

Perturbations endocrinienne et reprotoxique chez l'amphipode, *Gammarus pulex*.

Olivier Geffard*, B. Xuereb, R. Tutundjian, K. Abbac

Cemagref, Laboratoire d'écotoxicologie, UR BELY, TR EXPER, 3, bis quai Chauveau, 69336 Lyon

- *: olivier.geffard@cemagref.fr,
- Tel : 04 72 20 87 85

1. Introduction

Parmi les substances polluantes, nombreuses sont décrites comme perturbateurs endocriniens (PE). *In situ*, l'occurrence d'effets reprotoxiques a été principalement associée aux rejets de stations d'épuration, les substances les plus incriminées pouvant être des hormones stéroïdiennes naturelles ou de synthèse, des produits détergents issus des activités domestiques, des médicaments humains... Il existe en revanche beaucoup moins d'informations sur les effets à long terme d'autres types de pollutions, comme les polluants d'origine industrielle ou agricole, alors que certaines substances utilisées sont suspectées d'activité endocrinienne (ex : PCBs, BPA¹, APE², certains herbicides ...) (Ingerselv et al. 2003). L'étude de la disponibilité et de l'impact de ces composés, dits perturbateurs endocriniens, sur les vertébrés aquatiques, en particulier le poisson a fait l'objet de nombreux projets et publications (Matthiessen, 2003 ; Langston et al., 2005 et littérature citée). Ces travaux ont conduit au développement d'outils de diagnostic pouvant être utilisés *in situ*, tels que l'induction de la vitellogénine (Vtg) plasmatique chez les mâles et les juvéniles, l'inhibition de la croissance ovarienne et testiculaire, retard dans la maturité sexuelle, la présence d'individus intersexués, féminisation ou masculinisation des caractères sexuels secondaires et concentrations anormales en hormones stéroïdiennes circulantes. En revanche, peu d'outils sont disponibles chez les invertébrés et l'impact des contaminants sur leur régulation hormonale est mal connu alors qu'ils constituent plus de 95 % des espèces vivantes et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement et la santé des écosystèmes aquatiques. Ce constat résulte en partie de la mauvaise connaissance de leur système de régulation hormonale.

Parmi les invertébrés, la régulation hormonale des crustacés est l'une des mieux documentée (revues de Rodriguez et al., 2007, LeBlanc, 2007). Les ecdystéroïdes et juvénoides représentent deux classes d'hormones qui régulent chez les crustacés de nombreux aspects du développement, de la croissance et de la reproduction. Plusieurs études ont montré la modulation de ces hormones par la présence de contaminants ou des effets biologiques chez des crustacés pouvant être attribuées à une perturbation de la régulation de ces hormones (revue de LeBlanc, 2007). Aujourd'hui, peu d'outils ont été développés et peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'une perturbation endocrinienne. La vitellogénine (Vtg) ou les vitellogénine-like (Vtg-like) sont des protéines précurseurs de la synthèse du vitellus (réserve énergétique nécessaire aux organismes au cours de leur développement embryonnaire) et par conséquent fortement impliquée dans la reproduction. L'induction de Vtg chez les mâles et les juvéniles de poissons est un effet bien connu des contaminants œstrogéniques et fait partie des outils validés et disponibles pour mettre en évidence la présence de ces contaminants dans le milieu. Chez les invertébrés, les Vtg ou Vtg-like sont peu connues et caractérisées. La mesure de ces protéines se développe actuellement autour de deux approches indirectes, la méthode ALP (Alkali-Labile Phosphate, Blaise et al., 1999) et par immuno-essais (e.i. ELISA, Ghekiere et al., 2005). Ces approches ont été utilisées dans plusieurs études et ont permis de mettre en évidence que la synthèse des protéines Vtg-like est la cible de perturbateurs endocriniens chez les crustacés, ce qui en fait un marqueur d'intérêt (Ghekiere et al., 2005 ; Gagné et al., 2005). Schirling et al. (2006) ont mis en évidence, à l'aide d'une approche histopathologique des gonades, une accélération de la maturation gonadique chez des femelles de *Gammarus fossarum* exposées à du BPA.

¹ Bisphenol A

² Alkylphenol polyéthoxylates

Au cours de nos activités de l'an passé, nous avons d'une part caractérisé le cycle de reproduction et proposé des marqueurs d'impact reprotoxique chez les femelles de cette espèce (surface et nombre d'ovocyte ainsi que nombre et anomalie d'embryons) et d'autre part mis au point la mesure de l'expression du gène codant pour la Vtg, proposée comme biomarqueur d'une perturbation endocrinienne chez les organismes mâles.

Les travaux réalisés en 2008 avaient pour objectifs, 1 – d'évaluer la pertinence de la mesure de l'expression du gène Vtg comme biomarqueur chez les mâles, 2 – appliquer les marqueurs développés précédemment (moléculaire, histologique et biométrique) sur des populations de gammares prélevés sur différents stations de la Prédécelle, site atelier du Piren-Seine.

Pour répondre au premier objectif, nous avons exposé, en laboratoire, des organismes mâles à deux composés modèles connus pour être des perturbateurs endocriniens, le nonyl-phenol (NP) et le cyprotérone (CYP), et mesuré l'expression du gène Vtg chez ces individus.

Pour le deuxième objectif, nous avons prélevés des organismes sur les stations sur lesquelles des populations autochtones étaient présentes et appliqué nos différents outils afin d'évaluer un impact reprotoxique et/ou perturbateur endocrinien chez ces individus.

2. Matériel et méthodes

2.1 Effet du NP et du CYP sur l'expression du gène codant pour la Vtg chez les mâles

Des couples de *G. pulex* ont été exposés à une contamination par voie aqueuse, ceci à une température de 12°C. Les concentrations en contaminants étaient pour le NP comprises entre 0.05 et 50 µg/L et pour le CYP comprises entre 1 et 1000 µg/L. Après 2, 4, 8 et 16 jours d'exposition, 5 mâles ont été prélevés pour chacune des conditions et stockés à -80°C pour la mesure de l'expression du gène d'intérêt par RT-PCR. Dans un premier temps et pour chaque condition, la mesure du niveau d'ARNm a été réalisée sur un pool d'ARNm constitué à partir des extraits obtenus sur chacun des individu, ceci afin d'identifier les conditions pour lesquelles l'expression du gène a été modulée. Dans un second temps et pour tester la significativité des modulations observées, les niveaux d'ARNm ont été une nouvelle fois mesurés sur chacun des 5 individus prélevés par condition.

2.2 Etude de terrain

Des organismes, en couple, ont été récupérés en Octobre 2008 sur 4 des stations investiguées, réparties de l'Amont à l'Aval de la Prédécelle : Aval Limours, Amont STEP Briis, Aval STEP briis et Aval étang (Veaugrigneuse). Une fois au laboratoire et pour chaque station, 10 mâles ont été stockés à -80°C pour les mesures de Vtg et entre 6 et 15 femelles (en fonction des prélèvements) ont été observées et utilisées pour l'application des marqueurs de reprotoxicité (Nombre d'ovocyte, histo-pathologie, nombre et développement des embryons). Pour chacune des femelles, le stade de mue a été déterminée.

3. Résultats et discussion

3.1 Effet du NP et du CYP sur l'expression du gène codant pour la Vtg chez les mâles

Les modulations de l'expression du gène de la Vtg chez les mâles de *G. pulex* exposés au N et au CYP sont présentées sur la figure 1. Les résultats montrent que pour les différentes dates de prélèvements, aucune différence significative n'a été observée entre les témoins eau et les témoins solvants, comme le confirme la comparaison n°1 (Figure 2). En revanche et pour les deux types de témoin, une diminution est observée au cours du temps. Cette observation est confirmée par la comparaison n°2 (Figure 2), ou l'on observe une différence significative ($p < 0.05$) pour le témoin solvant entre 2 et 4 jours d'exposition. En revanche, cette différence n'est plus significative entre le 4^{ème} et 16^{ème}. Ces résultats montrent que la manipulation, lors de la mise en place des organismes dans les conditions d'exposition, induit un stress pouvant moduler l'expression de gène comme celui codant pour la Vtg. Concernant les composés testés, dans les deux cas, des inductions significatives ont été observées. Comme couramment rencontré avec les perturbateurs endocriniens, une relation dose-réponse en forme de « cloche » a été obtenue, avec une induction significative ($p < 0.05$) à la concentration de 0.05 µg/L (N1), suivi d'une inhibition aux concentrations plus fortes (Fig. 2, comparaison n°3). Ces résultats montrent qu'une exposition au N, à une

concentration susceptible d'être retrouvée dans le milieu naturel, entraîne une sur-expression du gène Vtg par un facteur de 10 en comparaison des individus témoins. Pour le CYP, une induction significative a été observée mais pour la concentration la plus forte (C4, 1000 µg/L ; Fig. 2, comparaison n°4).

Ces travaux montrent que l'utilisation de l'expression du gène chez les mâles peut être modulée par la présence de composés dits perturbateurs endocriniens et se présente comme un outil intéressant pour l'étude de l'exposition d'invertébrés à ce type de composé. Cependant, ces travaux nécessitent d'être poursuivis notamment pour évaluer son pouvoir discriminant en milieu naturel, mais également comprendre et décrire les variations naturelles de l'expression de ce gène, comme on a pu le voir lors de ce test, conditionnant la robustesse et la fiabilité de la lecture de ce marqueur.

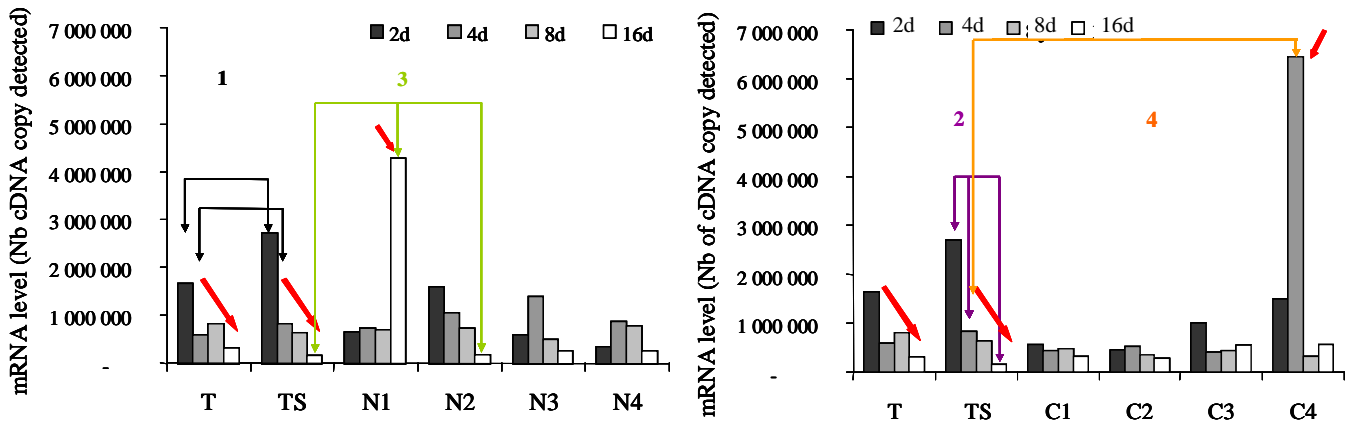


Figure 1 : Expression du gène Vtg chez des mâles de *G. pulex* (pool des ARN extraits) exposés au nonyl-phenol (N) et cyrotérone © exprimée en nombre de copies d'ADNc détecté. T : témoin, TS : témoin solvant, N1 : 0.05µg/L, N2 : 0.5 µg/L, N3 : 5 µg/L, N4 50 µg/L, C1 : 1 µg/L, C2 : 10 µg/L, C3 : 100 µg/L et C4 : 1000 µg/L. Les numéros indiquent les situations pour lesquelles les mesures ont été faites non plus sur les pool d'ARNc, mais individuellement.

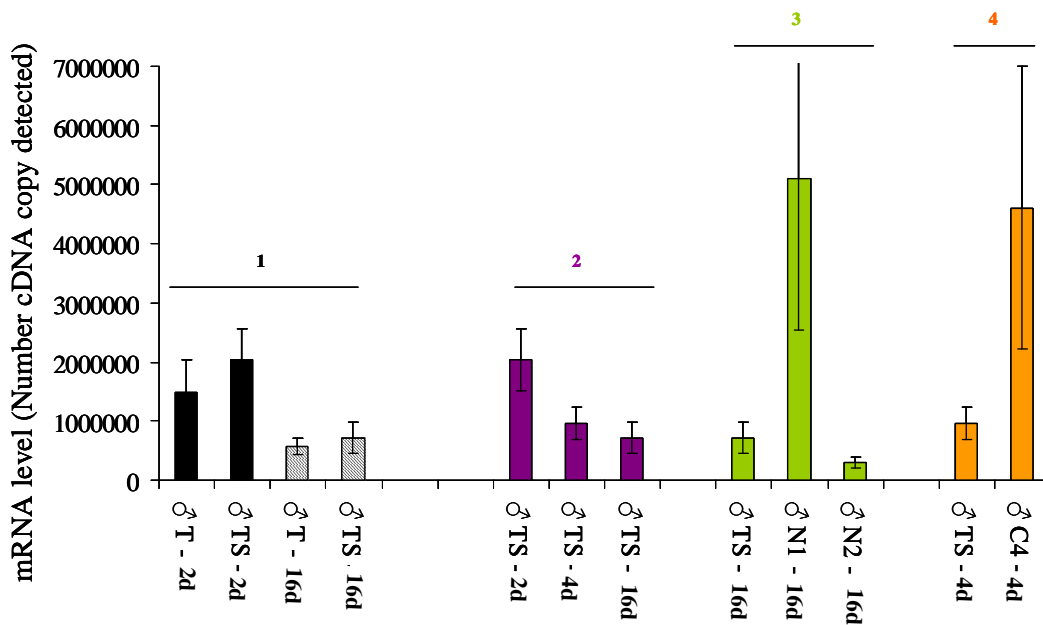


Figure 2 : Expression du gène Vtg chez des mâles de *G. pulex* exposés au nonyl-phenol (N) et cyrotérone © (exprimée en nombre de copies détecté (Moy ± E.T., n =5). T : témoin, TS : témoin solvant, N1 : 0.05µg/L, N2 : 0.5 µg/L, N3 : 5 µg/L, N4 50 µg/L, C1 : 1 µg/L, C2 : 10 µg/L, C3 : 100 µg/L et C4 : 1000 µg/L. Les numéros indique une modulation de l'expression et/ou des comparaisons qui seront testées sur des mesures individuelles. 1 : comparaison des témoins et témoins solvants après 2 et 16 jours d'exposition ; 2 : comparaisons des témoins solvants au cours du temps ; 3 : niveau d'expression chez des organismes témoins et exposés au N aux concentrations 0.05 et 0.5 µg/L ; 4 : niveau d'expression chez des organismes témoins et exposés au CYP à une concentration de 1000µg/L.

3.2 Etude de terrain

La mesure et l'interprétation de marqueurs comme l'expression du gène Vtg, le nombre d'ovocyte et l'histo-pathologie des gonades sont encore en cours. Les résultats disponibles aujourd'hui sont présentés dans le tableau 1. Ils montrent, pour les 4 stations étudiées, que la majorité des femelles étudiées se trouvent en fin de cycle de mue et de reproduction puisqu'elles sont le plus souvent en D1 et D2 et ont des embryons en stade 4 et 5. En D2, le développement embryonnaire est terminé et les juvéniles ont éclos, par conséquent, ce stade ne peut être utilisé pour quantifier le pouvoir reproducteur des femelles (Nb embryon/ femelle), puisque des juvéniles peuvent avoir quittés le marsupium. Par conséquent, le choix d'avoir sélectionné des individus en couple ne semble par pertinent, car nous a conduit à favoriser la sélection de femelles en fin de cycle. Cependant ces premiers résultats montrent, d'une part qu'il n'y a pas de désynchronisation entre les stades de mue et le développement embryonnaire, pouvant être traduit par une absence d'effet et/ou de retard du cycle de mue pour les femelles des différentes stations. Cependant, il est à noter, pour les stations Amont STEP briis et Veaugringneuse, une occurrence marquée d'embryons anormaux pour les femelles en stade de mue C2 et D1, ce que nous n'observons pas habituellement sur des sites de référence. A l'inverse, pour la station Aval Limours, aucun embryon anormal n'a été observé. Ces observations sont à prendre avec précautions, car le nombre d'observation est faible et ne nous permet pas de comparer les stations entre elles, notamment du fait que sur la station Aval STEP Briis nous n'ayons que des femelles en stade de mue D2.

Bien que la lecture quantifiée des observations histo-pathologiques sur les gonades ne soit pas encore disponible, une première observation des coupes histologiques montre la présence d'anomalies aux niveaux des ovocytes pour les femelles prélevées à l'Aval de la STEP de Briis et à Veaugringneuse. Ces anomalies se traduisent d'une part par une désorganisation des globules lipidiques et de vitellus et d'autre part par l'apparition de ovocytes atrétiques.

Tableau 1 : Stade de mue, stade et nombre d'embryons observés chez les différentes femelles étudiées sur les 4 stations.

Stations	N°	Stade de mue	Stade embryon	Nb Embryon normaux	Nb Embryon anormaux
Aval Limours	1	C1	/	0	
	2	C2	3	25	
	3	C2	3	16	
	4	C2	3	13	
	5	D1	4	6	
	6	D2	/	0	
	7	D2	5	11	
	8	D2	5	17	
	9	D2	/	0	
	10	D2	5	29	
	11	D2	/	0	
Amont STEP Briis	12	C2	3	5	6
	13	C2	3	5	3
	14	C2	4	9	2
	15	C2	3	2	6
	16	D1	4	3	2
	17	D1	/	0	
	18	D1	/	0	
	19	D1	4	3	6
	20	D1	4	4	
	21	D1	4	3	7
	22	D1	4	9	5
	23	D2	5	5	
	24	D2	/	0	
	25	D2	/	0	
	26	D2	5	8	
Aval STEP Briis	27	D2	5	8	
	28	D2	/	0	
	29	D2	5	7	
	30	D2	/	0	
	31	D2	5	9	
	32	D2	/	0	
Veaugringneuse	33	C2	3	1	5
	34	D1	/	0	
	35	D2	5	17	1
	36	D2	/	0	
	37	D2	5	6	
	38	D2	5	6	
	39	D2	/	0	
	40	D2	5	8	
	41	D2	5	7	
	42	D2	5	16	

4. Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés en 2008 ont permis de mettre en évidence la pertinence de la mesure de l'expression du gène codant pour la Vtg comme biomarqueur d'une perturbation endocrinienne chez les individus mâles de cette espèce. La pertinence de cette approche a été testée sur des organismes prélevés sur les différentes stations de la Prédédelle, les données sont en cours d'analyse. Cependant, la caractérisation et la quantification de la variabilité naturelle de l'expression de ce gène, même faible, est indispensable pour augmenter la fiabilité et la robustesse de ce biomarqueur.

Les données de terrain doivent être considérées comme des résultats préliminaires et nécessitent d'être confirmés. Cependant, ces premiers résultats montrent que les milieux étudiés n'ont pas d'effet sur le cycle de mue des femelles, mais induisent des anomalies embryonnaires. Une comparaison fine entre les stations nécessite de refaire des prélèvements et de sélectionner des femelles en milieu de cycle de reproduction.

Les informations concernant l'expression du gène Vtg chez les mâles et les anomalies tissulaires des gonades femelles devraient être disponibles en Mars – Avril 2008.

Les différentes stations investiguées en 2008 seront une nouvelle fois étudiées en 2009. Il est envisagé d'élargir à d'autres sites ateliers du Piren-Seine, notamment des stations sur l'Orge.

5. Bibliographies

- Blaise C, Gagné F, Pellerin J, Hansen PD. 1999. Détermination of Vitellogenin-Like Properties in *Mya arenaria* Hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A Potential Biomarker for Endocrine Disruption. *Environ Toxicol* 14, 455-465.
- Gagné F, Blaise C, Pellerin J. 2005. Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus sp.* collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research* 98, 89-99.
- Ghekiere A, Fenske M, Verslycke T, Tyler C, Janssen C. 2005. Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). *Comparative Biochemistry and Physiology, part A* 142, 43-49.
- Ingerselv F, VaclavickE, Halling-Sorensen B. 2003. Pharmaceuticals and personal care products : a source of endocrine disruption in the environment ?. *Pure App. Chem.* 75 (11-12) : 1881-1893.
- Langston WJ, Burt GR, Chesman BS, Vane CH. 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in aquatic environment. *J Mar Biol Ass U.K.* 85:1-31.
- LeBlanc GA. 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16:61-81
- Matthiessen P. 2003. Endocrine disruption in marine fish. *Pure Appl Chem* 75, 2249-2261.
- Rodriguez MR, Medesani DA, Fingerman M. 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants : A review. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146, 661-671
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, Ludwichowski K.U, Nagel R, Köhler H.R, Triebkorn R. 2006. Bisphenol A in artificial indoor streams : II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology*, 15:143-156.