0,0014 *	0,0014 *	0,7073	0,5260	0,3555	0,6658
J0 Oct <-> J42 T	0,0204 *	0,0127 *	0,3112	0,5454	0,3962	0,0377 *
J0 Oct <-> J42 Cd	0,0131 *	0,0028 *	0,6909	0,0401 *	0,5036	0,1281
J0 Oct <-> J42 Cu	0,0010 *	0,1308	0,0153 *	0,0007 *	0,3110	0,1977
J7 T(Cd) <-> J7 T(Cu)	0,2099	0,0247 *	0,9372	0,7975	0,6589	0,0180 *
J7 T(Cd) <-> J7 Cd	0,0002 *	0,0192 *	0,3698	0,4355	0,0278 *	0,0900
J7 T(Cd) <-> J7 Cu	0,5332	0,0299 *	0,8011	0,9053	0,4628	0,0013 *
J7 T(Cd) <-> J42 T	0,0502	0,3863	0,7132	0,9290	0,4178	0,0000 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cd	0,0189 *	0,0673	0,8173	0,1113	0,3229	0,0000 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cu	0,5998	0,3672	0,4509	0,0024 *	0,5198	0,0000 *
J7 T(Cu) <-> J7 Cd	0,0000 *	0,0009 *	0,0937	0,3035	0,0694	0,4414
J7 T(Cu) <-> J7 Cu	0,0630	0,9457	0,4367	0,8905	0,7670	0,2811
J7 T(Cu) <-> J42 T	0,0030 *	0,2109	0,2529	0,8669	0,7086	0,0011 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cd	0,0004 *	0,8498	0,4214	0,1755	0,5783	0,0049 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cu	0,0375 *	0,0079 *	0,0504	0,0046 *	0,8380	0,0089 *
J7 Cd <-> J7 Cu	0,0004 *	0,0011 *	0,1896	0,3704	0,1218	0,0724
J7 Cd <-> J42 T	0,0043 *	0,0063 *	0,2390	0,3861	0,1400	0,0001 *
J7 Cd <-> J42 Cd	0,0037 *	0,0018 *	0,1621	0,0226 *	0,1921	0,0007 *
J7 Cd <-> J42 Cu	0,0005 *	0,0478 *	0,6630	0,0003 *	0,1028	0,0014 *
J7 Cu <-> J42 T	0,1449	0,2119	0,6626	0,9761	0,9381	0,0146 *
J7 Cu <-> J42 Cd	0,0726	0,8093	0,9204	0,1381	0,7941	0,0560
J7 Cu <-> J42 Cu	0,7566	0,0097 *	0,0683	0,0033 *	0,9266	0,0914
J42 T <-> J42 Cu	0,0423 *	0,1291	0,0142 *	0,0030 *	0,8652	0,3859
J42 T <-> J42 Cd	0,9863	0,3347	0,3258	0,1309	0,8545	0,5341
J42 Cu <-> J42 Cd	0,0010 *	0,0218 *	0,0042 *	0,0935	0,7242	0,8024

J0 Mars <-> J20 T	0,0175 *	0,0440 *	0,2081	0,0003 *	0,2519	0,0042 *
J0 Mars <-> J20 Cd	0,0011 *	0,0080 *	0,0005 *	0,0003 *	0,1640	0,0432 *
J0 Mars <-> J20 Cu	0,0001 *	0,0072 *	0,0005 *	0,0006 *	0,0286 *	0,0924
J0 Mars <-> J40 T	0,6681	0,6969	0,1002	0,1228	0,2072	0,2380
J0 Mars <-> J40 Cd	0,0000 *	0,2193	0,7044	0,9411	0,8130	0,5852
J0 Mars <-> J40 Cu	0,6225	0,0318 *	0,3140	0,0787	0,5953	0,7507
J20 T <-> J20 Cd	0,1882	0,3917	0,0758	0,9269	0,7944	0,3084
J20 T <-> J20 Cu	0,0099 *	0,1082	0,2295	0,7465	0,2555	0,1671
J20 T <-> J40 T	0,0137 *	0,1632	0,0839	0,0136 *	0,9030	0,0002 *
J20 T <-> J40 Cd	0,0020 *	0,0061 *	0,1665	0,0002 *	0,1709	0,0011 *
J20 T <-> J40 Cu	0,0261 *	0,0017 *	0,3939	0,0364 *	0,1162	0,0148 *
J20 Cd <-> J20 Cu	0,1382	0,3453	0,3474	0,8167	0,3757	0,7026
J20 Cd <-> J40 T	0,0007 *	0,0401 *	0,0002 *	0,0167 *	0,8895	0,0028 *
J20 Cd <-> J40 Cd	0,0002 *	0,0012 *	0,0004 *	0,0003 *	0,1074	0,0131 *
J20 Cd <-> J40 Cu	0,0012 *	0,0005 *	0,0012 *	0,0433 *	0,0739	0,1033
J20 Cu <-> J40 T	0,0000 *	0,0136 *	0,0004 *	0,0279 *	0,3077	0,0070 *
J20 Cu <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0026 *	0,0008 *	0,0005 *	0,0170 *	0,0305 *
J20 Cu <-> J40 Cu	0,0000 *	0,0012 *	0,0044 *	0,0665	0,0132 *	0,1928
J40 T <-> J40 Cd	0,0026 *	0,2054	0,1443	0,1072	0,1382	0,5162
J40 T <-> J40 Cu	0,2429	0,1569	0,0425 *	0,3492	0,4015	0,0969
J40 Cd <-> J40 Cu	0,0010 *	0,2641	0,1579	0,0682	0,7580	0,4000

Bande des 20 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Juin <-> J21 T	0,0755	0,6588	0,3324	0,0886	0,0480 *	0,0000 *
J0 Juin<-> J21 Cd	0,0020 *	0,1484	0,2470	0,0000 *	0,0120 *	0,0109 *
J0 Juin<-> J21 Cu	0,2677	0,6842	0,5317	0,0686	0,8295	0,0568
J0 Juin <-> J41 T	0,1176	0,6705	0,0351 *	0,2176	0,4072	0,8194
J0 Juin<-> J41 Cd	0,4670	0,2511	0,1405	0,1934	0,0228 *	0,1052
J0 Juin<-> J41 Cu	0,5604	0,9171	0,4139	0,1286	0,6866	0,4575
J21 T <-> J21 Cd	0,0010 *	0,0546	0,4855	0,0013 *	0,5269	0,0197 *
J21 T <-> J21 Cu	0,2289	0,9497	0,4931	0,8951	0,0739	0,0033 *
J21 T <-> J41 T	0,8146	0,8839	0,0724	0,8869	0,3733	0,0001 *
J21 T <-> J41 Cd	0,1944	0,2276	0,1034	0,9522	0,3452	0,0094 *
J21 T <-> J41 Cu	0,0028 *	0,5071	0,8460	0,8339	0,1718	0,0005 *
J21 Cd <-> J21 Cu	0,0000 *	0,2857	0,3062	0,0018 *	0,0195 *	0,4496
J21 Cd <-> J41 T	0,0007 *	0,1959	0,0947	0,0016 *	0,1490	0,0338 *
J21 Cd <-> J41 Cd	0,0000 *	0,4781	0,1903	0,0021 *	0,6485	0,6204
J21 Cd <-> J41 Cu	0,0000 *	0,0634	0,9131	0,0045 *	0,0564	0,1148
J21 Cu <-> J41 T	0,2051	0,9645	0,0142 *	0,7992	0,5064	0,1385
J21 Cu <-> J41 Cd	0,7609	0,4719	0,0693	0,8638	0,0312 *	0,8805
J21 Cu <-> J41 Cu	0,0170 *	0,6183	0,5668	0,9197	0,8189	0,3593
J41 T <-> J41 Cd	0,1860	0,4639	0,2356	0,9429	0,1195	0,1795
J41 T <-> J41 Cu	0,0061 *	0,5600	0,1122	0,7567	0,6882	0,6339
J41 Cd <-> J41 Cu	0,0580	0,2055	0,3842	0,8115	0,0583	0,3676
J21 T <-> J21 T bis	0,0881	0,2923	0,4715	0,5136	0,6375	0,1882
J21 Cd <-> J21 Cd bis	0,0000 *	0,0580	0,7745	0,4180	0,3455	0,1173
J21 Cu <-> J21 Cu bis	0,1717	0,7251	0,5056	0,4917	0,8138	0,3553
J0 Oct <-> J0 Oct bis	0,0574	0,2706	0,3351	0,3498	0,3356	0,8786

ANOVA Tukey - Bande des 20 kD

Comparaison période

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	0,143886	2	0,071943	0,402733	0,673544
Error	3,751370	21	0,178637		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	1,063353	2	0,531677	4,352814	0,026212
Error	2,565055	21	0,122145		

Tukey HSD test; variable IT - Probabilities for Post Hoc Tests

	{1}	{2}	{3}
	4,326655	4,830759	4,672453
J0 oct {1}		0,023199	0,142292
J0 mars {2}	0,023199		0,642698
J0 juin {3}	0,142292	0,642698	

Comparaison site

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	0,416042	2	0,208021	2,275241	0,127530
Error	1,919990	21	0,091428		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	2,033845	2	1,016923	7,529255	0,003425
Error	2,836320	21	0,135063		

Tukey HSD test; variable IT - Probabilities for Post Hoc Tests

	{1}	{2}	{3}
	5,010169	5,518130	4,830759
J0 ambl {1}		0,030085	0,599491
J0 belg {2}	0,030085		0,003411
J0 mars {3}	0,599491	0,003411	

ANOVA Dunnett - Bande des 20 kD

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_20\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: PROT9 N: 24 Multiple R: 0,691 Squared multiple R: 0,478

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_20\$	1,356	2	0,678	9,620	0,001
Error	1,480	21	0,070		

COL/ - ROW OCT_J0_20\$

1 J0 oct

2 J42 T

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT9

Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,070 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	-0,415
3	-0,561

Dunnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,010
3	0,001

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_20\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: IT9 N: 24 Multiple R: 0,279 Squared multiple R: 0,078

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_20\$	0,383	2	0,192	0,889	0,426
Error	4,526	21	0,216		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_20\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: PROT10 N: 24 Multiple R: 0,759 Squared multiple R: 0,576

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_20\$	2,691	2	1,346	14,240	0,000
Error	1,984	21	0,094		

COL/ - ROW OCT_J7_20\$

1 J7 Cd

2 J7 Cu

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT10

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,094 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,707
2	-0,008
3	0,000

Dunnnett One Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000
2	0,499
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_20\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: IT10 N: 24 Multiple R: 0,417 Squared multiple R: 0,174

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_20\$	2,284	2	1,142	2,206	0,135
Error	10,874	21	0,518		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_20\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: PROT11 N: 24 Multiple R: 0,494 Squared multiple R: 0,244

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_20\$	0,391	2	0,195	3,389	0,053
Error	1,211	21	0,058		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_20\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: IT11 N: 24 Multiple R: 0,643 Squared multiple R: 0,413

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_20\$	0,590	2	0,295	7,396	0,004
Error	0,838	21	0,040		

COL/ - ROW OCT_J42_20\$

1 J42 Cd

2 J42 Cu

3 J42 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT11

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,040 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	-0,094
2	0,276
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,551
2	0,022
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_20\$ (3 levels)
J0 mar, J20 T, J40 T

Dep Var: PROT12 N: 24 Multiple R: 0,426 Squared multiple R: 0,181

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_20\$	0,783	2	0,392	2,328	0,122
Error	3,532	21	0,168		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_20\$ (3 levels)
J0 mar, J20 T, J40 T

Dep Var: IT12 N: 24 Multiple R: 0,466 Squared multiple R: 0,217

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_20\$	1,648	2	0,824	2,907	0,077
Error	5,954	21	0,284		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_20\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: PROT13 N: 24 Multiple R: 0,368 Squared multiple R: 0,136

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_20\$	1,041	2	0,521	1,648	0,216
Error	6,633	21	0,316		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_20\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: IT13 N: 24 Multiple R: 0,423 Squared multiple R: 0,179

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_20\$	2,068	2	1,034	2,294	0,126
Error	9,464	21	0,451		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_20\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_20\$	3	1	2

Dep Var: PROT14 N: 23 Multiple R: 0,459 Squared multiple R: 0,210

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_20\$	0,621	2	0,310	2,662	0,094
Error	2,333	20	0,117		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_20\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_20\$	3	1	2

Dep Var: IT14 N: 23 Multiple R: 0,548 Squared multiple R: 0,300

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_20\$	0,412	2	0,206	4,295	0,028
Error	0,960	20	0,048		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_20\$ (3 levels)

J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: PROT15 N: 21 Multiple R: 0,137 Squared multiple R: 0,019

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_20\$	0,066	2	0,033	0,172	0,843
Error	3,440	18	0,191		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_20\$ (3 levels)

J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: IT15 N: 21 Multiple R: 0,588 Squared multiple R: 0,345

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_20\$	0,842	2	0,421	4,746	0,022
Error	1,596	18	0,089		

COL/ - ROW JUIN_J0_20\$

1 J0 juin

2 J21 T

3 J41 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT15

Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,089 with 18 df. Dunnett One Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

	1	0,000		1	1,000
	2	-0,147		2	0,265
	3	-0,519		3	0,006

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_20\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: PROT16 N: 24 Multiple R: 0,313 Squared multiple R: 0,098

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_20\$	0,302	2	0,151	1,137	0,340
Error	2,791	21	0,133		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_20\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: IT16 N: 24 Multiple R: 0,268 Squared multiple R: 0,072

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_20\$	0,029	2	0,015	0,809	0,458
Error	0,379	21	0,018		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_20\$ (3 levels)
J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: PROT17 N: 15 Multiple R: 0,361 Squared multiple R: 0,130

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_20\$	0,229	2	0,115	0,900	0,432
Error	1,527	12	0,127		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_20\$ (3 levels)

J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: IT17 N: 15 Multiple R: 0,513 Squared multiple R: 0,263

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_20\$	0,307	2	0,154	2,138	0,161
Error	0,862	12	0,072		

Moyennes et écarts types pour la bande de 15 kD

Expérience I	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	4,30	0,73	8	1,41	0,44	5,51	0,58
J7 T(Cu)	2,91	0,42	8	0,79	0,31	6,04	1,25
J7 T(Cd)	3,42	0,61	8	1,16	0,21	6,34	2,92
J7 Cu	3,36	0,56	8	0,75	0,32	6,07	0,69
J7 Cd	4,75	0,60	8	1,64	0,57	6,48	1,22
J42 T	3,40	0,47	8	0,86	0,29	5,54	0,21
J42 Cu	2,90	0,13	8	1,07	0,26	5,78	0,31
J42 Cd	3,34	0,22	8	0,69	0,31	5,32	0,34

Expérience II	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0 Belgica	2,77	0,21	8	1,29	0,52	7,20	0,80
J0 Ambleteuse	2,58	0,46	8	0,85	0,19	6,21	0,37
J0	2,85	0,23	8	1,17	0,39	6,12	0,35
J20 T	4,49	0,96	8	1,87	0,54	7,50	1,14
J20 Cu	5,66	0,92	8	2,35	0,87	7,30	0,74
J20 Cd	5,15	1,04	8	2,09	0,63	8,13	0,95
J40 T	2,64	0,39	8	1,20	0,56	5,59	0,22
J40 Cu	2,76	0,38	7	0,71	0,26	5,93	0,26
J40 Cd	2,16	0,23	8	0,94	0,37	5,94	0,28

Expérience III	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	3,39	0,76	8	1,26	0,71	5,65	0,56
J21 T	2,80	0,32	8	1,12	0,30	5,40	0,15
J21 Cu	3,01	0,32	8	1,09	0,63	5,44	0,30
J21 Cd	2,17	0,08	8	0,83	0,26	5,39	0,20
J41 T	2,74	0,73	5	1,11	0,58	4,92	1,24
J41 Cu	3,58	0,24	5	1,30	0,58	5,45	0,38
J41 Cd	3,17	0,33	5	0,95	0,18	5,38	0,22

Bande des 15 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J0 Ambl	0,0001 *	0,0082 *	0,0119 *	0,2529	0,0443 *	0,2684
J0 Oct <-> J0 Mars	0,0005 *	0,2660	0,0233 *	0,0073 *	0,7722	0,2071
J0 Oct <-> J0 Bel	0,0004 *	0,6294	0,0003 *	0,0036 *	0,6473	0,4126
J0 Oct <-> J0 Juin	0,0268 *	0,6073	0,6317	0,9178	0,2171	0,9399
J0 Ambl <-> J0 Mars	0,1707	0,0558	0,6104	0,0886	0,0791	0,8706
J0 Ambl <-> J0 Bel	0,3017	0,0522	0,0066 *	0,0500	0,0164 *	0,0617
J0 Ambl <-> J0 Juin	0,0225 *	0,1608	0,0332 *	0,2145	0,0025 *	0,3009
J0 Mars <-> J0 Bel	0,5228	0,6079	0,0059 *	0,7730	0,4572	0,0443 *
J0 Mars <-> J0 Juin	0,0885	0,7744	0,0649	0,0057 *	0,1323	0,2340
J0 Bel <-> J0 Juin	0,0583	0,9079	0,0005 *	0,0028 *	0,4279	0,3720

Bande des 15 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J7 T(Cd)	0,0199 *	0,1674	0,4537	0,6454	0,0696	0,0003 *
J0 Oct <-> J7 T(Cu)	0,0003 *	0,0053 *	0,3003	0,1701	0,3698	0,0573
J0 Oct <-> J7 Cd	0,1999	0,3783	0,0628	0,6285	0,5043	0,0651
J0 Oct <-> J7 Cu	0,0111 *	0,0038 *	0,1002	0,4964	0,4323	0,6453
J0 Oct <-> J42 T	0,0109 *	0,0097 *	0,8974	0,2838	0,3137	0,0164 *
J0 Oct <-> J42 Cd	0,0067 *	0,0018 *	0,4344	0,0058 *	0,3681	0,1949
J0 Oct <-> J42 Cu	0,0008 *	0,0731	0,2735	0,0002 *	0,1811	0,1296
J7 T(Cd) <-> J7 T(Cu)	0,0666	0,0129 *	0,7902	0,3511	0,3312	0,0399 *
J7 T(Cd) <-> J7 Cd	0,0006 *	0,0522	0,9078	0,9810	0,0168 *	0,0348 *
J7 T(Cd) <-> J7 Cu	0,8205	0,0085 *	0,8037	0,8239	0,2792	0,0011 *
J7 T(Cd) <-> J42 T	0,9387	0,0300 *	0,4633	0,5335	0,3892	0,0000 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cd	0,7224	0,0027 *	0,3576	0,0167 *	0,3327	0,0000 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cu	0,0452 *	0,4166	0,6012	0,0006 *	0,6029	0,0000 *
J7 T(Cu) <-> J7 Cd	0,0000 *	0,0022 *	0,4877	0,3632	0,1253	0,9490
J7 T(Cu) <-> J7 Cu	0,0881	0,7999	0,9463	0,4744	0,9088	0,1378
J7 T(Cu) <-> J42 T	0,0434 *	0,6653	0,3045	0,7517	0,9091	0,0001 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cd	0,0213 *	0,5145	0,1580	0,1159	0,9974	0,0029 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cu	0,9715	0,0711	0,5844	0,0061 *	0,6456	0,0016 *
J7 Cd <-> J7 Cu	0,0003 *	0,0017 *	0,4264	0,8425	0,1537	0,1542
J7 Cd <-> J42 T	0,0002 *	0,0037 *	0,0678	0,5490	0,1016	0,0001 *
J7 Cd <-> J42 Cd	0,0002 *	0,0009 *	0,0325 *	0,0177 *	0,1246	0,0034 *
J7 Cd <-> J42 Cu	0,0000 *	0,0201 *	0,1548	0,0006 *	0,0516	0,0019 *
J7 Cu <-> J42 T	0,8614	0,4982	0,0699	0,6875	0,8191	0,0056 *
J7 Cu <-> J42 Cd	0,9396	0,6988	0,0156 *	0,0273 *	0,9063	0,0852
J7 Cu <-> J42 Cu	0,0543	0,0468 *	0,2890	0,0010 *	0,5664	0,0535
J42 T <-> J42 Cu	0,0201 *	0,1502	0,0993	0,0029 *	0,7291	0,3175
J42 T <-> J42 Cd	0,7412	0,2792	0,1452	0,0632	0,9116	0,2206
J42 Cu <-> J42 Cd	0,0003 *	0,0179 *	0,0150 *	0,1779	0,6478	0,8138

J0 Mars <-> J20 T	0,0017 *	0,0101 *	0,0106 *	0,0012 *	0,4054	0,0056 *
J0 Mars <-> J20 Cd	0,0003 *	0,0035 *	0,0003 *	0,0007 *	0,2310	0,0171 *
J0 Mars <-> J20 Cu	0,0000 *	0,0036 *	0,0011 *	0,0017 *	0,0515	0,0661
J0 Mars <-> J40 T	0,2144	0,9211	0,0027 *	0,1969	0,3594	0,2322
J0 Mars <-> J40 Cd	0,0000 *	0,2303	0,2784	0,9551	0,8729	0,6052
J0 Mars <-> J40 Cu	0,5810	0,0203 *	0,2573	0,2265	0,3607	0,4693
J20 T <-> J20 Cd	0,2090	0,4763	0,2493	0,8407	0,7044	0,6330
J20 T <-> J20 Cu	0,0255 *	0,2113	0,6805	0,8977	0,2383	0,2711
J20 T <-> J40 T	0,0007 *	0,0278 *	0,0019 *	0,0278 *	0,9307	0,0003 *
J20 T <-> J40 Cd	0,0002 *	0,0012 *	0,0057 *	0,0011 *	0,3235	0,0016 *
J20 T <-> J40 Cu	0,0010 *	0,0002 *	0,0056 *	0,0356 *	0,0998	0,0019 *
J20 Cd <-> J20 Cu	0,3125	0,5057	0,0699	0,7420	0,4163	0,5254
J20 Cd <-> J40 T	0,0001 *	0,0097 *	0,0001 *	0,0179 *	0,7697	0,0009 *
J20 Cd <-> J40 Cd	0,0001 *	0,0005 *	0,0002 *	0,0006 *	0,1774	0,0051 *
J20 Cd <-> J40 Cu	0,0002 *	0,0001 *	0,0002 *	0,0241 *	0,0505	0,0053 *
J20 Cu <-> J40 T	0,0000 *	0,0071 *	0,0002 *	0,0366 *	0,2729	0,0045 *
J20 Cu <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0020 *	0,0009 *	0,0015 *	0,0370 *	0,0223 *
J20 Cu <-> J40 Cu	0,0000 *	0,0008 *	0,0008 *	0,0455 *	0,0100 *	0,0197 *
J40 T <-> J40 Cd	0,0087 *	0,2877	0,0154 *	0,1792	0,2842	0,4884
J40 T <-> J40 Cu	0,2802	0,1567	0,0341 *	0,3852	0,4394	0,5497
J40 Cd <-> J40 Cu	0,0022 *	0,2023	0,9427	0,2071	0,4427	0,8127

Bande des 15 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Juin <-> J21 T	0,0725	0,6155	0,2506	0,0399 *	0,0385 *	0,0029 *
J0 Juin<-> J21 Cd	0,0026 *	0,1499	0,2466	0,0000 *	0,0165 *	0,0132 *
J0 Juin<-> J21 Cu	0,2207	0,6371	0,3666	0,0360 *	0,7628	0,1241
J0 Juin <-> J41 T	0,1570	0,6969	0,1707	0,9937	0,7148	0,0670
J0 Juin<-> J41 Cd	0,5652	0,2715	0,3319	0,1218	0,0181 *	0,0915
J0 Juin<-> J41 Cu	0,5207	0,9148	0,4894	0,0418 *	0,7090	0,4657
J21 T <-> J21 Cd	0,0007 *	0,0671	0,9420	0,0017 *	0,6971	0,5245
J21 T <-> J21 Cu	0,2178	0,9359	0,7159	0,9600	0,0712	0,0956
J21 T <-> J41 T	0,8428	0,9687	0,4424	0,0615	0,1341	0,0000 *
J21 T <-> J41 Cd	0,0687	0,2871	0,8829	0,9311	0,3263	0,3753
J21 T <-> J41 Cu	0,0007 *	0,4616	0,7908	0,5788	0,1362	0,0395 *
J21 Cd <-> J21 Cu	0,0001 *	0,3090	0,6951	0,0019 *	0,0320 *	0,2850
J21 Cd <-> J41 T	0,1558	0,2650	0,4490	0,0000 *	0,0672	0,0001 *
J21 Cd <-> J41 Cd	0,0019 *	0,4212	0,9402	0,0025 *	0,4911	0,7403
J21 Cd <-> J41 Cu	0,0001 *	0,0687	0,7281	0,0155 *	0,0684	0,1287
J21 Cu <-> J41 T	0,3778	0,9763	0,4075	0,0559	0,9056	0,0021 *
J21 Cu <-> J41 Cd	0,3829	0,5475	0,7093	0,8975	0,0282 *	0,5732
J21 Cu <-> J41 Cu	0,0055 *	0,5706	0,9779	0,6061	0,8993	0,5641
J41 T <-> J41 Cd	0,2610	0,5815	0,4592	0,1457	0,0441 *	0,0056 *
J41 T <-> J41 Cu	0,0404 *	0,6094	0,4102	0,0524	0,9944	0,0408 *
J41 Cd <-> J41 Cu	0,0541	0,2491	0,7473	0,5656	0,0447 *	0,3240
J21 T <-> J21 T bis	0,1239	0,3710	0,1126	0,4946	0,6819	0,2059
J21 Cd <-> J21 Cd bis	0,0000 *	0,1109	0,1816	0,3932	0,4595	0,1320
J21 Cu <-> J21 Cu bis	0,2322	0,7744	0,3281	0,4923	0,8644	0,2927
J0 Oct <-> J0 Oct bis	0,0706	0,2809	0,4424	0,2699	0,3202	0,9708

ANOVA Tukey - Bande des 15 kD

Comparaison période

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	0,236520	2	0,118260	0,416309	0,664801
Error	5,965433	21	0,284068		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	1,609818	2	0,804909	3,154174	0,063416
Error	5,358959	21	0,255189		

Comparaison site

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	,829854	2	0,414927	2,700546	0,090422
Error	3,226555	21	0,153646		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	5,758422	2	2,879211	9,679560	0,001049
Error	6,246506	21	0,297453		

Tukey HSD test; variable IT - Probabilities for Post Hoc Tests

	{1}	{2}	{3}
	6,210607	7,199664	6,116894
J0 ambl {1}		0,004422	0,937259
J0 belg {2}	0,004422		0,002041
J0 mars {3}	0,937259	0,002041	

ANOVA Dunnett - Bande des 15 kD

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_15\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: PROT18 N: 24 Multiple R: 0,647 Squared multiple R: 0,419

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_15\$	1,866	2	0,933	7,568	0,003
Error	2,588	21	0,123		

COL/ - ROW OCT_J0_15\$

1 J0 oct

2 J42 T

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT18

Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,123 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	-0,556
3	-0,622

Dunnett One Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,004
3	0,002

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_15\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: IT18 N: 24 Multiple R: 0,304 Squared multiple R: 0,093

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_15\$	1,392	2	0,696	1,072	0,360
Error	13,635	21	0,649		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_15\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: PROT19 N: 24 Multiple R: 0,727 Squared multiple R: 0,528

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_15\$	4,065	2	2,032	11,762	0,000
Error	3,629	21	0,173		

COL/ - ROW OCT_J7_15\$

1 J7 Cd

2 J7 Cu

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT19

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,173 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,852
2	-0,040
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,001
2	0,973
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_15\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: IT19 N: 24 Multiple R: 0,193 Squared multiple R: 0,037

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_15\$	0,964	2	0,482	0,408	0,670
Error	24,802	21	1,181		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_15\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: PROT20 N: 24 Multiple R: 0,501 Squared multiple R: 0,251

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_15\$	0,572	2	0,286	3,513	0,048
Error	1,711	21	0,081		

COL/ - ROW OCT_J42_15\$

1 J42 Cd

2 J42 Cu

3 J42 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT20

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,081 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	-0,168
2	0,209
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,406
2	0,266
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_15\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: IT20 N: 24 Multiple R: 0,559 Squared multiple R: 0,313

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_15\$	0,828	2	0,414	4,780	0,019
Error	1,818	21	0,087		

COL/ - ROW OCT_J42_15\$
 1 J42 Cd
 2 J42 Cu
 3 J42 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of IT20
 Dunnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,087 with 21 df. Dunnett Two Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	-0,220	1	0,254
2	0,235	2	0,213
3	0,000	3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_15\$ (3 levels)
J0 mars, J20 T, J40 T

Dep Var: PROT21 N: 24 Multiple R: 0,568 Squared multiple R: 0,323

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_15\$	2,527	2	1,263	5,000	0,017
Error	5,306	21	0,253		

COL/ - ROW MARS_J0_15\$
 1 J0 mars
 2 J20 T
 3 J40 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of PROT21
 Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,253 with 21 df. Dunnett One Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000	1	1,000
2	0,700	2	0,010
3	0,024	3	0,497

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_15\$ (3 levels)
J0 mars, J20 T, J40 T

Dep Var: IT21 N: 24 Multiple R: 0,776 Squared multiple R: 0,602

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_15\$	15,590	2	7,795	15,909	0,000
Error	10,290	21	0,490		

COL/ - ROW MARS_J0_15\$

1 J0 mars
 2 J20 T
 3 J40 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT21

Dunnnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,490 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	1,384
3	-0,527

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,001
3	0,249

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_15\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: PROT22 N: 24 Multiple R: 0,286 Squared multiple R: 0,082

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_15\$	0,897	2	0,448	0,936	0,408
Error	10,056	21	0,479		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_15\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: IT22 N: 24 Multiple R: 0,368 Squared multiple R: 0,136

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_15\$	3,012	2	1,506	1,649	0,216
Error	19,178	21	0,913		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_15\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_15\$	3	1	2

Dep Var: PROT23 N: 23 Multiple R: 0,447 Squared multiple R: 0,200

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_15\$	0,887	2	0,443	2,499	0,107
Error	3,549	20	0,177		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_15\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_15\$	3	1	2

Dep Var: IT23 N: 23 Multiple R: 0,569 Squared multiple R: 0,324

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_15\$	0,616	2	0,308	4,795	0,020
Error	1,284	20	0,064		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_15\$ (4 levels)
, J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J0_15\$	3	1	2

Dep Var: PROT24 N: 21 Multiple R: 0,137 Squared multiple R: 0,019

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_15\$	0,106	2	0,053	0,172	0,843
Error	5,552	18	0,308		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_15\$ (4 levels)
, J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J0_15\$	3	1	2

Dep Var: IT24 N: 21 Multiple R: 0,401 Squared multiple R: 0,161

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_15\$	1,627	2	0,814	1,727	0,206
Error	8,480	18	0,471		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_15\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: PROT25 N: 24 Multiple R: 0,301 Squared multiple R: 0,091

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_15\$	0,394	2	0,197	1,049	0,368
Error	3,943	21	0,188		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_15\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: IT25 N: 24 Multiple R: 0,106 Squared multiple R: 0,011

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_15\$	0,012	2	0,006	0,120	0,887
Error	1,069	21	0,051		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_15\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_15\$	3	1	2

Dep Var: PROT26 N: 15 Multiple R: 0,318 Squared multiple R: 0,101

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_15\$	0,314	2	0,157	0,675	0,527
Error	2,787	12	0,232		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_15\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_15\$	3	1	2

Dep Var: IT26 N: 15 Multiple R: 0,324 Squared multiple R: 0,105

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_15\$	0,810	2	0,405	0,705	0,513
Error	6,891	12	0,574		

Moyennes et écarts types pour la bande de 12 kD

Expérience I	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	10,72	1,65	8	3,58	1,28	13,87	2,58
J7 T(Cu)	7,41	1,01	8	2,03	0,86	15,64	4,71
J7 T(Cd)	8,32	1,22	8	2,86	0,64	15,04	5,32
J7 Cu	8,19	1,63	8	1,82	0,77	14,75	2,00
J7 Cd	12,04	1,51	8	4,19	1,48	16,47	3,59
J42 T	7,94	1,12	8	2,00	0,68	12,93	0,59
J42 Cu	6,71	0,28	8	2,47	0,58	13,37	0,88
J42 Cd	7,57	0,52	8	1,57	0,72	12,05	0,84

Expérience II	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0 Belgica	7,37	0,45	8	3,48	1,53	19,09	1,66
J0 Ambleteuse	6,60	1,01	8	2,20	0,54	15,97	1,76
J0	7,46	0,74	8	3,09	1,13	16,08	1,79
J20 T	12,20	1,94	8	5,07	1,13	20,77	4,04
J20 Cu	14,85	1,98	8	6,12	2,10	19,28	2,62
J20 Cd	13,99	2,34	8	5,69	1,73	22,32	3,45
J40 T	6,48	0,95	8	2,93	1,34	13,74	0,75
J40 Cu	6,79	1,06	7	1,76	0,68	14,58	0,98
J40 Cd	5,40	0,50	8	2,35	0,93	14,89	1,01

Expérience III	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	8,42	1,57	8	3,15	1,77	14,15	0,75
J21 T	6,56	0,78	8	2,61	0,71	12,65	0,41
J21 Cu	7,10	0,95	8	2,57	1,50	12,84	0,94
J21 Cd	5,34	0,27	8	2,07	0,69	13,28	0,69
J41 T	6,85	0,69	5	2,69	1,08	12,33	0,41
J41 Cu	8,30	0,64	5	3,00	1,30	12,67	1,57
J41 Cd	7,60	0,93	5	2,26	0,39	12,90	1,04

Bande des 12 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J0 Ambl	0,0000 *	0,0192 *	0,0778	0,2154	0,0354 *	0,3322
J0 Oct <-> J0 Mars	0,0002 *	0,4285	0,0661	0,0513	0,7468	0,3561
J0 Oct <-> J0 Bel	0,0005 *	0,8895	0,0003 *	0,0027 *	0,6454	0,2665
J0 Oct <-> J0 Juin	0,0127 *	0,5892	0,7733	0,8948	0,4090	0,0043 *
J0 Ambl <-> J0 Mars	0,0705	0,0625	0,9001	0,4396	0,0686	0,9613
J0 Ambl <-> J0 Bel	0,0777	0,0530	0,0027 *	0,0477 *	0,0128 *	0,8832
J0 Ambl <-> J0 Juin	0,0149 *	0,1805	0,0238 *	0,2657	0,0054 *	0,0400 *
J0 Mars <-> J0 Bel	0,7556	0,5696	0,0037 *	0,2033	0,4361	0,8451
J0 Mars <-> J0 Juin	0,1394	0,9321	0,0195 *	0,0669	0,2552	0,0361 *
J0 Bel <-> J0 Juin	0,1031	0,6988	0,0000 *	0,0037 *	0,7109	0,0541

Bande des 12 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J7 T(Cd)	0,0051 *	0,1761	0,5846	0,4420	0,0862	0,0759
J0 Oct <-> J7 T(Cu)	0,0003 *	0,0128 *	0,3663	0,2179	0,3135	0,1360
J0 Oct <-> J7 Cd	0,1157	0,3880	0,1180	0,8196	0,7084	0,4052
J0 Oct <-> J7 Cu	0,0081 *	0,0049 *	0,4583	0,9820	0,2096	0,5128
J0 Oct <-> J42 T	0,0015 *	0,0082 *	0,3461	0,3319	0,1217	0,0009 *
J0 Oct <-> J42 Cd	0,0007 *	0,0017 *	0,0940	0,0070 *	0,1572	0,0085 *
J0 Oct <-> J42 Cu	0,0002 *	0,0420 *	0,6217	0,0001 *	0,0542	0,0109 *
J7 T(Cd) <-> J7 T(Cu)	0,1245	0,0448 *	0,8139	0,6316	0,4518	0,7549
J7 T(Cd) <-> J7 Cd	0,0001 *	0,0423 *	0,5375	0,5863	0,0407 *	0,3209
J7 T(Cd) <-> J7 Cu	0,8603	0,0107 *	0,8885	0,4552	0,6188	0,0192 *
J7 T(Cd) <-> J42 T	0,5296	0,0210 *	0,3008	0,8360	0,8536	0,0000 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cd	0,1416	0,0020 *	0,1593	0,0396 *	0,7428	0,0001 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cu	0,0070 *	0,2195	0,4103	0,0010 *	0,8136	0,0001 *
J7 T(Cu) <-> J7 Cd	0,0000 *	0,0030 *	0,6970	0,3106	0,1726	0,4914
J7 T(Cu) <-> J7 Cu	0,2674	0,6118	0,6329	0,2260	0,7961	0,0377 *
J7 T(Cu) <-> J42 T	0,3321	0,9447	0,1485	0,7845	0,5682	0,0000 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cd	0,6914	0,2629	0,0693	0,1027	0,6686	0,0002 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cu	0,0977	0,2493	0,2199	0,0033 *	0,3262	0,0002 *
J7 Cd <-> J7 Cu	0,0002 *	0,0012 *	0,2549	0,8371	0,1090	0,1446
J7 Cd <-> J42 T	0,0000 *	0,0019 *	0,0268 *	0,4544	0,0594	0,0001 *
J7 Cd <-> J42 Cd	0,0000 *	0,0005 *	0,0099 *	0,0119 *	0,0789	0,0011 *
J7 Cd <-> J42 Cu	0,0000 *	0,0131 *	0,0458 *	0,0003 *	0,0246 *	0,0014 *
J7 Cu <-> J42 T	0,7285	0,6214	0,0378 *	0,3429	0,7534	0,0044 *
J7 Cu <-> J42 Cd	0,3339	0,5145	0,0061 *	0,0074 *	0,8647	0,0369 *
J7 Cu <-> J42 Cu	0,0380 *	0,0775	0,1064	0,0001 *	0,4653	0,0460 *
J42 T <-> J42 Cu	0,0173 *	0,1630	0,2522	0,0017 *	0,6748	0,3053
J42 T <-> J42 Cd	0,4078	0,2370	0,0307 *	0,0605	0,8855	0,3557
J42 Cu <-> J42 Cd	0,0011 *	0,0156 *	0,0085 *	0,1284	0,5739	0,9163

J0 Mars <-> J20 T	0,0001 *	0,0034 *	0,0138 *	0,0213 *	0,9873	0,0481 *
J0 Mars <-> J20 Cd	0,0001 *	0,0031 *	0,0005 *	0,0071 *	0,2761	0,1055
J0 Mars <-> J20 Cu	0,0000 *	0,0028 *	0,0131 *	0,0189 *	0,1224	0,3363
J0 Mars <-> J40 T	0,0375 *	0,8031	0,0073 *	0,5226	0,6546	0,0346 *
J0 Mars <-> J40 Cd	0,0000 *	0,1738	0,1229	0,3276	0,6367	0,1519
J0 Mars <-> J40 Cu	0,1718	0,0176 *	0,0712	0,3743	0,2358	0,1635
J20 T <-> J20 Cd	0,1193	0,4144	0,4244	0,6294	0,2829	0,6891
J20 T <-> J20 Cu	0,0172 *	0,2325	0,3949	0,9571	0,1260	0,2784
J20 T <-> J40 T	0,0000 *	0,0039 *	0,0003 *	0,0809	0,6661	0,0002 *
J20 T <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0001 *	0,0041 *	0,0021 *	0,6254	0,0016 *
J20 T <-> J40 Cu	0,0000 *	0,0000 *	0,0031 *	0,1611	0,2303	0,0030 *
J20 Cd <-> J20 Cu	0,4397	0,6576	0,0673	0,6678	0,6283	0,4873
J20 Cd <-> J40 T	0,0000 *	0,0031 *	0,0002 *	0,0301 *	0,5137	0,0007 *
J20 Cd <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0003 *	0,0004 *	0,0006 *	0,1250	0,0044 *
J20 Cd <-> J40 Cu	0,0000 *	0,0002 *	0,0003 *	0,0708	0,0354 *	0,0070 *
J20 Cu <-> J40 T	0,0000 *	0,0027 *	0,0004 *	0,0729	0,2608	0,0037 *
J20 Cu <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0010 *	0,0017 *	0,0018 *	0,0489 *	0,0219 *
J20 Cu <-> J40 Cu	0,0000 *	0,0004 *	0,0011 *	0,1477	0,0135 *	0,0288 *
J40 T <-> J40 Cd	0,0130 *	0,3296	0,0213 *	0,1132	0,3614	0,4498
J40 T <-> J40 Cu	0,2936	0,1525	0,1474	0,3682	0,4586	0,4380
J40 Cd <-> J40 Cu	0,0055 *	0,1921	0,5635	0,0724	0,4485	0,9640

Bande des 12 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Juin <-> J21 T	0,0094 *	0,4440	0,0002 *	0,0857	0,0278 *	0,1337
J0 Juin<-> J21 Cd	0,0008 *	0,1402	0,0300 *	0,0002 *	0,0243 *	0,8310
J0 Juin<-> J21 Cu	0,0608	0,4915	0,0081 *	0,2062	0,6741	0,5859
J0 Juin <-> J41 T	0,0592	0,6132	0,0005 *	0,1297	0,3563	0,2587
J0 Juin<-> J41 Cd	0,3150	0,2060	0,0285 *	0,3299	0,0114 *	0,4270
J0 Juin<-> J41 Cu	0,8718	0,8729	0,0406 *	0,1055	0,5764	0,0906
J21 T <-> J21 Cd	0,0025 *	0,1413	0,0464 *	0,0131 *	0,9514	0,1934
J21 T <-> J21 Cu	0,2303	0,9462	0,6139	0,6236	0,0665	0,0466 *
J21 T <-> J41 T	0,5185	0,8766	0,1930	0,8489	0,3138	0,9382
J21 T <-> J41 Cd	0,0519	0,3326	0,6341	0,6414	0,2730	0,0345 *
J21 T <-> J41 Cu	0,0016 *	0,4959	0,9808	0,7494	0,1551	0,0035 *
J21 Cd <-> J21 Cu	0,0009 *	0,4008	0,3081	0,0041 *	0,0589	0,4502
J21 Cd <-> J41 T	0,0060 *	0,2257	0,0190 *	0,0363 *	0,2889	0,3296
J21 Cd <-> J41 Cd	0,0045 *	0,5871	0,4483	0,0067 *	0,2927	0,3267
J21 Cd <-> J41 Cu	0,0002 *	0,1155	0,3526	0,0497 *	0,1404	0,0612
J21 Cu <-> J41 T	0,6074	0,8815	0,2754	0,5583	0,5473	0,1322
J21 Cu <-> J41 Cd	0,3734	0,5884	0,9163	0,9637	0,0213 *	0,7486
J21 Cu <-> J41 Cu	0,0310 *	0,6097	0,8087	0,4790	0,8255	0,2219
J41 T <-> J41 Cd	0,1813	0,4241	0,2854	0,5704	0,0766	0,0992
J41 T <-> J41 Cu	0,0086 *	0,6923	0,6564	0,9074	0,7263	0,0240 *
J41 Cd <-> J41 Cu	0,2046	0,2790	0,7916	0,4960	0,0401 *	0,4510
J21 T <-> J21 T bis	0,1717	0,4045	0,0536	0,5041	0,6443	0,2365
J21 Cd <-> J21 Cd bis	0,0000 *	0,2448	0,0219 *	0,5046	0,6653	0,1645
J21 Cu <-> J21 Cu bis	0,4072	0,8056	0,2888	0,5406	0,8892	0,4229
J0 Oct <-> J0 Oct bis	0,0254 *	0,3061	0,5120	0,1133	0,3641	0,6805

ANOVA Tukey - Bande des 12 kD

Comparaison période

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	1,13786	2	0,568932	0,283130	0,756253
Error	42,19823	21	2,009440		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	23,28964	2	11,64482	3,338559	0,055085
Error	73,24755	21	3,48798		

Comparaison site

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	6,91546	2	3,457728	2,663971	0
Error	27,25716	21	1,297960		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	49,95398	2	24,97699	8,258528	0,002259
Error	63,51215	21	3,02439		

Tukey HSD test; variable IT - Probabilities for Post Hoc Tests

	{1}	{2}	{3}
	15,97072	19,08635	16,08424
J0 ambl {1}		0,004882	0,990730
J0 belg {2}	0,004882		0,006561
J0 mars {3}	0,990730	0,006561	

ANOVA Dunnett - Bande des 12 kD

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_12\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: PROT27 N: 24 Multiple R: 0,630 Squared multiple R: 0,397

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_12\$	13,041	2	6,520	6,906	0,005
Error	19,827	21	0,944		

COL/ - ROW OCT_J0_12\$

1 J0 oct

2 J42 T

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT27

Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,944 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	-1,577
3	-1,550

Dunnett One Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,004
3	0,004

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_12\$ (3 levels)
J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: IT27 N: 24 Multiple R: 0,360 Squared multiple R: 0,129

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_12\$	30,364	2	15,182	1,561	0,233
Error	204,302	21	9,729		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_12\$ (3 levels)

J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: PROT28 N: 24 Multiple R: 0,727 Squared multiple R: 0,529

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_12\$	27,693	2	13,846	11,803	0,000
Error	24,636	21	1,173		

COL/ - ROW OCT_J7_12\$

1 J7 Cd

2 J7 Cu

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT28

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 1,173 with 21 df.
Matrix of mean differences from control:

1	2,165
2	-0,212
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test,
Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,001
2	0,895
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_12\$ (3 levels)

J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: IT28 N: 24 Multiple R: 0,204 Squared multiple R: 0,042

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_12\$	11,899	2	5,949	0,457	0,639
Error	273,303	21	13,014		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_12\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: PROT29 N: 24 Multiple R: 0,509 Squared multiple R: 0,259

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_12\$	3,256	2	1,628	3,675	0,043
Error	9,302	21	0,443		

COL/ - ROW OCT_J42_12\$

1 J42 Cd

2 J42 Cu

3 J42 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT29

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,443 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	-0,435
2	0,467
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,338
2	0,293
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_12\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: IT29 N: 24 Multiple R: 0,600 Squared multiple R: 0,360

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_12\$	7,198	2	3,599	5,905	0,009
Error	12,798	21	0,609		

COL/ - ROW OCT_J42_12\$
 1 J42 Cd
 2 J42 Cu
 3 J42 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of IT29
 Dunnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,609 with 21 df. Dunnett Two Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	-0,873	1	0,066
2	0,446	2	0,427
3	0,000	3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_12\$ (3 levels)
J0 mars, J20 T, J40 T

Dep Var: PROT30 N: 24 Multiple R: 0,655 Squared multiple R: 0,429

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_12\$	22,829	2	11,415	7,878	0,003
Error	30,430	21	1,449		

COL/ - ROW MARS_J0_12\$
 1 J0 mars
 2 J20 T
 3 J40 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of PROT30
 Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 1,449 with 21 df. Dunnett Two Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000	1	1,000
2	1,986	2	0,006
3	-0,157	3	0,951

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_12\$ (3 levels)
J0 mars, J20 T, J40 T

Dep Var: IT30 N: 24 Multiple R: 0,770 Squared multiple R: 0,594

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_12\$	205,283	2	102,641	15,334	0,000
Error	140,571	21	6,694		

COL/ - ROW MARS_J0_12\$

1 J0 mars

2 J20 T

3 J40 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT30

Dunnnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 6,694 with 21 df.
 Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	4,689
3	-2,346

Dunnnett Two Sided Test,
 Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,003
3	0,147

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_12\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: PROT31 N: 24 Multiple R: 0,262 Squared multiple R: 0,068

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_12\$	4,468	2	2,234	0,771	0,475
Error	60,839	21	2,897		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_12\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: IT31 N: 24 Multiple R: 0,362 Squared multiple R: 0,131

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_12\$	36,969	2	18,484	1,580	0,230
Error	245,733	21	11,702		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_12\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_12\$	3	1	2

Dep Var: PROT32 N: 23 Multiple R: 0,439 Squared multiple R: 0,193

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_12\$	5,133	2	2,567	2,393	0,117
Error	21,454	20	1,073		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_12\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_12\$	3	1	2

Dep Var: IT32 N: 23 Multiple R: 0,502 Squared multiple R: 0,252

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_12\$	5,659	2	2,830	3,362	0,055
Error	16,836	20	0,842		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_12\$ (3 levels)

J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: PROT33 N: 21 Multiple R: 0,204 Squared multiple R: 0,041

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_12\$	1,302	2	0,651	0,389	0,683
Error	30,104	18	1,672		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_12\$ (3 levels)

J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: IT33 N: 21 Multiple R: 0,834 Squared multiple R: 0,696

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_12\$	13,399	2	6,699	20,583	0,000
Error	5,858	18	0,325		

COL/ - ROW JUIN_J0_12\$
 1 J0 juin
 2 J21 T
 3 J41 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of IT33
 Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,325 with 18 df. Dunnett One Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000	1	1,000
2	-1,499	2	0,000
3	-1,825	3	0,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_12\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: PROT34 N: 24 Multiple R: 0,248 Squared multiple R: 0,062

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_12\$	1,485	2	0,742	0,689	0,513
Error	22,642	21	1,078		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_12\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: IT34 N: 24 Multiple R: 0,365 Squared multiple R: 0,133

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_12\$	1,639	2	0,819	1,610	0,224
Error	10,686	21	0,509		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_12\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_12\$	3	1	2

Dep Var: PROT35 N: 15 Multiple R: 0,322 Squared multiple R: 0,104

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_12\$	1,393	2	0,697	0,694	0,519
Error	12,052	12	1,004		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_12\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_12\$	3	1	2

Dep Var: IT35 N: 15 Multiple R: 0,231 Squared multiple R: 0,053

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_12\$	0,835	2	0,418	0,338	0,720
Error	14,840	12	1,237		

Moyennes et écarts types pour la bande de 6 kD

Expérience I	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	11,20	1,03	8	3,66	0,92	14,53	2,10
J7 T(Cu)	7,03	1,16	8	1,89	0,77	15,03	5,37
J7 T(Cd)	7,92	1,16	8	2,72	0,57	14,08	4,31
J7 Cu	8,10	1,22	8	1,77	0,69	14,70	1,78
J7 Cd	10,24	1,96	8	3,61	1,48	13,82	2,57
J42 T	7,51	0,84	8	1,89	0,63	12,29	0,95
J42 Cu	6,19	0,20	8	2,27	0,47	12,36	0,99
J42 Cd	6,83	0,57	8	1,42	0,68	10,91	1,27

Expérience II	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0 Belgica	6,98	0,29	8	3,34	1,55	18,16	2,10
J0 Ambleteuse	6,83	0,85	8	2,28	0,58	16,63	2,31
J0	7,11	0,51	8	2,92	0,93	15,34	1,47
J20 T	13,14	1,84	8	5,46	1,13	22,57	5,17
J20 Cu	13,77	0,92	8	5,59	1,43	18,25	4,41
J20 Cd	13,38	2,47	8	5,46	1,84	21,44	4,30
J40 T	6,63	0,84	8	2,99	1,34	14,12	1,13
J40 Cu	6,68	0,82	7	1,73	0,64	14,40	0,85
J40 Cd	5,70	0,63	8	2,48	1,01	15,70	1,05

Expérience III	Vol moyenne	St dév	n	Vol/ prot moyenne	St dév	Vol/ It moyenne	St dév
J0	7,94	1,26	8	3,00	1,66	13,42	0,85
J21 T	6,39	0,58	8	2,55	0,70	12,37	0,72
J21 Cu	6,60	0,94	8	2,39	1,40	11,95	1,25
J21 Cd	5,24	0,27	8	2,04	0,73	13,04	0,81
J41 T	6,80	0,42	5	2,65	0,99	12,29	0,65
J41 Cu	8,06	0,45	5	2,92	1,29	12,30	1,33
J41 Cd	7,06	0,62	5	2,09	0,28	12,05	1,47

Bande des 6 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J0 Ambl	0,0000 *	0,0030 *	0,0782	0,6272	0,2366	0,8120
J0 Oct <-> J0 Mars	0,0000 *	0,1317	0,3887	0,0832	0,9801	0,3621
J0 Oct <-> J0 Bel	0,0000 *	0,6216	0,0039 *	0,0034 *	0,1974	0,9950
J0 Oct <-> J0 Juin	0,0001 *	0,3397	0,1982	0,6168	0,1437	0,0287 *
J0 Ambl <-> J0 Mars	0,4283	0,1237	0,2028	0,1993	0,2274	0,2541
J0 Ambl <-> J0 Bel	0,6332	0,1039	0,1884	0,0108 *	0,0184 *	0,8071
J0 Ambl <-> J0 Juin	0,0563	0,2823	0,0051 *	0,3283	0,0121 *	0,0170 *
J0 Mars <-> J0 Bel	0,5440	0,5197	0,0076 *	0,1587	0,2057	0,3654
J0 Mars <-> J0 Juin	0,1165	0,9091	0,0064 *	0,0299 *	0,1501	0,1718
J0 Bel <-> J0 Juin	0,0696	0,6754	0,0002 *	0,0010 *	0,8530	0,0290 *

Bande des 6 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Oct <-> J7 T(Cd)	0,0000 *	0,0279 *	0,7917	0,7735	0,2232	0,0775
J0 Oct <-> J7 T(Cu)	0,0000 *	0,0010 *	0,8135	0,7701	0,6369	0,0243 *
J0 Oct <-> J7 Cd	0,2389	0,9324	0,5528	0,1128	0,2337	0,6084
J0 Oct <-> J7 Cu	0,0001 *	0,0004 *	0,8635	0,6724	0,4605	0,6717
J0 Oct <-> J42 T	0,0000 *	0,0005 *	0,0156 *	0,5936	0,3411	0,0520
J0 Oct <-> J42 Cd	0,0000 *	0,0001 *	0,0009 *	0,1344	0,4380	0,2072
J0 Oct <-> J42 Cu	0,0000 *	0,0019 *	0,0190 *	0,0003 *	0,0914	0,0637
J7 T(Cd) <-> J7 T(Cu)	0,1470	0,0281 *	0,7018	0,9965	0,4463	0,5766
J7 T(Cd) <-> J7 Cd	0,0122 *	0,1490	0,8866	0,1872	0,0214 *	0,1961
J7 T(Cd) <-> J7 Cu	0,7725	0,0097 *	0,7123	0,8921	0,6200	0,0326 *
J7 T(Cd) <-> J42 T	0,4287	0,0154 *	0,2865	0,4140	0,7813	0,0007 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cd	0,0305 *	0,0010 *	0,0805	0,0785	0,6470	0,0046 *
J7 T(Cd) <-> J42 Cu	0,0037 *	0,1030	0,3042	0,0002 *	0,6131	0,0009 *
J7 T(Cu) <-> J7 Cd	0,0014 *	0,0116 *	0,5748	0,1886	0,1028	0,0708
J7 T(Cu) <-> J7 Cu	0,0954	0,7472	0,8749	0,8956	0,7876	0,0093 *
J7 T(Cu) <-> J42 T	0,3613	0,9922	0,1959	0,4115	0,6257	0,0002 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cd	0,6569	0,2109	0,0687	0,0779	0,7583	0,0012 *
J7 T(Cu) <-> J42 Cu	0,0805	0,2589	0,2062	0,0001 *	0,2112	0,0002 *
J7 Cd <-> J7 Cu	0,0201 *	0,0069 *	0,4370	0,2338	0,0610	0,3529
J7 Cd <-> J42 T	0,0051 *	0,0139 *	0,1493	0,0392 *	0,0389 *	0,0173 *
J7 Cd <-> J42 Cd	0,0014 *	0,0020 *	0,0124 *	0,0040 *	0,0565	0,0827
J7 Cd <-> J42 Cu	0,0006 *	0,0396 *	0,1671	0,0000 *	0,0067 *	0,0216 *
J7 Cu <-> J42 T	0,2810	0,7304	0,0044 *	0,3427	0,8264	0,1182
J7 Cu <-> J42 Cd	0,0182 *	0,3173	0,0002 *	0,0601	0,9694	0,3933
J7 Cu <-> J42 Cu	0,0029 *	0,1160	0,0057 *	0,0001 *	0,3209	0,1417
J42 T <-> J42 Cu	0,0027 *	0,1966	0,8922	0,0013 *	0,4358	0,9197
J42 T <-> J42 Cd	0,0763	0,1731	0,0274 *	0,3217	0,8563	0,4575
J42 Cu <-> J42 Cd	0,0157 *	0,0114 *	0,0234 *	0,0140 *	0,3393	0,5196

J0 Mars <-> J20 T	0,0000 *	0,0002 *	0,0051 *	0,0032 *	0,6271	0,0036 *
J0 Mars <-> J20 Cd	0,0001 *	0,0036 *	0,0046 *	0,0005 *	0,0944	0,0109 *
J0 Mars <-> J20 Cu	0,0000 *	0,0006 *	0,1123	0,1413	0,2821	0,0094 *
J0 Mars <-> J40 T	0,1878	0,9016	0,0822	0,2155	0,3621	0,5039
J0 Mars <-> J40 Cd	0,0002 *	0,3828	0,5815	0,5890	0,8413	0,3928
J0 Mars <-> J40 Cu	0,2386	0,0141 *	0,1603	0,2389	0,3689	0,2024
J20 T <-> J20 Cd	0,8271	0,9991	0,6405	0,4498	0,2222	0,6398
J20 T <-> J20 Cu	0,4031	0,8369	0,0937	0,0904	0,5478	0,6855
J20 T <-> J40 T	0,0000 *	0,0014 *	0,0022 *	0,0556	0,6654	0,0007 *
J20 T <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0001 *	0,0068 *	0,0117 *	0,7744	0,0004 *
J20 T <-> J40 Cu	0,0000 *	0,0000 *	0,0027 *	0,0686	0,1829	0,0003 *
J20 Cd <-> J20 Cu	0,6905	0,8727	0,1657	0,0187 *	0,5247	0,9494
J20 Cd <-> J40 T	0,0001 *	0,0083 *	0,0017 *	0,0106 *	0,4218	0,0022 *
J20 Cd <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0013 *	0,0066 *	0,0019 *	0,1364	0,0014 *
J20 Cd <-> J40 Cu	0,0001 *	0,0005 *	0,0022 *	0,0159 *	0,0194 *	0,0009 *
J20 Cu <-> J40 T	0,0000 *	0,0021 *	0,0335 *	0,8041	0,8648	0,0019 *
J20 Cu <-> J40 Cd	0,0000 *	0,0002 *	0,1513	0,3385	0,3777	0,0012 *
J20 Cu <-> J40 Cu	0,0000 *	0,0000 *	0,0436 *	0,7939	0,0659	0,0008 *
J40 T <-> J40 Cd	0,0251 *	0,4035	0,0113 *	0,4745	0,4741	0,8493
J40 T <-> J40 Cu	0,4894	0,1081	0,8633	0,4119	0,3859	0,6724
J40 Cd <-> J40 Cu	0,0216 *	0,1152	0,0213 *	0,5056	0,2805	0,6233

Bande des 6 kD	Student DO	Student DO/Prot	Student DO/IT	F DO	F DO/Prot	F DO/IT
J0 Juin <-> J21 T	0,0068 *	0,5056	0,0178 *	0,0569	0,0375 *	0,6736
J0 Juin<-> J21 Cd	0,0004 *	0,1690	0,3726	0,0006 *	0,0455 *	0,8996
J0 Juin<-> J21 Cu	0,0296 *	0,4423	0,0150 *	0,4640	0,6651	0,3317
J0 Juin <-> J41 T	0,0794	0,6877	0,0270 *	0,0512	0,3287	0,6280
J0 Juin<-> J41 Cd	0,1760	0,1731	0,0542	0,1915	0,0040 *	0,1966
J0 Juin<-> J41 Cu	0,8510	0,9339	0,0877	0,0635	0,6479	0,2844
J21 T <-> J21 Cd	0,0002 *	0,1746	0,0998	0,0641	0,9259	0,7675
J21 T <-> J21 Cu	0,6056	0,7687	0,4213	0,2189	0,0896	0,1700
J21 T <-> J41 T	0,1968	0,8345	0,8421	0,5640	0,4123	0,8865
J21 T <-> J41 Cd	0,0737	0,1952	0,6132	0,8070	0,0947	0,0980
J21 T <-> J41 Cu	0,0002 *	0,5149	0,9098	0,6494	0,1582	0,1507
J21 Cd <-> J21 Cu	0,0043 *	0,5451	0,0558	0,0039 *	0,1067	0,2748
J21 Cd <-> J41 T	0,0000 *	0,2229	0,1067	0,2931	0,4601	0,7010
J21 Cd <-> J41 Cd	0,0000 *	0,8841	0,1421	0,0562	0,0836	0,1613
J21 Cd <-> J41 Cu	0,0000 *	0,1396	0,2334	0,2354	0,1833	0,2378
J21 Cu <-> J41 T	0,6588	0,7195	0,5869	0,1378	0,5160	0,2228
J21 Cu <-> J41 Cd	0,3549	0,5801	0,8885	0,4402	0,0076 *	0,6622
J21 Cu <-> J41 Cu	0,0084 *	0,5058	0,6339	0,1677	0,9172	0,8266
J41 T <-> J41 Cd	0,4655	0,2790	0,7545	0,4669	0,0322 *	0,1421
J41 T <-> J41 Cu	0,0018 *	0,7214	0,9817	0,9092	0,6188	0,1928
J41 Cd <-> J41 Cu	0,0195 *	0,2258	0,7867	0,5374	0,0121 *	0,8518
J21 T <-> J21 T bis	0,4705	0,7347	0,0108 *	0,4980	0,7689	0,1648
J21 Cd <-> J21 Cd bis	0,0022 *	0,5413	0,0006 *	0,4838	0,8771	0,1316
J21 Cu <-> J21 Cu bis	0,8082	0,9255	0,1478	0,4953	0,9811	0,3219
J0 Oct <-> J0 Oct bis	0,0017 *	0,1189	0,1811	0,9486	0,4261	0,5450

ANOVA Tukey - Bande des 6 kD

Comparaison période

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	2,66728	2	1,333641	0,891453	0,425018
Error	31,41665	21	1,496031		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	14,84181	2	7,420904	3,052501	0,068594
Error	51,05288	21	2,431089		

Comparaison site

Prot	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	4,52657	2	2,263285	1,889554	0,175956
Error	25,15356	21	1,197788		

IT	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p-level
Effect	31,81790	2	15,90895	4,016762	0,033332
Error	83,17345	21	3,96064		

Tukey HSD test; variable IT - Probabilities for Post Hoc Tests

	{1}	{2}	{3}
	16,63169	18,15691	15,33976
J0 ambl {1}		0,296493	0,411775
J0 belg {2}	0,296493		0,026081
J0 mars {3}	0,411775	0,026081	

ANOVA Dunnett - Bande des 6 kD

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_6\$ (3 levels)

J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: PROT36 N: 24 Multiple R: 0,751 Squared multiple R: 0,564

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_6\$	16,688	2	8,344	13,577	0,000
Error	12,906	21	0,615		

COL/ - ROW OCT_J0_6\$

1 J0 oct

2 J42 T

3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT36

Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,615 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	-1,771
3	-1,767

Dunnett One Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,000
3	0,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J0_6\$ (3 levels)

J0 oct, J42 T, J7 T

Dep Var: IT36 N: 24 Multiple R: 0,353 Squared multiple R: 0,125

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J0_6\$	34,109	2	17,055	1,497	0,247
Error	239,219	21	11,391		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_6\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: PROT37 N: 24 Multiple R: 0,651 Squared multiple R: 0,424

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_6\$	16,837	2	8,418	7,722	0,003
Error	22,893	21	1,090		

COL/ - ROW OCT_J7_6\$
 1 J7 Cd
 2 J7 Cu
 3 J7 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT37

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 1,090 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	1,714
2	-0,120
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,007
2	0,962
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J7_6\$ (3 levels)
J7 Cd, J7 Cu, J7 T

Dep Var: IT37 N: 24 Multiple R: 0,151 Squared multiple R: 0,023

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J7_6\$	6,272	2	3,136	0,243	0,786
Error	270,478	21	12,880		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_6\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: PROT38 N: 24 Multiple R: 0,526 Squared multiple R: 0,277

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_6\$	2,894	2	1,447	4,015	0,033
Error	7,568	21	0,360		

COL/ - ROW OCT_J42_6\$

1 J42 Cd

2 J42 Cu

3 J42 T

Using least squares means.

Post Hoc test of PROT38

Dunnnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 0,360 with 21 df.

Matrix of mean differences from control:

1	-0,472
2	0,377
3	0,000

Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,223
2	0,365
3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

OCT_J42_6\$ (3 levels)
J42 Cd, J42 Cu, J42 T

Dep Var: IT38 N: 24 Multiple R: 0,552 Squared multiple R: 0,304

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
OCT_J42_6\$	10,670	2	5,335	4,590	0,022
Error	24,407	21	1,162		

COL/ - ROW OCT_J42_6\$
 1 J42 Cd
 2 J42 Cu
 3 J42 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of IT38
 Dunnett Test with control = 3,000

Using model MSE of 1,162 with 21 df. Dunnett Two Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	-1,380	1	0,034
2	0,067	2	0,989
3	0,000	3	1,000

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_6\$ (3 levels)
J0 mars, J20 T, J40 T

Dep Var: PROT39 N: 24 Multiple R: 0,741 Squared multiple R: 0,548

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_6\$	33,447	2	16,724	12,752	0,000
Error	27,540	21	1,311		

COL/ - ROW MARS_J0_6\$
 1 J0 mars
 2 J20 T
 3 J40 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of PROT39
 Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 1,311 with 21 df. Dunnett One Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000		
2	2,540	1	1,000
3	0,073	2	0,000
		3	0,494

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J0_6\$ (3 levels)
J0 mars, J20 T, J40 T

Dep Var: IT39 N: 24 Multiple R: 0,783 Squared multiple R: 0,613

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J0_6\$	334,371	2	167,185	16,615	0,000
Error	211,306	21	10,062		

COL/ - ROW MARS_J0_6\$

1 J0 mars

2 J20 T

3 J40 T

Using least squares means.

Post Hoc test of IT39

Dunnnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 10,062 with 21 df. Dunnnett Two Sided Test.

Matrix of mean differences from control:

1	0,000
2	7,234
3	-1,225

Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	1,000
2	0,000
3	0,663

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_6\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: PROT40 N: 24 Multiple R: 0,045 Squared multiple R: 0,002

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_6\$	0,097	2	0,048	0,022	0,979
Error	46,859	21	2,231		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J20_6\$ (3 levels)
J20 Cd, J20 Cu, J20 T

Dep Var: IT40 N: 24 Multiple R: 0,388 Squared multiple R: 0,151

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J20_6\$	80,384	2	40,192	1,861	0,180
Error	453,429	21	21,592		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_6\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_6\$	3	1	2

Dep Var: PROT41 N: 23 Multiple R: 0,461 Squared multiple R: 0,212

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_6\$	5,951	2	2,975	2,695	0,092
Error	22,078	20	1,104		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

MARS_J40_6\$ (4 levels)
, J40 Cd, J40 Cu, J40 T

1 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
MARS_J40_6\$	3	1	2

Dep Var: IT41 N: 23 Multiple R: 0,593 Squared multiple R: 0,351

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
MARS_J40_6\$	11,292	2	5,646	5,413	0,013
Error	20,861	20	1,043		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_6\$ (3 levels)

J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: PROT42 N: 21 Multiple R: 0,174 Squared multiple R: 0,030

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_6\$	0,837	2	0,418	0,282	0,758
Error	26,713	18	1,484		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J0_6\$ (3 levels)

J0 juin, J21 T, J41 T

3 case(s) deleted due to missing data.

Dep Var: IT42 N: 21 Multiple R: 0,602 Squared multiple R: 0,362

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J0_6\$	5,860	2	2,930	5,106	0,018
Error	10,329	18	0,574		

COL/ - ROW JUIN_J0_6\$
 1 J0 juin
 2 J21 T
 3 J41 T
 Using least squares means.
 Post Hoc test of IT42
 Dunnett Test with control = 1,000

Using model MSE of 0,574 with 18 df. Dunnett One Sided Test.
 Matrix of mean differences from control: Matrix of pairwise comparison probabilities:

1	0,000	1	1,000
2	-1,055	2	0,011
3	-1,136	3	0,016

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_6\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: PROT43 N: 24 Multiple R: 0,223 Squared multiple R: 0,050

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_6\$	1,097	2	0,549	0,549	0,586
Error	20,992	21	1,000		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J21_6\$ (3 levels)
J21 Cd, J21 Cu, J21 T

Dep Var: IT43 N: 24 Multiple R: 0,452 Squared multiple R: 0,204

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J21_6\$	4,880	2	2,440	2,690	0,091
Error	19,049	21	0,907		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_6\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_6\$	3	1	2

Dep Var: PROT44 N: 15 Multiple R: 0,377 Squared multiple R: 0,142

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_6\$	1,790	2	0,895	0,993	0,399
Error	10,813	12	0,901		

Effects coding used for categorical variables in model.

Categorical values encountered during processing are:

JUIN_J41_6\$ (4 levels)
, J41 Cd, J41 Cu, J41 T

9 case(s) deleted due to missing data.

The following effects have lost degrees of freedom.

Effect	Initial df	Lost df	Final df
JUIN_J41_6\$	3	1	2

Dep Var: IT44 N: 15 Multiple R: 0,105 Squared multiple R: 0,011

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	df	Mean-Square	F-ratio	P
JUIN_J41_6\$	0,192	2	0,096	0,067	0,936
Error	17,318	12	1,443		
