

Développement d'outils pour évaluer les perturbations de la reproduction chez un crustacé amphipode, *Gammarus pulex*.

Olivier Geffard*, B. Xuereb, S. Dehay, K. Abbaci

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. L'interprétation et l'utilisation de ces réponses biologiques

¹ Bisphenol A

² Alkylphenol polyéthoxylates

comme indicateurs d'une perturbation endocrinienne consiste tout d'abord à décrire ces réponses chez des organismes contrôles. Une perturbation peut être diagnostiquée si les variations naturelles de ces réponses sont connues et décrites, notamment lors du cycle de reproduction.

Les objectifs de nos travaux sur la première année du projet étaient de décrire et de caractériser le cycle de reproduction chez le crustacé amphipode *Gammarus pulex* (femelle), en se basant sur une approche histologique et biométriques. Cette étape est indispensable avant le développement de marqueurs moléculaires (vitellogénine, hormones de mue,...). Chez *G. pulex*, le cycle de mue et de reproduction sont parfaitement synchronisés chez les organismes femelles. Juste après la mue, les ovocytes II^{aires} sont pondus dans le marsupium où ils vont être fécondés puis y poursuivre leur développement. Le développement des embryons se fait tout au long du cycle de mue, l'éclosion et la sortie des juvéniles se produisent juste avant la mue suivante. Une fois les ovocytes II^{aires} pondus dans le marsupium, la femelle entame un nouveau cycle de maturation et ce jusqu'à la prochaine mue. Étant donné la synchronisation de ces deux fonctions physiologiques très importantes pour la reproduction de cette espèce (croissance de l'organisme et maintien de la population), il nous a semblé indispensable de les décrire pour caractériser le cycle de reproduction et pouvoir l'utiliser comme outil d'évaluation d'impact de composés reprotoxiques.

Pour ceci, nous avons tout d'abord décrit et caractérisé les différents stades de mue chez cette espèce, puis pour chaque stade et nous avons ensuite caractérisé le développement des gonades (mesures biométriques et analyse histologique) et des embryons.

2. Matériel et méthodes

2.1 Caractérisation du cycle de mue

Le cycle de mue a été décrit en se basant sur le développement des tissus du 3^{ème} et 4^{ème} périopodes (Blanchet, 1980). Des couples ont été isolés et les femelles ont été suivies tout au long de leur cycle de mue. Pour chaque organisme, l'observation d'une mue dans le bûcher correspondait au temps T0 du suivi. Ainsi, la structure tissulaire des périopodes a été étudiée sur des organismes à des pas de temps régulier après la mue. Le cycle de mue a été caractérisé pour une température d'exposition des organismes de 12°C

2.2 Caractérisation du cycle de reproduction

A partir du cycle de mue décrit précédemment, nous avons cherché à décrire et caractériser le cycle de reproduction chez cette espèce. Pour ceci, deux approches ont été utilisées, d'une part la mesure de la surface des ovocytes *in toto* et l'étude du stade de développement des embryons et d'autre part l'étude histologique de la structure des gonades.

Les mesures biométriques (surface moyenne des ovocytes et développement des embryons) ont été réalisées sur des organismes adultes prélevés dans le milieu naturel et de taille homogène (7 à 9,5 mm). Pour chaque stade de mue, 20 femelles ont été observées.

Surface moyenne des ovocytes : L'organisme est placé entre deux lames et observé au microscope. Les Ovocytes sont observés par transparence au travers de la cuticule et photographiés à un grossissement de 50. La surface de chaque ovocyte est ensuite déterminée par analyse d'image (logiciel Visilog 6.1).

Développement des embryons : Pour chaque stade de mue, les embryons sont récupérés et photographiés sous loupe binoculaire (grossissement $\times 20$).

Structure tissulaire des gonades : Pour chaque stade de mue, trois femelles ont été fixées par immersion dans du Bouin pendant 24h. Les organismes sont ensuite rincés et conservés dans de l'alcool à 70°. La déshydratation a été réalisée par une série de trois bains d'alcool à 90° de 1h30, suivie de trois bains de 45 minutes dans de l'alcool à 100° et enfin par 2 bains successifs de butanol (le dernier durant toute la nuit). Le passage en paraplast nécessite un bain d'histochoice de 2 heures puis 4 bains de 1 heures dans le paraplast. Les gammares sont ensuite inclus dans des blocs de paraplast coulés dans des barres de leuckart. La totalité de la gonade est coupée à une épaisseur de 4 µm.

3. Résultats et discussion

3.1 Caractérisation du cycle de mue

En accord avec les observations de Sutcliffe (1992), le cycle de mue est de 30 jours environ à une température de 12°C. Six stades ont été identifiés (Fig. 1). Deux stades de post-mue (A et B) dont la durée est respectivement de 1 et 3 jours, deux stades d'inter-mue (C1 et C2) de 9 jours chacune et deux stades de pré-mue (D1 et D2) de 3 et 5 jours

Post-mue : le stade A se caractérise par une cuticule très fine. L'épaississement de la cuticule, au niveau de la soie présente à la base de l'ongle indique le passage au stade B.

Inter-mue : les stades d'inter-mue se caractérisent par le décollement de la matrice de l'ongle de celle de la cuticule, faisant apparaître au stade C2 les fentes circulaires.

Post-mue : cette étape de la mue se caractérise par l'apparition d'une cuticule, dans un premier temps sur l'ongle néo-formé (D1), puis sur les différentes soies du périopode

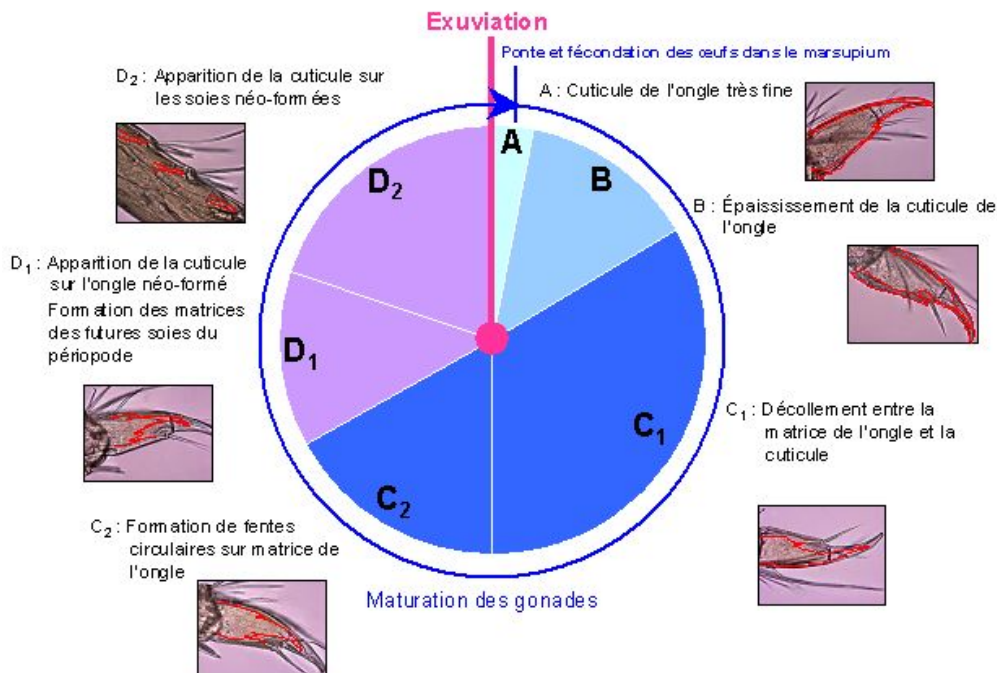


Figure 1 : Caractérisation du cycle de mue chez *Gammarus pulex*. Les critères pour chaque stade (écrits en noir) se basent sur le développement des tissus à l'extrémité des périopodes.

3.2 Caractérisation du cycle de reproduction

3.2.1 surface ovocytaire

Les ovocytes des femelles en stade A sont trop petits pour être observés et photographiés. La figure 2 décrit l'évolution de la surface moyenne des ovocytes au cours du cycle de reproduction. Les résultats montrent que chaque stade de mue se caractérise par une surface moyenne ovocytaire différente, avec des valeurs de 24 000 μm^2 pour le stade B, 45 000 pour le stade C1, 106 000 pour le stade C2, 135 000 pour le stade D1 et 165 000 pour le stade D2. La surface des ovocytes augmente tout au long du cycle de maturation des gonades, avec une croissance très marquée au cours du stade C2, traduisant la mise en place de la vitellogénèse secondaire. Ces résultats sont parfaitement en accord avec la mesure de l'expression du gène codant pour la protéine type vitellogénine ou nous avons pu observer que son expression maximale se situe au cours du stade C2 (résultats non présentés).

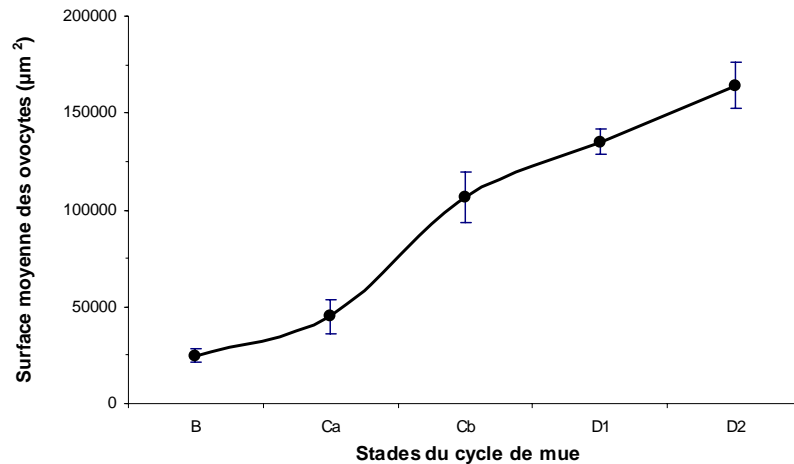


Figure 2 : Surface ovocytaire moyenne ($\mu\text{m}^2 \pm \text{I.C.}$, $n = 20$) chez les femelles de *Gammarus pulex* en fonction de leur stade de mue.

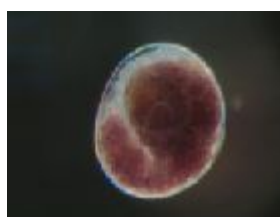
3.2.2 développement embryonnaire

En accord avec les observations de Sutcliffe (1992) six stades de développement embryonnaire ont été caractérisés et décrits (Fig. 3). Comme pour les surfaces ovocytaires, nos observations ont permis de mettre en évidence que chaque stade de mue se caractérise par un stade embryonnaire (Fig. 4). Ces résultats montrent que le développement embryonnaire et le cycle de mue des femelles sont synchronisés.

Les œufs sont fécondés lors de leur sortie de l’oviducte par le sperme disposé au cours de l’accouplement. Les embryons d’une même portée présentent un développement synchrone (90%). Les œufs sont de forme elliptique, avec un pôle arrondi et un pôle plus pointu sur l’axe longitudinal. A la ponte, ils sont violets, homogènes, opaques et délimités par une fine membrane. Cet aspect homogène et opaque est caractéristique du **stade 1** qui est observé chez 100 % des femelles en **stade A et B** de la mue et 12,5 % des femelles en **stade C1** (Fig. 4). L’embryon présente par la suite une flexion ventrale. Ce critère morphologique marque l’entrée en **stade 2**. Durant ce stade, on observe l’apparition des bourgeons appendiculaires et l’initiation de leur développement. Le **stade 2** est observé chez 100 % des femelles en **stade C1** de la mue. L’apparition d’un bourgeon céphalique clairement visible a été choisie comme critère pour l’entrée en **stade 3**. La formation des appendices se poursuit. Au cours de ce stade, l’intestin et les caecum se distinguent. Le **stade 3** est observé chez 100 % des femelles en **stade C2** de la mue (Fig. 19). La présence d’omatidies complètement formées, de couleur rouge intense, est le critère retenu pour le **stade 4**, qui représente le stade des embryons chez 100 % des femelles en **D1**, 17 % des femelles en **C2** et 11 % des femelles en **D2** (Fig. 19). L’éclosion se produit en **stade D2** de la mue, 90% des femelles à ce stade portent des jeunes.



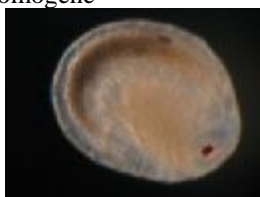
Stade 1 : L’embryon est ovoïde et homogène



Stade 2 : Apparition de la ventroflexion



Stade 3 : Formation du bourgeon céphalique



Stade 4 : Omatidies complètement formées de couleur rouge



Stade 5 : éclosion, juvéniles

Figure 3 : Description des différents stades de développement embryonnaire chez *Gammarus pulex*.

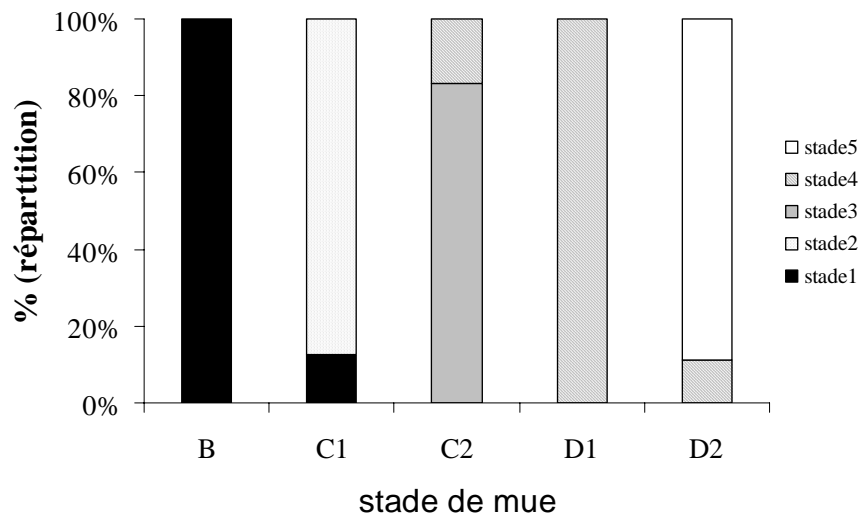


Figure 4 : Répartition (% , n = 20) des stades de développement embryonnaire en fonction des stades de mue chez les femelles de *Gammarus pulex*.

3.2.3 Structure tissulaire de la gonade

Quelques heures après l'exuviation, au début du **stade A**, les ovocytes arrivés au terme de la vitellogénèse secondaire sont pondus. Chaque ovaire est alors constitué d'une zone germinative médiale contenant les ovogonies, bordée latéralement par des ovocytes en vitellogenèse primaire et des cellules folliculaires libres. Les ovocytes en vitellogenèse primaire sont blancs en observation macroscopique. A l'examen histologique, ils contiennent une vésicule germinative centrale, ovoïde, entourée par un cytoplasme peu abondant, contenant un matériel finement granuleux, basophile (Fig. 5). Cette basophilie s'atténue au cours du **stade B**. Les cellules folliculaires s'organisent autour de l'ovocyte en un follicule secondaire. Les dernières cellules folliculaires libres forment alors un cordon folliculaire latéral, visible en coupe transversale. La vitellogénèse secondaire débute ensuite. De petites gouttelettes lipidiques et de rares globules de vitellus apparaissent en périphérie du cytoplasme. Pendant le **stade C1**, la taille des ovocytes augmente sous l'effet d'une accumulation constante de globules de vitellus, de diamètre croissant, à sa périphérie. Ils prennent alors une teinte mauve en observation macroscopique. Au **stade C2**, la taille des ovocytes s'accroît fortement. La vésicule germinative est toujours centrale entourée d'une fine couche persistante de matériel amphophile finement granuleux et d'une épaisse couche constituée de globules de vitellus de diamètre important et de grosses gouttelettes lipidiques mélangés de façon homogène. Les ovocytes prennent une coloration violette en observation macroscopique. Au **stade D1**, la croissance des ovocytes se poursuit et ils s'étendent latéralement. La vésicule germinative commence à migrer et finit en position latérale au cours du **stade D2**. Le cytoplasme est alors très étendu et contient un mélange homogène de gros globules de vitellus et de gouttelettes lipidiques.

4. Conclusion et perspectives

Les travaux de cette première année ont permis de décrire et de caractériser le cycle de reproduction chez *Gammarus pulex*. La figure 6 présente une synthèse de ce cycle et des critères développés. Cette première phase du travail était indispensable pour poursuivre le développement de biomarqueurs de perturbations endocriniennes (vitellogénine-like, ecdystéroïdes, ...etc) chez cette espèce. De plus, ces travaux montrent que la mue, le développement embryonnaire et la maturation des gonades sont synchronisés. La mue est sous le contrôle hormonale des ecdystéroïdes, le développement embryonnaire dépend notamment de la régulation d'hormones juvénoides et la maturation des gonades est sous l'influence de la synthèse de protéine type vitellogénine, dont la régulation semble être réalisée également par les ecdystéroïdes. Les critères développés et utilisés dans ce travail sont également proposés comme outils pour évaluer l'impact de contaminants ou de milieu naturel sur la reproduction de cette espèce (dé-synchronisation des différents cycle physiologiques).

Pour 2008, nous proposons d'appliquer ces outils sur des populations de gammare présentes dans des milieux soumis ou non à de l'anthropisation.

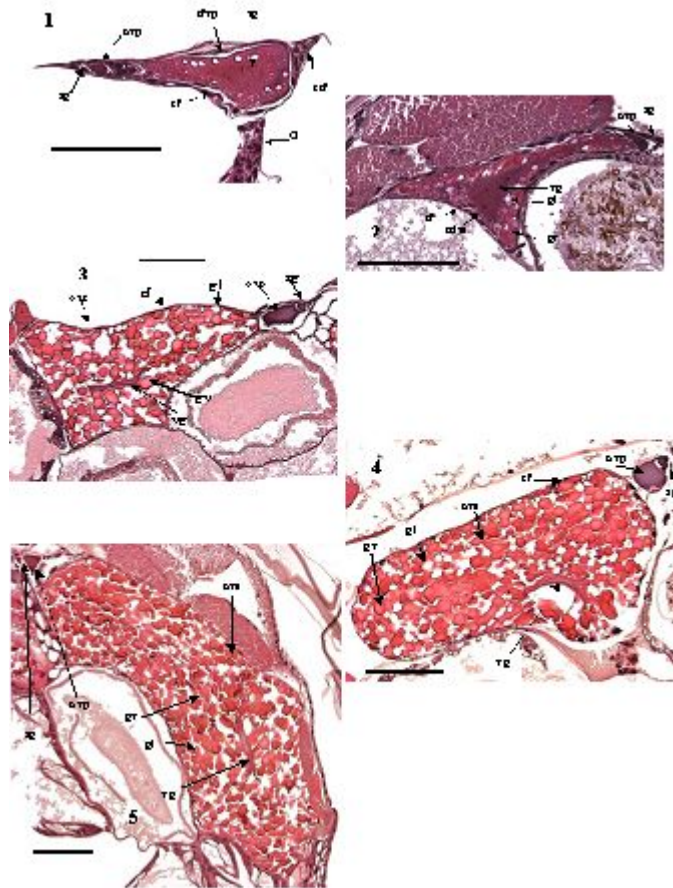


Figure 5 : Evolution structurale histologique de l'ovaire au cours du cycle de mue chez *Gammarus pulex*

- Coupe transversale de l'ovaire au stade B, coupe n°1
- Coupe transversale de l'ovaire au stade C1, coupe n°2
- Coupe transversale de l'ovaire au stade C2, coupe n°3
- Coupe transversale de l'ovaire au stade D1, coupe n°4
- Coupe transversale de l'ovaire au stade D2, coupe n°5

cdf, cordon folliculaire ; cf, cellule folliculaire ; gl, gouttelette lipidique ; gv, globule vitellin ; O, oviducte ; odvs, ovocyte en début de vitellogénèse secondaire ; ofvp, ovocyte en fin de vitellogénèse primaire ; ovp, ovocyte en vitellogénèse primaire ; vg, vésicule germinative ; zg, zone germinative.
Barre = 100 µm.

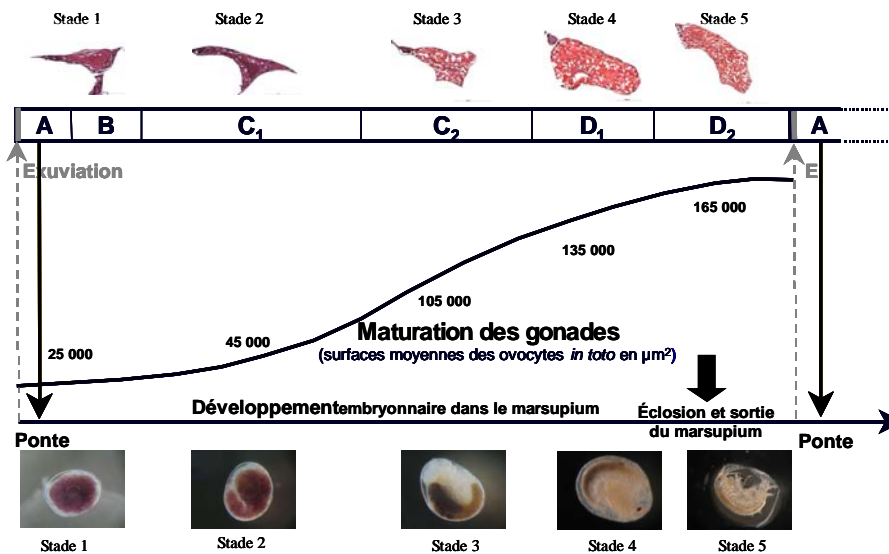


Figure 6 : cycle de reproduction chez la femelle *Gammarus pulex*.

5. Bibliographies

- Blanchet-Tournier M-F. 1980. Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas) : contrôles endocrines et interactions. Thèse, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6, France.
- 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.
- Sutcliffe DW. 1992. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda): basic reproductive processes. *Freshwater forum* 2:102-128.