



HAL
open science

Effets de stress physico-chimiques sur l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie et la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique chez le loup (*Dicentrarchus labrax* L.).

Lamia Hachfi

► To cite this version:

Lamia Hachfi. Effets de stress physico-chimiques sur l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie et la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique chez le loup (*Dicentrarchus labrax* L.). Biologie animale. Université de Toulon, 2013. Français. NNT : 2013TOUL0018 . tel-01132551

HAL Id: tel-01132551

<https://theses.hal.science/tel-01132551>

Submitted on 17 Mar 2015

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

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

ÉCOLE DOCTORALE
Mer et Sciences (ED 548)
Laboratoire PROTEE-EB2M

THÈSE

Présentée par :

Lamia Hachfi

soutenue le : **16 Décembre 2013**

Pour obtenir le grade de Docteur en
Sciences de la vie

Effets de stress physico-chimiques sur l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie et la fonction de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique chez le loup (*Dicentrarchus labrax* L.).

THÈSE dirigée par :

Mr GRILLASCA Joël Paul
Mme PREVOT D'ALVISE Nathalie

Pr, Université de Toulon
Dr, Université de Toulon

JURY :

Mr CHAPPAZ Rémi
Mr GOUZE Jean-Noël
Mr VICENTE Nardo
Mme RISSO Christine

Pr, Rapporteur, Aix Marseille Université
Dr, Rapporteur, Genbiotech
Pr, Examineur, Aix Marseille Université
Dr, Examineur, Université de Nice Sophia Antipolis

DEDICACE

A celle qui s'est toujours dévouée pour moi et qui voyait dans mon succès le sien, à ma chère maman. Ta tendresse, ton amour et ta confiance me guident tous les jours.

A mon très cher papa à qui tous les mots ne suffiraient pas pour exprimer ma gratitude et mon admiration.

Sans vous je ne serai pas ce que je suis aujourd'hui

A mon très cher époux Mohamed, qui a toujours été présent pour me soutenir et me supporter dans les deux sens du terme, ce travail te doit énormément...

A mon petit trésor Yasmine, «Maman a enfin fini sa thèse! », merci pour tous les moments de bonheur que tu m'offres, il suffisait de te regarder pour oublier mes dures journées

A mon frère et ma sœur adorés, et toute la famille qui s'est agrandie, je vous aime

Que ce travail soit le témoignage de ma reconnaissance pour vous tous de ces années de compréhension et de soutien...

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord le Pr Rémi Chappaz et le Dr Jean-Noël Gouze pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Mes remerciements s'adressent également à Dr Christine Risso et le Pr Nardo Vicente pour avoir participé à ce jury de thèse en tant qu'examineurs.

Mes remerciements vont également à mes deux co-directeurs de thèse Joël Grillasca et Nathalie Prévot D'Alvise pour avoir accepté d'encadrer ce travail.

Je voudrais exprimer ma profonde gratitude à Joël Grillasca pour m'avoir chaleureusement accueillie dans son équipe.

Et je remercie particulièrement Nathalie Prévot D'Alvise pour sa disponibilité, sa patience et pour avoir toujours répondu à mes questions.

Mes remerciements vont bien évidemment à l'ensemble de l'équipe de biologie moléculaire marine avec qui j'ai partagé de beaux moments et qui ont tous contribué de près ou de loin à ce travail.

Simone, un grand merci pour ton aide pour les statistiques et pour ta compassion à chaque fois que la biologie moléculaire me jouait un mauvais tour. Tu trouvais toujours les bons mots pour que j'aie de l'avant. J'ai beaucoup appris de toi tant sur le plan scientifique que sur le plan humain, merci !

Sandrine, merci pour tous tes conseils et pour avoir toujours été présente. Je te souhaite tout le succès que tu mérites pour ta PFT et beaucoup de tortues ayant le nez qui coule.

Stéphanie, mes loups te doivent beaucoup, c'est grâce à toi que j'ai appris à bien m'occuper d'eux (et aussi à les sacrifier comme il se doit !). En témoignage de ma reconnaissance je me mets à la spiruline, c'est promis !

Stéphane, tes critiques et tes conseils toujours constructifs m'ont beaucoup apporté durant ces 4 ans tant sur le plan théorique qu'expérimental.

Rémy, les deux Sylvain (s), Laura,... bon courage dans vos thèses.

J'adresse également mes remerciements à Cédric Garnier et à Gaël Durrieu de l'équipe Capte pour les dosages chimiques et pour toutes les explications qu'ils m'ont apportées à ce propos. Je n'oublie pas Bernard Angeletti du CEREGE pour les mesures effectuées à Aix en Provence par ICP-MS.

Et finalement, je ne remercierai jamais assez mes parents pour leur soutien et leurs encouragements, c'est grâce à vous que j'en suis arrivée là aujourd'hui.

Pareil pour mon chéri qui s'est investi dans cette thèse financièrement, physiquement et moralement et qui sans lui cette thèse n'aurait simplement pas eu lieu.

Merci à ma fille Yasmine, mon rayon de soleil, qui me donne tous les jours la force pour avancer.

Merci à toute ma famille et tous mes amis qui m'ont soutenue durant cette période. Je remercie spécialement Hélène, tes mots et ton soutien m'ont fait beaucoup de bien. Merci à toi aussi Samira parce que, malgré la distance, tu es toujours là pour moi. Je remercie également Dalila et Abir pour leur soutien.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je voudrai remercier Rachid Sakly pour avoir cru en moi et m'avoir transmis son amour pour la recherche.

Merci à toute personne qui a rendu de près ou de loin ce travail possible...

SIGLES & ABBREVIATIONS

11KT : 11-Kétotestostérone

17,20βP : 17α, 20β-dihydroxy-4- pregnen-3-one

-A-

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

Ag : Argent

AgCl : Chlorure d'argent

AR : récepteur d'androgène

ARN : Acide ribonucléique

Arom a : Aromatase a

Arom b : Aromatase b

-B-

B_{Et} : Bromure d'éthidium

-C-

CAPTE : Chimie Analytique et Processus de Transfert dans l'Environnement

Cd : Cadmium

Chg : Choriogénine

-D-

dNTP : désoxyribo Nucléotide Tri Phosphate

DO : Densité optique

d_{pf} : days post-fertilization

DTT : Dithiothréitol

DJT : Dose journalière tolérable

DHT : Dose hebdomadaire tolérable

-E-

E : l'efficacité de la PCR, elle est comprise entre 0 et 1

E₂ : 17β-œstradiol

EB_{2M} : Equipe de Biologie Moléculaire Marine

EE₂ : éthinyloœstradiol

ER : récepteur d'œstrogène

-F-

FSH : Hormone folliculo-stimulante

-G-

GnRH : Hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires

G_{pa} : Glycoprotéine α

GSI : Indice gonado-somatique

-H-

HDPE : Polyéthylène haute densité

HHG : Hypothalamo-hypophyso-gonadique

HHGH : Hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique

HNO₃ : Acide nitrique

HO : Hème Oxygénase

HSP : Heat Shock Protein

-I-

Ifremer : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

-K-
KCl : Chlorure de potassium

-L-
LH : Hormone lutéinisante

-M-
MFO : Mixed Function Oxydase

MgCl₂ : Chlorure de magnésium

MIHs : maturation-inducing hormones

MT : Métallothionéines

-N-
n : nombre de cycles de la PCR

N : quantité finale d'ADN

N₀ : quantité initiale d'ADN

NOEC : Concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observable

NO₂ : Nitrites

NO₃ : Nitrates

NP : Nonylphénol

-P-
pb : paire de bases

Pb : Plomb

PCB : Polychlorobiphényles

PE : Perturbateurs endocriniens

pH : Potentiel hydrogène

ppm : partie par million

PTFE : Polytétrafluoréthylène

-Q-
qsp : quantité suffisante pour

-R-
RT-PCR : Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction

-S-
S : Stéroïdes

SBP : Protéinesliant lesstéroïdes

StAR : Protéine de régulation aigüestéroïdogénique

-T-
T : Testostérone

TBE : Tris Borate EDTA

T_m : Température d'hybridation

TPH : tryptophane hydroxylase

-U-
U : Unité

-V-
Vol : Volume

Vtg : Vitellogénine

-W-
Wap 65 : Warm temperature Acclimation-related 65kDa Protein

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....	15
I. La mer en danger.....	17
1. Le changement de températures.....	17
2. La pollution marine.....	19
a) Les principales sources de pollution marine.....	19
b) Les polluants.....	20
3. Etat des ressources piscicoles : surexploitation et pollution	21
II. L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Gonado-Hépatique chez les poissons.....	23
III. Les perturbateurs endocriniens	28
1. Définition et généralités.....	28
2. Classement des PE.....	30
a) Les composés œstrogéniques	30
b) Les composés anti-œstrogéniques	30
c) Les composés androgéniques	31
d) Les composés anti-androgéniques	31
3. L'impact des PE.....	32
a) L'impact des PE sur le système endocrinien	32
i. Sur la synthèse hormonale.....	32
ii. Sur le foie	34
b) L'impact des PE sur le développement sexuel des poissons	39
i. La détermination et la différenciation sexuelles	40
ii. La maturation sexuelle.....	41

c)	L'impact des PE sur la production de gamètes et la fertilité	43
d)	L'impact des PE sur l'expression génique	45
4.	Cas des métaux lourds en tant que PE	49
a)	Le cadmium	53
i.	Généralités	53
ii.	Ecotoxicologie	54
b)	Le plomb	57
i.	Généralités	57
ii.	Ecotoxicologie	58
IV.	Modèle animal : <i>Dicentrarchus labrax</i> L.....	62
1.	Pourquoi le loup ?	62
2.	Classification et répartition	62
3.	Biologie	63
4.	Reproduction	64
a)	La différenciation sexuelle.....	64
b)	L'installation de la puberté et maturation	65
5.	Exploitation de la ressource loup.....	66
a)	Pêche	66
b)	Aquaculture	67
	MATERIEL ET METHODES.....	69
I.	Zootechne.....	70
1.	Installations et aquariums	70
2.	Réception et entretien des poissons	74
II.	Etude de l'effet de la température sur l'expression de <i>ho-1</i>.....	77
III.	Etude de l'impact des métaux lourds sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique.....	78

1.	Etudes préliminaires	78
2.	Détermination des concentrations d'intoxication des métaux.....	78
3.	Intoxication aux métaux.....	79
IV.	Analyses chimiques	82
1.	Dosage des métaux dans l'eau	82
2.	Dosage des métaux dans le foie	82
VI.	Biologie moléculaire	87
1.	Extraction des ARN totaux	87
2.	Transcription inverse	87
3.	Réaction de polymérisation en chaîne	88
a)	L'hème oxygénase 1	90
b)	L'aromatase a et l'aromatase b	91
c)	La glycoprotéine α, l'hormone folliculo-stimulante, sous unité β et l'hormone lutéinisante, sous unité β	91
d)	Vitellogénine	91
e)	Métallothionéine.....	95
4.	Electrophorèse	96
a)	Sur gel d'agarose.....	96
b)	Electrophorèse capillaire.....	96
5.	Outils statistiques.....	97
a)	Etude de l'effet de la Température sur l'expression de <i>ho-1</i> au niveau des tissus	97
b)	Etude de l'effet du Cd et du Pb sur l'expression des gènes le long de l'axe HHGH.....	97
	RESULTATS ET DISCUSSION.....	98
I.	Etude de l'effet de la température sur l'expression de <i>ho-1</i>.....	100
1.	Dans le foie	100

2.	Dans la rate	102
3.	Dans les reins.....	103
4.	Dans l'intestin.....	104
5.	Dans le cœur, le cerveau, le muscle et les branchies	105
II.	Etude de l'effet des métaux lourds sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique	108
1.	Impacts physiologiques.....	108
a)	Mortalité	108
b)	Croissance	108
2.	Bioaccumulation métallique au niveau du foie.....	110
3.	Indice gonado-somatique.....	116
4.	Niveau d'expression de gènes représentatifs de l'axe HHGH	118
a)	Dans le cerveau	118
b)	Dans les gonades	123
c)	Dans le foie	125
5.	Effet du Cd et du Pb sur l'expression de <i>ho-1</i>	129
a)	Réponse de <i>ho-1</i> au Cd	129
b)	Réponse de <i>ho-1</i> au Pb	129
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	134
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	141
	PUBLICATIONS.....	167

TABLE DES ILLUSTRATIONS

<i>Figure 1 : Variation de la température moyenne à l'échelle du globe d'après Pachauri 2007.....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 2 : Variation du sexe ratio avec la température chez différentes espèces de poissons.....</i>	<i>18</i>
<i>Figure 3 : Exploitation des stocks de poissons de 1992 à 2009. D'après United Nations 2013.....</i>	<i>22</i>
<i>Figure 4 : Capture de poissons et production en aquaculture pendant la période 1992-2010. D'après United Nations 2013.</i>	<i>22</i>
<i>Figure 5: Présentation de l'axe hypothalamo-hypophyséogonadotrope chez les poissons mâles et femelles (Hachfi et al. 2012).....</i>	<i>23</i>
<i>Figure 6 : Systèmes enzymatiques impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques et des stéroïdes (inserm 2011).</i>	<i>36</i>
<i>Figure 7 : Fonctions métaboliques du cytochrome P450 (Guéguen et al. 2006).</i>	<i>36</i>
<i>Figure 8 : Induction des métallothionéines et compétition métallique avec le zinc.</i>	<i>39</i>
<i>Figure 9 : Impacts des perturbateurs endocriniens chez les poissons à différents stades de développement.</i>	<i>40</i>
<i>Figure 10 : Rôle de l'aromatase dans la différenciation sexuelle.</i>	<i>43</i>
<i>Figure 11 : Réponses concentration-dépendantes des gènes de l'axe HHGH chez le medaka (Oryziaslatipes, Temminck & Schlegel, 1846) suite à une exposition à l'EE2.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 12 : Corrélation négative entre le GSI et la concentration du Pb au niveau du foie.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 13 : Dicentrarchus labrax L.....</i>	<i>63</i>
<i>Figure 14 : La bouée océanographique Bora2.</i>	<i>70</i>
<i>Figure 15 : Circuit principal d'eau et systèmes de filtration</i>	<i>71</i>
<i>Figure 16 : Schéma de l'installation hydraulique et des aquariums.....</i>	<i>72</i>
<i>Figure 17 : Colonnes des aquariums mises en eau.....</i>	<i>73</i>
<i>Figure 18 : Poches d'évaporation contenant de l'eau contaminée par les métaux.....</i>	<i>74</i>
<i>Figure 19 : La pêche des loups, ferme Tamaris Sud fish.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 20 : Transport des loups depuis la ferme Tamaris Sud Fish jusqu'au quai.....</i>	<i>75</i>
<i>Figure 21 : Répartition des poissons dans les aquariums.....</i>	<i>76</i>

<i>Figure 22 : Les poissons au cours de l'application du stress thermique</i>	<i>77</i>
<i>Figure 23 : Mesure de la taille et pesée des poissons.....</i>	<i>80</i>
<i>Figure 24 : Prélèvement du cerveau chez les loups.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 25 : Prélèvement du foie chez les loups.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 26 : Prélèvement des gonades chez les loups.....</i>	<i>81</i>
<i>Figure 27 : Examen macroscopique : gonade femelle.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 28 : Examen macroscopique: gonade mâle.....</i>	<i>84</i>
<i>Figure 29 : Pesée des gonades</i>	<i>85</i>
<i>Figure 30: Gonades mâles vues au microscope optique (grossissement X50).</i>	<i>86</i>
<i>Figure 31 : Gonades femelles vues au microscope optique (grossissement X50).....</i>	<i>86</i>
<i>Figure 32 : Alignement des séquences d'ARNm de la vitellogénine chez 10 espèces de poissons.</i>	<i>93</i>
<i>Figure 33 : Résultats du séquençage de l'ADNc de la vitellogénine à partir des amorces dégénérées chez le loup</i>	<i>94</i>
<i>Figure 34 : Résultat d'électrophorèse des produits de PCR de ho-1 chez Dicentrarchus labrax suite à l'augmentation de la température.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 35 : Expression de ho-1 dans le foie chez Dicentrarchus labrax suite à un stress thermique.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 36 : Expression de ho-1, wap65 et hsp70 dans le foie chez Dicentrarchus labrax suite à l'augmentation de la température de l'eau.....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 37 : Expression de ho-1 dans la rate chez Dicentrarchus labrax suite à l'exposition au stress thermique.</i>	<i>103</i>
<i>Figure 38 : Expression de ho-1 dans les reins chez Dicentrarchus labrax suite à l'exposition au stress thermique.</i>	<i>104</i>
<i>Figure 39 : Expression de ho-1 dans les intestins chez Dicentrarchus labrax suite à l'exposition au stress thermique.....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 40 : Expression de ho-1 dans le cœur, le cerveau, le muscle, les branchies chez Dicentrarchus labrax suite à l'exposition au stress thermique.</i>	<i>107</i>
<i>Figure 41: Taille des loups après intoxication (96h) par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 42 : Poids des loups après intoxication (96h) par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).....</i>	<i>109</i>

<i>Figure 43 : Teneur en Cd dans le foie chez Dicentrarchus labrax après intoxication par deux concentrations différentes Cd (0,5 et 50 µg/l).</i>	113
<i>Figure 44 : Teneur en Pb dans le foie chez Dicentrarchus labrax après intoxication par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l).</i>	113
<i>Figure 45 : Corrélations entre les teneurs en : Cd et As ; Cd et Zn ; Pb et Zn dans le foie.</i>	115
<i>Figure 46: Variation du GSI chez Dicentrarchus labrax après contamination par différentes concentrations de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).</i>	117
<i>Figure 47 : Expression de l'arom b, fshβ, lhβ, gpα dans le cerveau chez Dicentrarchus labrax après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l).</i>	121
<i>Figure 48 : Expression de l'arom b, fshβ, lhβ, gpα dans le cerveau chez Dicentrarchus labrax après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l).</i>	122
<i>Figure 49 : Expression de l'arom a dans les gonades chez Dicentrarchus labrax après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l).</i>	124
<i>Figure 50 : Expression de l'arom a dans les gonades chez Dicentrarchus labrax après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l).</i>	124
<i>Figure 51 : Expression de mt dans le foie chez Dicentrarchus labrax après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l).</i>	127
<i>Figure 52 : Expression de mt dans le foie chez Dicentrarchus labrax après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l).</i>	127
<i>Figure 53: Variation de l'expression de ho-1 après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) dans le cerveau, les gonades et le foie.</i>	131
<i>Figure 54 : Variation de l'expression de ho-1 après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l) dans le cerveau, les gonades et le foie.</i>	132

TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau</i>	50
<i>Tableau 2 : Valeurs de NOEC disponibles pour les composés du cadmium reportées chez différentes espèces de poissons. D'après (INERIS 2011).</i>	56
<i>Tableau 3 : Valeurs de NOEC disponibles pour les composés du plomb reportées chez différentes espèces de poissons. D'après (INERIS 2011).</i>	61
<i>Tableau 4 : Classement des milieux de « non pollué » à « très pollué » selon leur concentrations en cadmium et en plomb</i>	78
<i>Tableau 5 : Tableau récapitulatif des concentrations choisies.</i>	79
<i>Tableau 6 : Liste des amorces utilisées dans les réactions de polymérisation en chaîne</i>	95
<i>Tableau 7 : Variations de la teneur en métaux dans le foie suite aux contaminations par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).</i>	114
<i>Tableau 8 : Tableau récapitulatif des ratios gène étudié/gène invariant de : l'arom b, fshβ, lhβ, gpα dans le cerveau, de l'arom a dans les gonades et de mt dans le foie chez Dicentrarchus labrax après contamination par différentes concentrations de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).</i>	128
<i>Tableau 9 : Tableau récapitulatif des ratios ho-1/rpl17 au niveau de l'axe HHGH chez Dicentrarchus labrax après intoxication au Cd (0,5 et 50 µg/l) et au Pb (1 et 100 µg/l).</i>	133

INTRODUCTION GENERALE

Le changement global que connaît notre planète aujourd'hui est sans équivoque. En effet, face à la multitude des changements climatiques et environnementaux, souvent d'origine anthropique, les scientifiques admettent qu'une sixième vague d'extinction est en cours. Ces changements affectent de façon pérenne les écosystèmes terrestres et marins et la biodiversité des populations. Souvent résumé aux changements climatiques et environnementaux, le changement global inclut pourtant également la surexploitation des ressources naturelles (Gillis 2011). Les écosystèmes marins constituent une cible majeure de ces changements globaux dont les effets peuvent aller de la perturbation de l'équilibre des écosystèmes à l'extinction de certaines espèces.

Aujourd'hui, une des priorités de l'écotoxicologie est de mieux comprendre la manière dont ces changements affectent les écosystèmes marins, afin de les prédire et d'en limiter les conséquences. La présente étude est directement liée à ces préoccupations. Nous nous sommes intéressés essentiellement à deux de ces changements environnementaux susceptibles de menacer les écosystèmes marins : le réchauffement climatique et la pollution des milieux marins spécifiquement par les perturbateurs endocriniens (PE), qui, mis à part leur toxicité directe sur les organismes marins, pourraient altérer leurs fonctions reproductives et expliquer, avec la surexploitation des ressources piscicoles, l'effondrement des stocks de pêche.

La présentation de ces travaux s'articule en quatre parties :

Une première partie est dédiée à la synthèse bibliographique. Elle porte sur les dangers qui menacent le milieu marin qu'ils soient dûs aux changements de la température, à la pollution ou encore à la surpêche. Dans cette partie nous présentons également l'axe hypothalamo-hypophysio-gonado hépatique (HHGH) chez les poissons ainsi que les perturbateurs endocriniens et les impacts qu'ils peuvent avoir sur les écosystèmes marins. Nous terminons cette partie par un descriptif du modèle animal « *Dicentrarchus labrax* » sur lequel nous avons choisi de travailler.

Une deuxième partie, consacrée à la présentation des différentes techniques de zootechnie, de biologie moléculaire, de biochimie et d'histologie mises en œuvre durant ce travail.

Une troisième partie qui regroupe la présentation et l'évaluation de l'ensemble des résultats concernant la réponse de *Dicentrarchus labrax* au stress thermique induit par l'exposition à une température égale à 30°C et l'impact des PE sur l'axe HHGH chez ce poisson.

Une dernière partie consacrée à une conclusion générale qui récapitulera les faits marquants de ce travail, aux limites de notre étude ainsi qu'aux perspectives qui ouvrent de nouvelles voies pour la recherche dans ce domaine.

I. La mer en danger

1. Le changement de températures

Le changement climatique constaté pendant ces dernières décennies serait, selon certains auteurs, principalement d'origine anthropique (Gillis 2011). La tendance linéaire au réchauffement a été estimée dans le bilan de 2007 des changements climatiques à $0,6^{\circ}\text{C}$ entre 1901 et 2000 et a augmenté à $0,74^{\circ}\text{C}$ pour la période entre 1906 et 2005 (Pachauri 2007) (Figure 1).

D'après le site de la NASA, de 1880 à 2012, l'anomalie de la température globale a atteint son maximum en 2010 avec une valeur de $0,66^{\circ}\text{C}$ (National Aeronautics and Space Administration (NASA)).

Face à ce réchauffement climatique et au déclin mondial des stocks de pêche, un grand intérêt a été accordé aux études visant à élucider les effets de l'augmentation de la température sur les réponses physiologiques et biochimiques chez les poissons d'une part (Enes *et al.* 2006; Pierre *et al.* 2010; Pierre *et al.* 2011) et les mécanismes intervenant dans la tolérance des organismes à l'élévation de la température d'autre part.

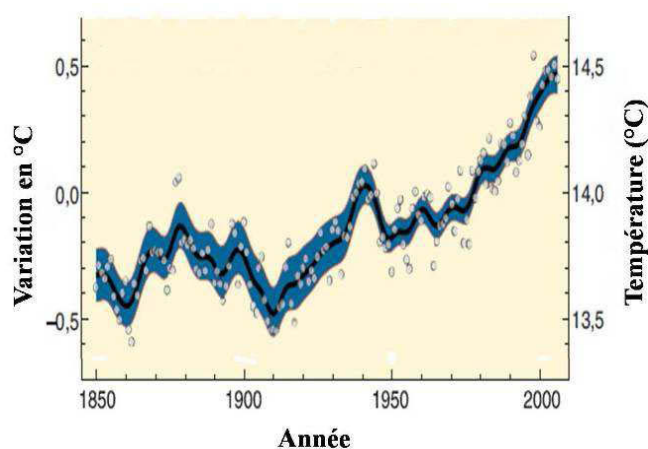


Figure 1 : Variation de la température moyenne à l'échelle du globe d'après Pachauri 2007.

La température représente un des facteurs environnementaux ayant le plus d'impacts sur la vie des organismes marins (Peck, Webb, et Bailey 2004). Son impact serait même plus important que celui de la salinité sur la croissance des poissons (Rombough 1996). Des études comparatives effectuées sur les organismes ectothermes marins, indiquent que les processus et les limites de la tolérance aux variations de la température sont liés aux ajustements des capacités aérobiques chez les organismes qui constituent une étape clef dans le processus de l'adaptation. Effectivement, à des températures élevées, une demande excessive en oxygène

se traduit par des taux insuffisants d'oxygène dans les fluides à l'intérieur des organismes (Pörtner 2002).

Parmi les effets observés, les chercheurs décrivent un changement dans le moment de la reproduction ainsi que des échecs de la reproduction, des perturbations de la croissance, des changements dans la mortalité au sein des espèces et aussi un changement de leur distribution géographique (Pörtner 2002).

La température joue également un rôle primordial dans la détermination du sexe ratio chez les espèces de poissons identifiées comme TSD (Temperature-dependent sex determination) ou également GSD+TE (Genetic sex determination with thermal effect) (Figure 2). L'effet de la température sur le sexe ratio pourrait suivre 3 modèles différents : 1, plus de mâles à haute température ; 2, plus de mâles à faible température et 3, plus de mâles avec les températures extrêmes (Ospina-Álvarez et Piferrer 2008).

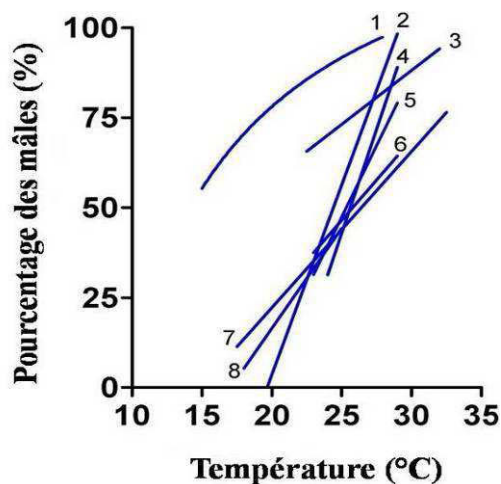


Figure 2 : Variation du sexe ratio avec la température chez différentes espèces de poissons.

1, *Menidia menidia* ; 2, *Odontesthes bonariensis* ; 3, *Hoplosternum littorale* ; 4, *Poeciliopsis lucida* ; 5, moyenne de 33 espèces *Apistogramma* ; 6, *Limia melanogaster* ; 7, *Menidia peninsulae* ; 8, *Odontesthes argentinensis*. D'après Ospina-Álvarez et Piferrer 2008.

Une température dépassant les seuils de tolérance chez les poissons peut perturber la croissance et la reproduction ainsi que le développement larvaire (l'efficacité et l'utilisation des protéines de réserve, l'alimentation, le métabolisme...) (Person-Le Ruyet, Mahé, *et al.* 2004; Ye *et al.* 2011) et constitue un véritable stress pour les organismes. En effet une augmentation de la température de 4 à 8°C par rapport à la température de croissance normale chez une espèce de poissons est capable d'induire la synthèse de protéines de stress (De Maio 1995). Classiquement nommées protéines de choc thermique (HSP), leur synthèse a été mise en évidence en réponse à un grand nombre de facteurs de stress autre que la température et non physiologiques comme les métaux lourds, les produits chimiques toxiques, les rayons UV, etc... (Rössner, Binková, et Šrám 2003). Ces protéines, parmi d'autres, sont synthétisées pour protéger les organismes des facteurs de stress environnementaux afin de maintenir

l'homéostasie et assurer la survie des cellules. Il a été pourtant rapporté un certain niveau basique de synthèse dans les conditions normales en dehors de toute situation de stress. Ce mécanisme, appelé communément adaptation au stress ou tolérance, est censé réduire la réponse de l'organisme à des expositions ultérieures au même stimulus. L'expression des gènes codant pour les HSP représentent un biomarqueur précoce de l'exposition à des facteurs de stress en écotoxicologie. Les HSP sont généralement classées selon leur masse moléculaire HSP25, HSP32, HSP60, HSP70, etc... (Rössner, Binková, et Šrám 2003; Wheeler et Wong 2007).

L'hème oxygénase-1 (HO-1), également appelée protéine de choc thermique (HSP32) est l'une des trois isoformes (en plus de HO-2 et HO-3) de l'hème oxygénase (HO) responsable de la dégradation de l'hème en biliverdine (un antioxydant cytoprotecteur), en monoxyde de carbone (un gaz de signalisation) et en fer. La biliverdine et ses dérivés préviennent les dommages oxydatifs au sein des cellules (Immenschuh et Ramadori 2000; Raju et Maines 2002; Wheeler et Wong 2007). Toutefois, des recherches plus approfondies ont montré que l'induction de HO-1 peut à la fois avoir une activité oxydante et pro-oxydante liée à la libération du fer (Ryter et Tyrrell 2000). Des propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires et anti-apoptotique sont également été attribuées à HO-1 (Correa, Amano, et Câmara 2012; Costa *et al.* 2009). En outre, HO-1 joue un rôle important dans la cytoprotection cellulaire (Wheeler et Wong 2007).

Contrairement aux isoformes HO-2 et HO-3 qui sont constitutivement exprimées dans les cellules dans les conditions normales, l'induction de HO-1 constitue une défense cellulaire adaptative contre les divers agents de stress (Rössner, Binková, et Šrám 2003), tels que le choc thermique, les rayonnements UV (Tyrrell et Reeve 2006), le peroxyde d'hydrogène (Min *et al.* 2008; Jian *et al.* 2011), l'arsénite de sodium (Kenyon *et al.* 2005), les métaux lourds, etc... Ces facteurs de stress sont connus pour induire HO-1.

2. La pollution marine

a) Les principales sources de pollution marine

D'après le Commissariat général au développement durable Service de l'observation et des statistiques 2011, 80% des pollutions marines proviennent de la terre par les flux de polluants rejetés à la mer par les fleuves et les cours d'eau, le drainage des territoires littoraux, les rejets directs dans la mer ou encore l'air. Ces rejets regroupent les rejets des stations d'épuration et les rejets industriels dont la liste continue de se prolonger avec le développement industriel. Pourtant, et malgré l'intérêt accordé à l'étude de ces composés, seulement moins de 5% des composés chimiques industriels disposent de données sur leur toxicité aquatique, leur bioaccumulation et de leur temps de demi-vie (Strempele *et al.* 2012).

Les rejets d'hydrocarbures et d'autres composés chimiques liés aux activités en mer contribuent à la hauteur d'environ 20% à la pollution marine. Il peut s'agir de rejets

volontaires liés au fonctionnement des navires ou accidentels. Outre leurs effets immédiats sur les oiseaux et les mammifères marins, comme on a pu l'observer lors de la marée noire en Louisiane en 2010 ayant laissé échapper 4,4 millions de barils de pétrole brut, ils peuvent avoir des conséquences écotoxicologiques très graves.

b) Les polluants

Il peut s'agir de polluants physiques (radiations), biologiques (virus, bactéries et parasites pathogènes) ou chimiques. Ces derniers peuvent être classés selon leur origine, leur nature ou encore leur impact sur l'environnement. Nous retenons la classification adoptée par [le commissariat général du développement durable dans le bilan de présence des micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux pour la période 2007-2009](#).

On distingue principalement :

- **Les hydrocarbures** : carburants, huiles lubrifiantes, peintures...
- **Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)** : ils sont le résultat de combustion, peuvent être d'origine anthropique (incinération des déchets) ou naturelle (feu de forêt, éruptions volcaniques...)
- **Les polychlorobiphényles (PCB)** : très répandus dans les installations électriques, les lubrifiants de pompes et les peintures. Ils ont été interdits depuis 1987, mais ils sont très persistants dans l'environnement.
- **Les polybromodiphényléthers (PBDE)** : regroupent 209 composés chimiques différents. Ils ont été largement utilisés dans la fabrication de plastique et textile, mais depuis qu'ils ont été reconnus comme perturbateurs endocriniens leur utilisation est réduite.
- **Les organométalliques** : sont des composés synthétiques, ex : le tributylétain TBT.
- **Les composés organiques halogénés volatils (COHV)** : principalement d'origine anthropique. Leur utilisation est répandue dans le dégraissage métallique et le nettoyage des textiles. Ex : le dichlorométhane, le trichloroéthylène...
- **Le benzène et ses dérivés** : il s'agit de composés organiques volatils (COV), ils sont utilisés dans la fabrication des caoutchoucs, colle, pesticides, essence automobile...
- **Les dioxines et furanes** : sont des polluants organiques persistants (POP) produits suite à l'incinération de déchets ou d'éruption volcanique.
- **Lefluor et les cyanures** : utilisés comme insecticides et raticides. Bien qu'ils puissent se trouver naturellement dans l'eau, leur origine reste essentiellement anthropique.

- **Les composés phénoliques** : largement utilisés dans la fabrication du plastique, de PVC, de peinture, de papier et de pâte à papier, etc... Ex : le bisphénol A, les nonylphénols reconnus comme PE.
- **Les phtalates** : sont utilisés dans la fabrication du plastique, les peintures, les cosmétiques. Sont aussi considérés comme des PE.
- **Les pesticides** : ex : atrazine, atrazine-déséthyl, chlordécone...
- **Les métaux lourds** : le caractère perturbateur endocrinien a été démontré pour plusieurs métaux lourds (voir paragraphe 4. Cas des métaux lourds en tant que PE).

On retrouve la même classification dans le « **Bilan de présence des micropolluants dans les eaux littorales** » ([Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement 2011](#)). Ce bilan est réalisé sur la base des données collectées dans le cadre des réseaux de surveillance de la contamination chimique opérés par l'**Ifremer** et des programmes de surveillance liés à la mise en oeuvre de la **Directive Cadre Eau (DCE)** par les différentes agences de l'eau. Ce rapport souligne l'importance de contamination dans un site par rapport au reste du littoral en donnant les concentrations des divers micropolluants en fonction des différentes zones géographiques. Il indique également les dépassements de normes de qualité environnementales utilisées dans le cadre de la Directive Cadre Eau ([Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement 2011](#)).

Les écosystèmes sont le plus souvent exposés à un mélange de plusieurs composés en même temps. Certains de ces polluants sont plus dangereux quand ils sont associés à d'autres même si leurs concentrations individuelles sont considérées non nocives. Cependant l'étude de mélange de plusieurs composés est souvent limitée pour des raisons pratiques et continue à être un défi pour les scientifiques ([EU 2012](#); [Sarigiannis et Hansen 2012](#)).

3. Etat des ressources piscicoles : surexploitation et pollution

L'exploitation des ressources naturelles de poissons et la pêche remontent à l'origine de l'homme. Les ressources marines côtières permettaient aux premières populations de survivre quand les conditions de vie étaient extrêmes. Mais depuis et avec l'industrialisation du domaine de la pêche durant les 150 dernières années, l'homme a largement impacté les écosystèmes marins avec son exploitation excessive des ressources, ne leur laissant pas souvent le temps de se restaurer ([Watson et Pauly 2013](#)). En effet, en 2009, 85% des stocks de poissons étaient surexploités ou entièrement exploités (Figure 3) ([United Nations 2013](#)). Il est d'une grande importance de préserver les populations de poissons, parce que non seulement elles offrent à l'homme une source de nourriture indispensable, mais aussi parce qu'elles

constituent une composante importante des écosystèmes dont elles assurent un fonctionnement équilibré.

Malgré le développement sans précédent que connaît actuellement le domaine de l'aquaculture, surtout en Chine, celui-ci ne compense pas le niveau de capture de poissons qui est resté stable depuis 1992 (à environ 90 millions T par an) (Figure 4) (United Nations 2013). En Europe, la plupart des espèces élevées sont carnivores, et il est nécessaire de pêcher des quantités non négligeables de poissons pour nourrir l'élevage, cela expliquerait en partie la non diminution de la capture de poissons sauvages.

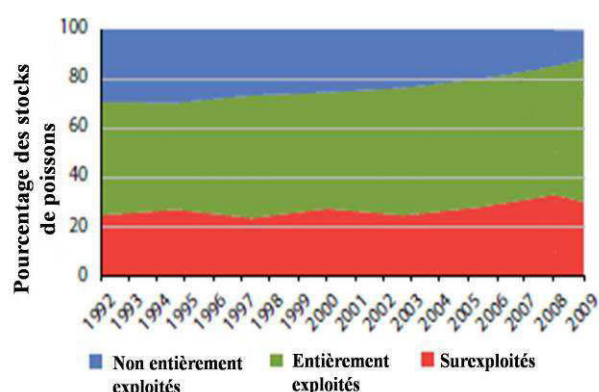


Figure 3 : Exploitation des stocks de poissons de 1992 à 2009. D'après United Nations 2013.

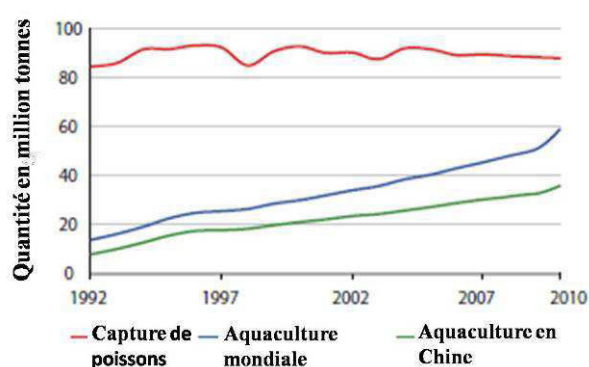


Figure 4 : Capture de poissons et production en aquaculture pendant la période 1992-2010. D'après United Nations 2013.

Cependant la surpêche avec son impact reconnu sur les écosystèmes marins, n'explique pas, à elle seule, l'effondrement des stocks. En effet, des troubles du développement et de la reproduction observés chez les espèces sauvages ont clairement été liés à l'exposition des écosystèmes marins aux perturbateurs endocriniens (WHO, World Health Organization 2002; Edwards, Moore, et Guillette 2006). Il semble donc judicieux d'étudier les interactions qui pourraient y avoir entre le système endocrinien principalement contrôlé par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique (HHGH) et ces composés.

II. L'axe Hypothalamo-Hypophyso-Gonado-Hépatique chez les poissons

Comme chez les mammifères, la reproduction chez les poissons est contrôlée par l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (HHG). Des signaux du cerveau contrôlent la sécrétion par l'hypothalamus de la GnRH (hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires).

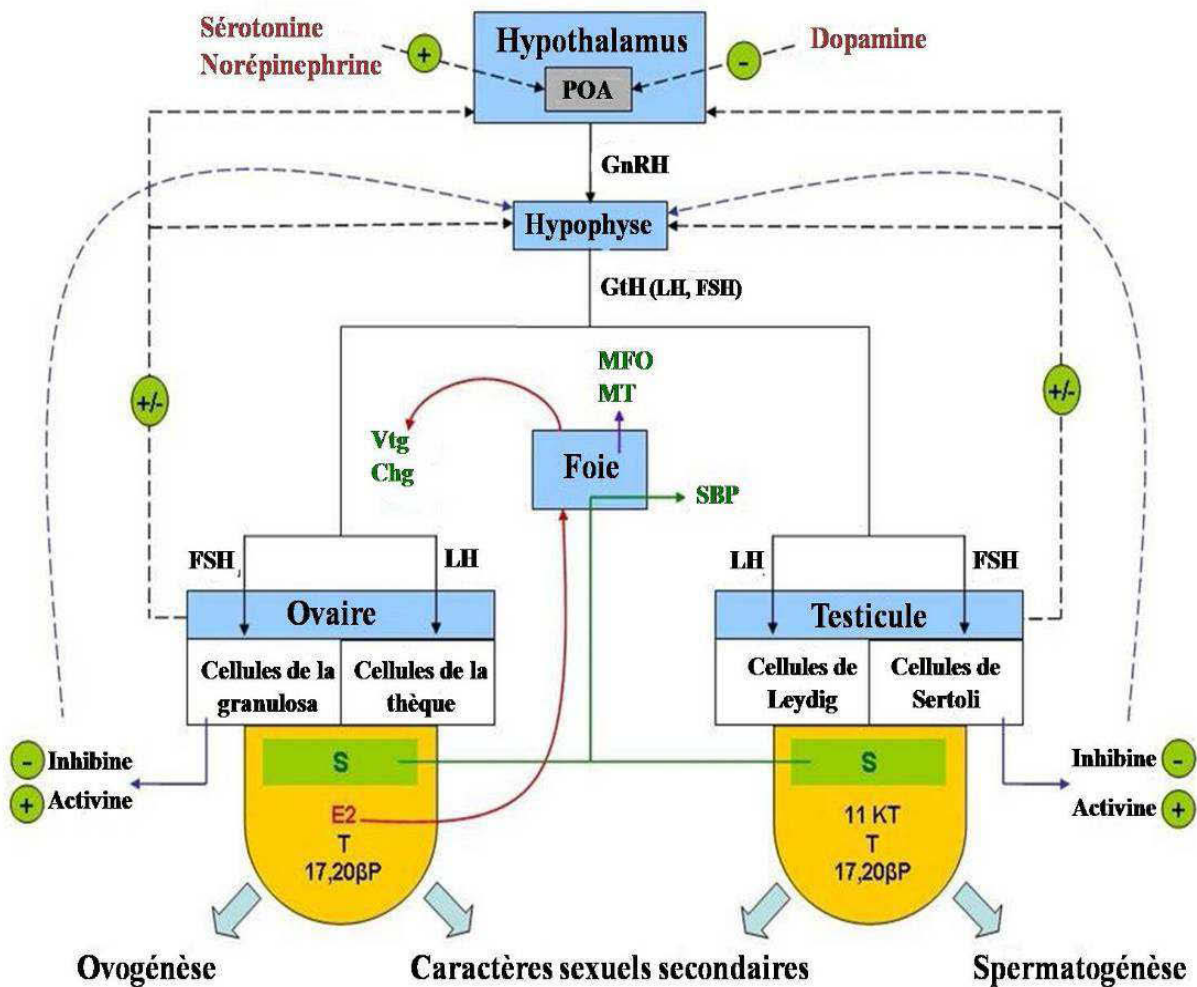


Figure 5: Présentation de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique chez les poissons mâles et femelles (Hachfi *et al.* 2012).

Abbreviations: Chg = Choriogénine, E₂ = 17β-oestradiol, FSH = hormone folliculo-stimulante, LH = hormone lutéinisante, MFO = Mixed Function Oxydase, MT = Métallothionéines, S = Stéroïdes, SBP = Steroid binding Proteins, T = Testostérone, VTG = Vitellogénine, 11KT = 11-Kétotestostérone, 17,20βP = 17αhydroxy,20βdihydroxy-Progestérone

Chez les perciformes, comme chez tous les vertébrés, il existe trois isoformes de GnRH (González-Martínez *et al.* 2001) :

- L'isoforme sbGnRH (GnRH de daurade) qui constitue la principale hormone hypothalamique et dont le gène est essentiellement exprimé dans les cellules de l'aire préoptique de l'hypothalamus.
- L'isoforme sGnRH (GnRH de saumon) dont le gène est majoritairement exprimé dans les bulbes olfactifs et qui a un effet direct sur les cellules gonadotropes pour la régulation de la sécrétion des GtH.
- L'isoforme cGnRH (GnRH de poulet) dont le gène est exprimé dans le tegmentum mésencéphalique. Elle assure diverses fonctions mais ne joue pas de rôle direct dans la régulation de l'axe hypophyso-gonadique.

La GnRH stimule l'adénohypophyse pour la libération des gonadotrophines : la LH (hormone lutéinisante) et la FSH (hormone folliculo-stimulante) appelées aussi chez les poissons GtH-I and GtH-II respectivement.

Chez les femelles, il existe au niveau des ovaires, sur les cellules de la granulosa des récepteurs spécifiques à la FSH (FSHR). Les récepteurs spécifiques à la LH (LHR) sont localisés au niveau des cellules de la thèque. La fixation de la LH sur ces récepteurs induit la production d'androgène et ultérieurement l'ovulation (Figure 5). Le rôle principal de cette hormone consiste à stimuler la maturation folliculaire et la conversion des androgènes en œstrogènes par aromatisation.

Chez les mâles, les FSHR sont localisés au niveau des testicules sur les cellules de Sertoli. La FSH stimulerait la prolifération des cellules de Sertoli par action paracrine ainsi que la spermatogénèse, mais son rôle exact n'est pas complètement élucidé. Les LHR se trouvent sur les cellules de Leydig. La formation du complexe LH-LHR stimule et régule la synthèse d'androgènes (Themmen et Huhtaniemi 2000).

Les gonadotrophines stimulent le développement des gonades et la production des hormones stéroïdiennes : le 17β -œstradiol (E2) chez les femelles, la testostérone (T) et principalement la 11-kétotestostérone (11KT) chez les mâles ainsi que les MIHs (maturation-inducing hormones) chez les deux sexes. Effectivement, le principal androgène chez les poissons mâles est la 11KT et la principale hormone œstrogénique chez les femelles est l'œstradiol. Ce dernier agit différemment par rapportaux mammifères. La différence réside essentiellement dans la stimulation du foie, son organe cible, pour produire une protéine précurseur du vitellus, la vitellogénine qui sera incorporée dans les ovocytes sous l'effet de la FSH (Nagahama et Yamashita 2008). Cette protéine sert de réserve de nutriments aux embryons et aux larves.

Les rôles précis de la FSH et la LH restent mal connus chez les poissons. Les FSHR sont présents sur les cellules de Sertoli (Petersen et Söder 2006), cependant, d'autres études ont démontré que des FSHR existent également sur les cellules de Leydig chez l'anguille du

Japon (*Anguilla japonica*, Temminck & Schlegel, 1846) et le poisson chat (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) (Ohta *et al.* 2007; García-López *et al.* 2009). Dans la littérature, le rôle des gonadotrophines a été le mieux élucidé chez les salmonidés. Chez cette famille, la FSH serait impliquée dans l'initiation de la gamétogénèse et les premiers stades de la vitellogenèse et la spermatogénèse via la production d'E2 et de 11KT, respectivement. La LH, elle, serait plutôt impliquée dans les étapes finales de la maturation des gamètes, dans la spermiation et l'ovulation et cela par la production des hormones induisant la maturation (MIHs), du 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P) et du 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (20 β S) (Nagahama 1994). Chez certains téléostéens, comme c'est le cas chez *Dicentrarchus labrax*, bien qu'ayant un mode de développement gonadique différent des salmonidés, ces deux hormones semblent également être impliquées dans les mêmes stades de développement que chez cette famille (Rocha *et al.* 2009).

En plus de leur rôle dans la maturation des gamètes, les hormones stéroïdiennes sont directement associées aux caractères sexuels secondaires et au comportement sexuel des poissons (Orlando et Guillette 2007; Munakata et Kobayashi 2010). Il existe deux types de régulation hormonale pour la synthèse des stéroïdes : **une régulation aigüe** qui dépend du transport du cholestérol à l'intérieur des mitochondries par la protéine StAR (protéine de régulation aigüe stéroïdogénique) dont l'expression du gène est régulée par la FSH et la LH (Manna et Stocco 2005) et **une régulation chronique** qui fait appel à la transcription des gènes codant pour des enzymes stéroïdiennes directement impliquées dans la synthèse des stéroïdes à long terme.

La synthèse des stéroïdes nécessite l'intervention de plusieurs enzymes oxydatives responsables de la conversion du cholestérol en stéroïdes (Sreenivasulu *et al.* 2009). Le cytochrome P450 aromatasé figure parmi les principaux complexes enzymatiques impliqués dans la conversion de T en E2.

Le taux des stéroïdes circulant est contrôlé par la biotransformation des stéroïdes par le foie grâce au cytochrome P450 (Kime 1999).

La gamétogénèse est contrôlée par une interaction entre le système systémique et le système intragonadique. Chacun de ces systèmes est plus ou moins sollicité selon le stade de la gamétogénèse. La maturation des gonades dure en général plusieurs mois chez les deux sexes jusqu'à la production de gamètes viables. La sécrétion de l'E2 et de la 11KT est ensuite arrêtée et laisse la place à la biosynthèse de la progestérone, le 17,20 β P chez la plupart des poissons, qui induit la maturation finale des ovocytes (reprise de la méiose arrêtée à la 1^{ère} prophase) (Nagahama et Yamashita 2008).

L'axe HHGH joue également un rôle primordial dans le maintien d'une reproduction normale et la synchronisation des cycles saisonniers de la reproduction (Okuzawa *et al.* 2003). En effet, comme chez la plupart des mammifères, la majorité des poissons présentent un mode de reproduction cyclique durant lequel les taux de GnRH, de GtHs et des hormones stéroïdiennes varient selon la phase du cycle reproductif (E. M. Santos, Rand-Weaver, et

Tyler 2001; Kirubakaran *et al.* 2005). Chez les mammifères, un pic plasmatique d'E2, et des taux bas de progestérone précèdent le pic préovulatoire de LH (Looper, Lents, et Wettemann 2003a; Looper *et al.* 2003b). Chez les poissons, des taux bas d'E2 et des taux élevés de 17,20βP précèdent la ponte (Joy, Senthilkumaran, et Sudhakumari 1998; Nagahama et Yamashita 2008).

En plus des facteurs hormonaux, d'autres signaux externes tels que la luminosité et la température de l'eau peuvent agir au niveau du cerveau pour contrôler le moment du développement des gonades et leur maturation (Sarkar et Upadhyay 2011). La moindre irrégularité dans les taux de la GnRH, de GtHs ou des stéroïdes sexuels à une étape particulière pourrait induire une altération des fonctions reproductives et la diminution de la fertilité ou même aboutir à la stérilité.

Le système monoaminergique intervient lui aussi dans la régulation de l'axe HHG. Ses neuromédiateurs comme la dopamine peuvent inhiber la libération de la LH chez certains poissons (Zohar *et al.* 2010), alors que d'autres neurotransmetteurs telles que la norépinephrine ou la sérotonine stimulent sa libération par voie directe mais aussi par voie indirecte via l'axe HHG (Senthilkumaran *et al.* 2001). D'autres facteurs comme le changement de saison peuvent également provoquer des variations dans les taux des monoamines hypothalamiques et hypophysaires (Okuzawa *et al.* 2003; Swapna et Senthilkumaran 2009).

Les stéroïdes sexuels peuvent exercer un rétrocontrôle négatif ou positif au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse pour moduler la synthèse de la GnRH et les GtHs (Zohar *et al.* 2010).

Le rétrocontrôle positif des stéroïdes a été mis en évidence par plusieurs études montrant que l'administration de stéroïdes à long terme aux poissons immatures augmente le contenu hypophysaire en LH et stimule sa libération. Elle induit également l'augmentation des taux des ARNm de *lhβ* et de *gpa* au niveau de l'hypophyse. Chez les mammifères, il a été rapporté que l'action positive des stéroïdes s'effectue directement au niveau hypophysaire en agissant sur les gènes codant pour les GtHs. Chez le rat, l'œstradiol interagit avec le complexe œstrogène-récepteur mais il a également été mis en évidence la présence d'un élément de réponse aux œstrogènes ERE sur le gène de *lhβ*. Chez les poissons, l'existence de EREs sur le gène *lhβ* chez les salmonidés (Xiong *et al.* 1994) et par la suite sur le gène *fshβ* chez le tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Melamed *et al.* 1998) a également été démontrée.

Le rétrocontrôle négatif a été mis en évidence par des études montrant que l'ablation des gonades était suivie d'une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et de FSH et que cette augmentation était corrigée par l'administration de testostérone ou d'œstradiol (Antonopoulou *et al.* 1999; M. A. Kobayashi *et al.* 2000). L'action des stéroïdes ne s'exercerait pas directement sur les cellules sécrétant les GtHs. En effet le rétrocontrôle négatif est considéré relativement long étant donné qu'il nécessite des heures alors que la fixation des stéroïdes à leurs récepteurs et l'induction de la transcription des gènes codant pour les GtHs ne demande que 20-30 min. De plus, aucun effet inhibiteur des stéroïdes sur

l'expression de ces gènes n'a pu être démontré au niveau de l'hypophyse. Le rétrocontrôle négatif serait plutôt lié à un effet direct sur la GnRH ou indirect (sur d'autres voies neurologiques influençant la synthèse de la GnRH comme l'inhibition de la dopamine) au niveau de l'hypothalamus (Mateos *et al.* 2002).

Les gonades exercent également un rétrocontrôle sur l'hypothalamus et l'hypophyse via des messagers autres que les stéroïdes telles que l'inhibine et l'activine sécrétées par les cellules de Sertoli (Kime 1999).

Le foie est également impliqué dans le rétrocontrôle des concentrations d'œstrogènes par la vitellogénine. Cela a été démontré chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), chez qui le traitement des femelles avec la vitellogénine réduit de manière réversible les niveaux d'oestradiol circulant (Reis-Henriques, Cruz, et Pereira 1997).

La multitude des hormones intervenant dans le contrôle de l'axe HHGH et la complexité des mécanismes de sa régulation font de cet axe une véritable cible pour les PE.

III. Les perturbateurs endocriniens

1. Définition et généralités

Les PE sont des substances d'origine chimique ou naturelle susceptibles d'interférer avec le fonctionnement normal du système endocrinien. Ces dernières décennies, l'augmentation de la fréquence de certains troubles hormonaux et de maladies comme les malformations génitales, l'infertilité, certains cancers hormono-dépendants chez l'homme ont directement été liés à une exposition à des PE. Il en est de même pour une multitude de changements et d'anomalies observés au niveau de la faune (féminisation de poissons, phénomène d'imposex chez les poissons et gastéropodes marins, malformations génitales chez les cervidés, l'hermaphrodisme chez certains amphibiens...) (Roche 2011).

Les écosystèmes marins sont la cible d'une large gamme de polluants provenant des effluents des eaux usées, des déchets industriels, de l'agrochimie, des pesticides, etc... Beaucoup de ces substances chimiques sont soupçonnées ou connues pour être capables d'interférer avec le système endocrinien des organismes aquatiques et peuvent induire une altération du métabolisme hormonal et des processus cellulaires régulés par les hormones (Porte *et al.* 2006; Scholz et Mayer 2008).

Les PE ont, au début, été définis comme étant « des agents exogènes qui interfèrent avec la production, la diffusion, le transport, le métabolisme, la fixation, l'action ou l'élimination des hormones naturelles dans le corps chargé de la maintenance de l'homéostasie et de la régulation du processus de développement » (Kavlock *et al.* 1996).

En 2002, l'OMS définit les PE comme « des substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle étrangères à l'organisme qui peuvent interférer avec le fonctionnement du système endocrinien et induire ainsi des effets délétères sur cet organisme ou sur ses descendants. » (OMS 2002).

La plupart des PE sont décrits comme des agents susceptibles de modifier le fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien et/ou gonadique induisant des troubles de la reproduction ou du développement (USEPA 1998).

Ils peuvent avoir de graves répercussions sur les populations de poissons, puisque les hormones contrôlent la plupart des processus physiologiques liés à la croissance et au développement, à la réponse au stress et à la reproduction.

En effet, les poissons peuvent être affectés par les médicaments et les hormones utilisés dans les traitements thérapeutiques chez l'homme. Certains produits pharmaceutiques sont conçus pour être très actifs sur le plan hormonal afin d'accomplir leur fonction thérapeutique. Des effets similaires à ceux recherchés chez l'homme peuvent survenir chez les poissons exposés aux effluents des industries pharmaceutiques et aux eaux usées pouvant

contenir des niveaux élevés d'œstrogènes humains (pouvant dépasser les 40 ng/L) (Routledge *et al.* 1998).

Ce type de xénobiotiques, est connu pour pouvoir affecter le développement des gamètes et leur viabilité soit par leur cytotoxicité directe soit par la modification de l'environnement hormonal qu'ils peuvent engendrer au cours du développement des gamètes. Ils peuvent également affecter la différenciation sexuelle des gonades, le moment de la maturation sexuelle, l'indice gonadosomatique ainsi que la morphologie de l'appareil reproducteur (Milnes *et al.* 2006).

Les poissons sont parmi les principaux organismes concernés par les PE (Kime 1999). Non seulement ils sont directement exposés à une très grande variété de PE, mais ils présentent aussi une labilité de la détermination sexuelle qui a été démontrée dans plusieurs études. Celle-ci peut être perturbée, voire inversée par l'exposition aux hormones exogènes à des stades critiques du développement (Francis 1992; Delvin et Nagahama 2002).

Même si l'affinité de la liaison entre la plupart des PE et les récepteurs d'œstrogènes et d'androgènes (ER/AR) est faible par rapport à l'affinité de ces récepteurs aux hormones stéroïdes endogènes, l'exposition, même à de faibles concentrations aux xénoœstrogènes et/ou xénoandrogènes est capable de perturber le déroulement normal des processus de développement et de reproduction. Ceci a déjà été observé suite à l'exposition de poissons à des PE continuellement détectés dans le milieu même à de faibles concentrations. Parmi ces PE, figure l'éthinylœstradiol (EE2) utilisé dans les pilules contraceptives. L'EE2 se trouve dans l'eau des stations de traitement à des concentrations de l'ordre du ng/L (4,5 ng/L) dans les effluents des stations de traitement des eaux en Suède recevant principalement les eaux usées domestiques). Ces concentrations ont provoqué chez des truites arc-en-ciel juvéniles placées dans des cages en aval de la station d'épuration une synthèse anormale de vitellogénine (Larsson *et al.* 1999).

En France, les niveaux de concentration de l'EE2 sont également de l'ordre du ng dans les eaux de surfaces. L'EE2 est retrouvé à des concentrations de l'ordre de quelques ng (2,7- 4,5) dans les effluents des stations d'épuration (Achères, Valentigney, Colombes, Every) (Besse et Garric, 2007).

En plus de leur capacité à se fixer aux ER et aux AR, les PE peuvent également agir par d'autres voies indépendantes du récepteur (Larkin, Knoebel, et Denslow 2003) comme l'altération de la synthèse des hormones ou de leur dégradation ou encore la liaison aux protéines plasmatiques (Guillette et Crain 2000; NRC 1999). En effet, il a été rapporté que certains PE provoquent des effets dépendants et espèces dépendants via des changements des concentrations de stéroïdes circulants, de la stéroïdogenèse ou du métabolisme hépatique des stéroïdes (Milnes *et al.* 2006).

Au cours des dernières années, des métaux lourds tels que le mercure, le cadmium, le plomb et le cuivre ont également été identifiés comme PE pouvant interférer avec la synthèse, le transport et/ou la dégradation des hormones endogènes (**voir paragraphe 4. Cas des métaux lourds en tant que PE**) (Sloman 2007).

La France s'est engagée, récemment, à élaborer une stratégie nationale sur les PE par laquelle elle contribuera activement dans l'élaboration de la stratégie de la commission européenne sur les PE. Dans ce cadre le ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie et le ministère des affaires sociales et de la santé ont effectué cette année (2013) un rapport qui rassemble les propositions en vue de l'adoption d'une stratégie nationale. Cette dernière permettra, non seulement, d'améliorer les connaissances sur les PE, mais aussi de fixer un calendrier ambitieux et d'assurer la prise en compte des PE dans les grands plans de santé publique et de protection de la biodiversité ([Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie et Ministère des affaires sociales et de la santé 2013](#)).

2. Classement des PE

On classe les PE en quatre catégories ([Scholz et Mayer 2008](#)):

a) Les composés œstrogéniques

Une large gamme de composés d'origine anthropique et de structures très variées a été reconnue pour avoir des effets œstrogéniques ([Jobling et al. 1995](#)). Ces composés, d'origine exogène, miment l'action des œstrogènes par leur liaison aux ER et par l'activation de l'expression de certains gènes en réponse à cette fixation. Les effets observés peuvent également être dus à l'élévation des taux d'œstrogènes plasmatiques libres résultant de la liaison compétitive des composés œstrogéniques aux protéines liant les stéroïdes sexuels (SBP) ([Tollefsen 2002](#)).

Parmi ces composés, on peut citer le 17 α -éthinyloestradiol, le 17 β -œstradiol, le bisphénol A, le 4-aminobenzoate, le benzophénone, le diéthylbestrol, le 4-nonylphénol....

D'autres composés comme l'atrazine, le benzo(a)pyrène, le butyl-benzyl-phthalate, le propylparabène sont classés comme des composés œstrogéniques potentiels car leur mécanisme d'action reste mal connu ([Scholz et Mayer 2008](#)).

En milieu marin, il s'agit de produits chimiques synthétiques mais il peut aussi s'agir de phytoœstrogènes provenant naturellement des plantes et des champignons.

b) Les composés anti-œstrogéniques

Ils regroupent des composés tels que l'Equol (4',7-isoflavandiol), la génistéine, le tamoxifène, etc... Ils ont une faible ou aucune activité œstrogénique mais ils sont capables de se fixer sur les ER et d'avoir une liaison compétitive avec les œstrogènes ([Scholz et Mayer 2008](#)). Autre que la fixation aux ER, certains composés utilisés en clinique (le fadrozole) et certains pesticides (comme le tributylétain) agissent en inhibant l'expression du gène et l'activité protéique de l'aromatase qui catalyse la dernière étape de la synthèse des œstrogènes. Il en résulte une diminution des taux plasmatiques du E2 et par la suite une réduction de la synthèse de la vitellogénine chez les femelles ([Scholz et Mayer 2008](#)). D'autres inhibiteurs de l'aromatase tel que le prochloraze (un fongicide) inhibent la synthèse des androgènes et se lient également aux récepteurs d'androgènes (AR).

Les inhibiteurs de l'aromatase peuvent également être classés avec les composés androgéniques du fait de l'effet masculinisant qu'ils peuvent induire (Kwon *et al.* 2000; Cheshenko *et al.* 2008).

c) Les composés androgéniques

Désignent les composés qui se lient directement sur les AR ou encore les composés qui peuvent provoquer une inhibition de la synthèse de l'œstradiol et une accumulation des androgènes endogènes. Dans cette classe on trouve donc les inhibiteurs de l'aromatase décrits dans le paragraphe précédent (Scholz et Mayer 2008).

Ils possèdent un effet masculinisant. Plusieurs pesticides comme le linuron (herbicide), le fénitrothion (insecticide), le vinclozoline et le prochloraze (des fongicides) ont été identifiés comme composés androgéniques (Makynen *et al.* 2000; Katsiadaki *et al.* 2006; Vinggaard *et al.* 2006).

d) Les composés anti-androgéniques

Ce sont les composés qui ne possèdent pas d'activité androgénique et qui inhibent les effets des androgènes en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques. La détection de l'effet anti-androgénique de ces composés a longtemps été impossible. En effet, il n'existait pas de marqueurs génétiques connus régulés par les androgènes jusqu'à la détection et le clonage chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) du gène codant pour la spiggin. La spiggin est une protéine sécrétée au niveau des reins sous le contrôle des androgènes. Elle sert depuis de marqueur d'androgénicité (Jolly *et al.* 2006; Jones *et al.* 2001; Nagae *et al.* 2007). Un composé est identifié comme anti-androgénique s'il inhibe l'induction de la spiggin stimulée par les androgènes. Il est également possible d'évaluer indirectement l'effet anti-androgénique des polluants par l'analyse de leurs effets sur l'expression génétique ou la synthèse protéique de la vitellogénine, la LH, la FSH, l'aromatase, les ER ou la testostérone...

Le nombre d'études menées dans ce contexte reste réduit mais des composés comme le pesticide vinclozoline et l'anticancéreux flutamide ont été testés et ont montré une activité anti-androgénique (Scholz et Mayer 2008).

Chez le vairon tête de boule (*Pimephales promelas*), le flutamide induit une induction de la VTG et des ER chez les mâles (Filby *et al.* 2007), ainsi qu'une altération de la fécondité (Jensen *et al.* 2004) et de la ponte (OECD, 2006). Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), des anomalies histologiques ont été observées au niveau des cellules interstitielles et des spermatogonies ainsi qu'une baisse du taux de fertilisation, du nombre d'œufs et du sexe ratio (OECD, 2006). Chez l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) on observe une réduction de la spiggin chez les femelles co-exposées à la méthyltestostérone (Jolly, 2007).

En ce qui concerne le vinclozoline, il altère la différenciation sexuelle et induit une augmentation des taux d'E2 (Makynen *et al.* 2000), de la LH et de la FSH (Villeneuve *et al.* 2007) chez le vairon tête de boule. Chez le medaka (*Oryzias latipes*), il provoque une

altération de la structure des gonades (Kiparisis *et al.* 2003). Chez l'épinoche, on observe une réduction de la spiggin chez les femelles co-exposées à la méthyltestostérone (Jolly, 2007).

3. L'impact des PE

La quasi-totalité des hormones pourrait être la cible de produits chimiques environnementaux : les hormones de la reproduction, les hormones thyroïdiennes, les corticostéroïdes, l'hormone de croissance, etc... Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent, l'axe HHGH intervient à différents niveaux pour contrôler le développement et la reproduction au sein des populations de poissons et joue par conséquent un rôle crucial dans la viabilité des espèces. Un grand nombre d'études s'est intéressé aux interférences que peuvent avoir les PE avec les hormones de la reproduction en particulier, très impliquées dans les stades critiques précoces de développement embryonnaire et de la différenciation sexuelle.

Dans ce contexte, plusieurs biomarqueurs ont été développés et utilisés comme outils de surveillance et d'évaluation de l'impact des PE sur les organismes marins. Plusieurs définitions sont proposées pour définir les biomarqueurs. Nous retenons celle de Peakall (1994) qui les définit comme « *les changements dans la réponse biologique qui peuvent être mesurés et qui sont liés à l'exposition ou l'effet toxique d'un ou de plusieurs produits chimiques d'origine environnementale* ».

Ils comprennent les mesures de paramètres au niveau du sang et des organes, les réponses physiologiques de l'organisme, ainsi que les changements dans la structure histologique des cellules. Les biomarqueurs sont classés en 3 catégories : les biomarqueurs d'exposition, les biomarqueurs d'effet et les biomarqueurs de sensibilité (Peakall 1999).

L'axe HHGH représente une cible majeure pour les PE. De ce fait, plusieurs études se sont focalisées sur les biomarqueurs le long de cet axe.

a) L'impact des PE sur le système endocrinien

i. Sur la synthèse hormonale

La gamétogenèse, les caractères sexuels secondaires ainsi que les cycles de reproduction sont contrôlés par les signaux émis par le système neuroendocrinien. Ce dernier transforme des signaux endogènes et exogènes en signaux hormonaux qui contrôlent les différentes voies de la reproduction. Un changement, même minime, dans les taux des stéroïdes circulants peut perturber le fonctionnement normal du système neuroendocrinien. Ces perturbations sont soit liées directement aux effets agonistes/antagonistes des PE, soit elles sont liées aux signaux de rétrocontrôle le long de l'axe HHGH (Milnes *et al.* 2006; Jalabert *et al.* 2000).

De nombreux contaminants pharmaceutiques, agricoles et industriels affectent la stéroïdogenèse. L'exposition à certains PE peut entraîner une diminution de la production

desandrogènes (démasculinisation) ou l'augmentation de la production d'œstrogènes (féminisation) chez les mâles. Une chute des taux d'androgènes plasmatiques et/ou une élévation des taux de l'E2 sont souvent caractéristiques d'une exposition à des anti-androgènes ou à des xénobiotiques œstrogéniques.

Dans ce qui suit, nous citons quelques effets qui ont été observés chez des poissons suite à des contaminations aux PE en milieu naturel ou expérimental :

- **Contamination environnementale :**

[Orlando et al. 1999](#) ont réalisé une étude chez l'achigan à grande bouche mâle (*Micropterus salmoides*, Lacépède, 1802) prélevé de la rivière Escambia en Floride (exposée à une centrale électrique au charbon et à une usine chimique). Les poissons mâles ont présenté des taux plasmatiques de testostérone bas en comparaison avec les mâles témoins prélevés d'un site non contaminé.

Des études ont été menées chez le poisson rouge (*Carassius auratus*, Linnaeus, 1758) exposé au sulfite blanchi utilisé dans la pâte à papier provenant des effluents d'usines au Canada. Il a été constaté une réduction de la taille des gonades ou une altération de la fécondité. Ces poissons ont montré au niveau des testicules une réduction de 90% de la synthèse de la testostérone et de la 11KT par rapport aux témoins ([Parrot et al. 1999](#)).

- **Contamination expérimentale :**

Dans une étude réalisée chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) par [Thibaut et Porte 2004](#), il a été démontré que plusieurs polluants interagissaient avec l'activité d'enzymes clés impliquées dans la synthèse et le métabolisme des stéroïdes sexuels. Le fénarimol, le triphénylétin (androgéniques) et le nonylphénol (œstrogénique) inhibent la glucuronidation de la testostérone et de l'œstradiol à des concentrations aussi faibles que 10, 50 et 100 nM, respectivement. Le triphénylétain, le tributylétain (androgénique) et le nonylphénol inhibent la sulfatation de l'œstradiol avec une CI50 de 17, 18 et 41 µM respectivement.

Une étude réalisée chez le tambour brésilien mâle (*Micropogonias undulatus*, Linnaeus, 1766) en période de développement gonadique, et qui consiste à exposer par voie alimentaire les poissons pendant 30 jours à un mélange de polychlorobiphényles (PCB), l'Arochlore 1254 (1 mg/kg), a montré une diminution des concentrations de la sérotonine au niveau de l'hypothalamus et une altération de la libération de la LH au niveau hypophysaire. Il a été démontré que l'Arochlore 1254 inhibe l'activité de la tryptophane hydroxylase (TPH) (enzyme clef dans la biosynthèse de la sérotonine) sans pour autant modifier celui de la monoamine oxydase (MAO) (hormone catabolique). L'altération de la croissance gonadique observée dans cette étude, serait ainsi liée à la perturbation de la synthèse de la sérotonine qui à son tour induit une altération de la voie de la sérotonine-GnRH qui contrôle la sécrétion de la LH ([Khan et Thomas 2000](#); [Khan et Thomas 2001](#)).

Chez le tambour brésilien mâle exposé à l'Aloclor 1254 en période de maturation testiculaire, Khan *et al.* 2001 ont également montré que le contenu de l'aire préoptique en GnRH était du même ordre que chez des poissons en période précoce de développement. Il en est de même pour le nombre de récepteurs de la GnRH au niveau de l'hypophyse et la sécrétion de LH. Les PCB semblent altérer le système GnRH-LH par la diminution de la synthèse de la GnRH et de ses récepteurs ainsi que les neurotransmetteurs comme la sérotonine.

Le traitement du cardeau (*Paralichthys dentatus*, Linnaeus, 1766) avec des composés œstrogéniques, l'*o,p'*-DDT (testé à 30, 60 et 120 mg/kg) et l'octylphénol (testé à 2, 20 et 200 mg/kg) pendant 4, 6 et 8 semaines a engendré une diminution de la testostérone plasmatique avec le *o,p'*-DDT à 60 mg/kg à 4 et 8 semaines de traitement et à 120 mg/kg avec toutes les durées de traitement. Une diminution de la concentration plasmatique de la testostérone a également été observée avec 200 mg/kg d'octylphénol uniquement à 4 semaines. Les poissons traités avec l'octylphénol ont aussi présenté une élévation de la concentration plasmatique de l'E2 à 4 semaines avec toutes les concentrations étudiées (Mills *et al.* 2001).

L. Zhang, Khan, et Foran 2002 ont testé chez medaka (*Oryzias latipes*, Temminck & Schlegel, 1846), différentes doses de génistéine, un phytoœstrogène 75, 750 et 30 000 ng/poisson par injection dans l'artère péritonéale. Il en a résulté une augmentation de la production de l'E2 par les ovaires chez les femelles avec 750 et 30 000 ng de génistéine et une diminution de la production de la testostérone par les testicules ainsi que la concentration plasmatique de la testostérone chez les mâles.

ii. Sur le foie

Le foie joue un rôle primordial dans la biotransformation des stéroïdes, des médicaments et des xénobiotiques chez tous les vertébrés et par conséquent dans la protection de l'organisme des agressions extérieures.

La biotransformation des stéroïdes par le foie est même utilisée pour évaluer l'impact de certains PE sur l'organisme. Les enzymes hépatiques sont connues pour avoir un large spectre de substrats et donc un grand nombre de xénobiotiques auxquels elles peuvent se fixer et assurer la détoxification (Milnes *et al.* 2006).

La biotransformation hépatique des stéroïdes est normalement régulée par les taux de stéroïdes sexuels endogènes, mais elle peut également être perturbée par les PE (Guillette et Gunderson 2001; Gunderson, LeBlanc, et Guillette 2001). Cela se traduit par des changements dans les taux plasmatiques normaux d'E2 et de testostérone provoquant à leur tour une altération du système reproductif chez les poissons.

Il est donc pertinent d'inclure le foie dans l'axe HHG et de tenir compte de ses fonctionnalités lors de l'analyse de l'axe HHGH et de l'évaluation de l'impact des PE (Figure 5).

❖ LE CYTOCHROME P450

Le cytochrome P450 est l'un des complexes enzymatiques les plus impliqués dans le métabolisme hépatique. Il constitue une superfamille qui regroupe 57 gènes codant pour des enzymes impliquées dans la biotransformation des xénobiotiques et les substances endogènes comme les stéroïdes (Figure 7). Il joue ainsi un rôle central dans la protection des organismes des agressions extérieures (Figure 6) et dans la détermination des concentrations plasmatiques finales des stéroïdes qui dépendent d'une part de leur niveau de synthèse et d'autre part de leur niveau de dégradation par le foie (Kime 1999).

Le cytochrome P450 catalyse l'oxydation des molécules hydrophobes et les transforme en métabolites hydrophiles (phase I). Ils seront ensuite conjugués (phase II) puis excrétés (phase III) (Aminard et Amiard-Triquet 2008).

Certains PE tels que le phénobarbital, le 3-méthylcolanthrine et le β -naphthoflavone sont connus pour faire intervenir le complexe cytochrome P450, mais les familles des enzymes impliquées sont différentes d'un modèle d'étude à un autre (Cyp1 ou Cyp2) (Milnes *et al.* 2006).

Le cytochrome P450 aromatase est le complexe enzymatique responsable de la synthèse des œstrogènes par l'aromatation des androgènes. Le cytochrome P450 aromatase est codé par le gène *cyp19*. La conversion des androgènes en œstrogènes est irréversible.

Il joue ainsi un rôle crucial dans la différenciation du sexe chez les poissons. Quand le niveau d'expression de *cyp19* est élevé, le sexe est orienté vers le sexe féminin, alors qu'il sera orienté vers le sexe masculin dans le cas contraire (Blázquez 2008). L'expression de *cyp19* a été démontrée au niveau du cerveau, des gonades et aussi dans le foie et d'autres tissus. Chez les poissons il existe deux isoformes de P450arom différentes sur le plan structurel et fonctionnel et communément appelés P450arom a (préférentiellement exprimé au niveau des gonades) et P450arom b (préférentiellement exprimé au niveau du cerveau) (Blázquez et Piferrer 2004).

Chez le loup, la P450arom b est détectée dès les stades larvaires, cependant son rôle dans la différenciation sexuelle n'est toujours pas clair. La forme gonadique augmente 100 jours après éclosion avant la différenciation sexuelle chez les femelles, alors que chez les mâles son taux reste au niveau initial (Piferrer 2005).

Plusieurs composés d'origine anthropiques, comme par exemple les hydrocarbures aromatiques polycycliques, induisent l'activité du cytochrome P450 chez les poissons dans les zones de déversement (Jewett *et al.* 2002; M. M. Santos *et al.* 2010; Della Torre *et al.* 2012).

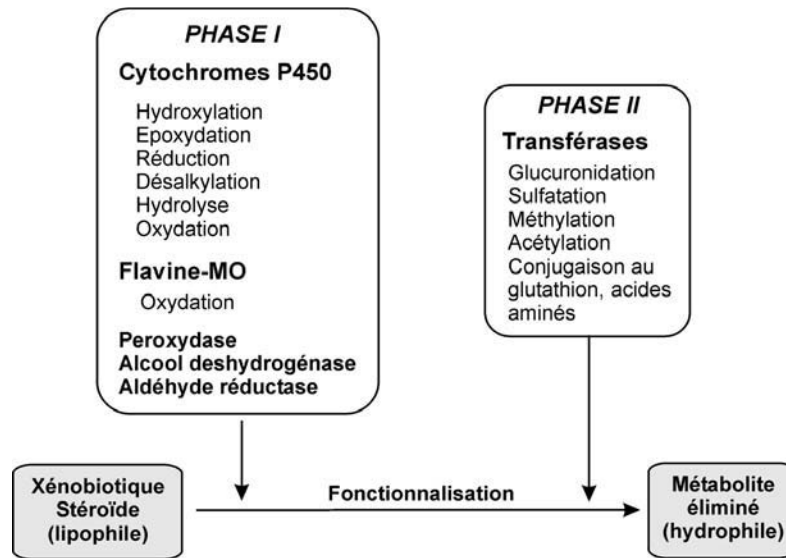


Figure 6 : Systèmes enzymatiques impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques et des stéroïdes (inserm 2011).

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogénèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogénèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinoïque
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7 α -hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

Figure 7 : Fonctions métaboliques du cytochrome P450 (Guéguen et al. 2006).

❖ LA VITELLOGENINE

La vitellogenèse représente un évènement très important dans la reproduction chez les vertébrés ovipares. Parmi les lipoprotéines du vitellus, la vitellogénine (Vtg) une lipoprotéine précurseur, est la plus importante voire la seule incorporée par les ovocytes. Il s'agit d'une lipoglycophosphoprotéine, synthétisée dans le foie de la femelle. Elle est ensuite véhiculée, par le sang, vers les ovaires, où elle est séquestrée par les ovocytes en voie de développement et clivée en composés peptidiques (la lipovitelline, la phosvitine et les phosvettes). Ces derniers constituent des réserves nutritives pour l'embryon et la jeune larve.

La Vtg est une protéine spécifique aux femelles en période d'ovogénèse chez les quelles elle est sécrétée à des taux élevés. Le gène *vtg* codant pour la Vtg est présent chez les juvéniles et les adultes mâles, mais n'est que marginalement exprimé (Matozzo *et al.* 2008).

La synthèse de la Vtg est un processus hormono-dépendant ; elle se fait sous le contrôle de l'E2 qui se lie aux ER au niveau du foie. Il n'est donc pas surprenant que les xénoœstrogènes soient capables d'interférer avec les processus œstrogène-dépendants (Soverchia 2005).

La synthèse de la vitellogénine est un des biomarqueurs les plus couramment utilisés pour la détection d'une exposition aux xénoœstrogènes *in vivo* et *in vitro* (Swanson, Dickey, et Campbell 2003).

Une induction très importante de la Vtg a été observée chez un grand nombre d'espadons (*Xiphias gladius*) en méditerranée. Les valeurs retrouvées étaient du même ordre ou encore plus élevées que celles retrouvées chez des femelles en stade de reproduction. Les résultats laissent supposer que l'espèce est exposée en méditerranée à des quantités importantes de xénoœstrogènes et représentent un risque potentiel pour la fonction reproductrice chez les poissons (Fossi *et al.* 2001; Fossi *et al.* 2002).

Outre les xénoœstrogènes, l'effet des PE androgéniques ou anti-œstrogéniques sur les niveaux de synthèse de la Vtg n'est pas suffisamment étudié (Zerulla *et al.* 2002).

La méthyltestostérone (un androgène) a été étudiée pour voir si une réponse de la Vtg peut également être instaurée après l'exposition à des composés autres que les œstrogènes (Panter *et al.* 2002). Pour cela des vairons à têtes de boules juvéniles ont été exposés à la méthyltestostérone, au fadrozole (un inhibiteur de l'aromatase), et à la combinaison des deux composés. Chez les poissons exposés à la méthyltestostérone seule, il y a eu synthèse *de novo* de l'ARNm de la Vtg et une féminisation partielle des poissons. Cependant les poissons exposés au fadrozole seul ou combiné à la méthyltestostérone ont présenté des caractères sexuels secondaires mâles (nageoire dorsale pigmentée, tubercules, défense agressive du territoire).

Ce résultat met en évidence que les composés androgéniques comme la méthyltestostérone peuvent aussi induire l'expression de *vtg* par la conversion de la méthyltestostérone en œstrogène (le méthylœstradiol) par une aromatase endogène.

❖ LES METALLOTHIONEINES

Le foie joue un rôle clef dans la détoxification de l'organisme des métaux lourds par la synthèse des métallothionéines. Ce sont des protéines à faible poids moléculaire (entre 6 et 10 kDa) et très riches en résidus cystéine (SH) leur conférant une haute affinité pour les ions métalliques divalents. [Vašák en 1991](#) avait établi une échelle d'affinité des métaux aux MT : $Hg^{2+} > Cu^+, Ag^+, Bi^{3+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Fe^{2+}$.

Les MT sont subdivisées essentiellement en 3 classes selon leurs caractéristiques structurales ([Amiard 2006](#)) :

- Classe I : comprend tous les polypeptides ayant leur positionnement de cystéine très proche de celui des mammifères. Certains mollusques et crustacés appartiennent à cette classe.
- Classe II : comprend les polypeptides qui n'ont pas cette similitude avec les MT des mammifères.
- Classe III : se compose des phytochélatines.

Les MT jouent un rôle primordial dans le contrôle de la biodisponibilité des métaux lourds essentiels en modulant la toxicité des métaux lourds non essentiels comme le plomb, le cadmium et le mercure et jouent donc un rôle important dans la régulation de la concentration intracellulaire des métaux ([Capdevila et al. 2012](#)). Les MT maintiennent l'équilibre du zinc, indispensable pour le développement des gamètes. Les métaux lourds régulent la synthèse des MT et peuvent ainsi provoquer de graves altérations au niveau de l'homéostasie du zinc (Figure 8) et par la suite de la gamétogenèse ([Kime 1999](#)).

L'induction des MT par les métaux est spécifique et est métal-dépendante. La présence d'éléments de régulation métallique (ERM) sur les séquences en amont des gènes codant pour les MT, témoigne de cette spécificité ([Thiele 1992](#)).

Chez les vertébrés et particulièrement chez les poissons, le processus de détoxification des métaux traces dépend essentiellement de la liaison du métal aux MT. Par conséquent, il est plus facile de démontrer la relation entre l'induction des MT et l'exposition aux métaux chez les poissons que chez les invertébrés. En effet, chez les poissons il y a peu, ou aucune, interférence avec le processus de biominéralisation qui est commun à la détoxification des métaux chez les invertébrés ([Mason et Jenkins 1995](#)).

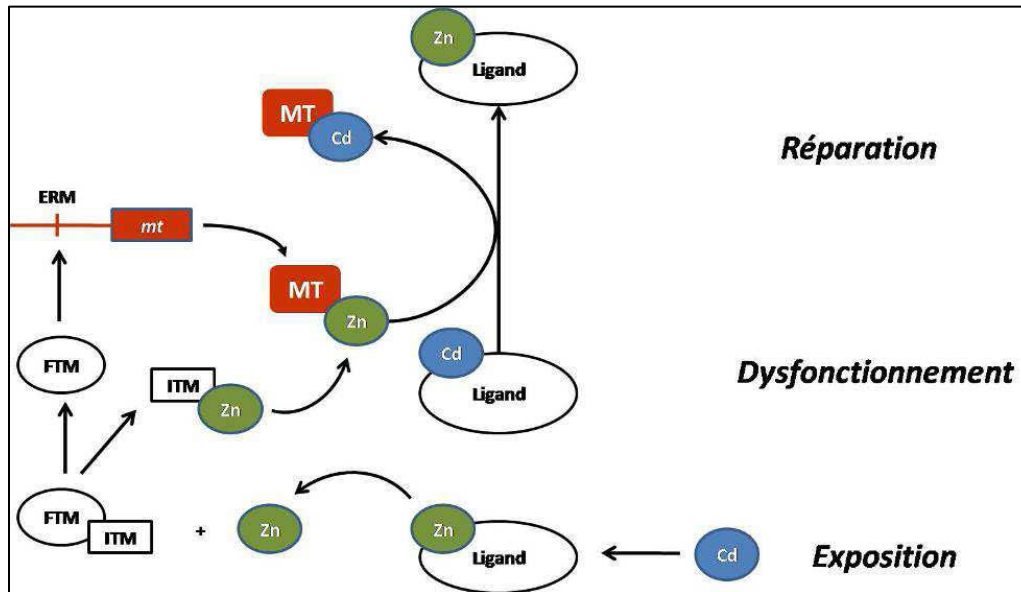


Figure 8 : Induction des métallothionéines et compétition métallique avec le zinc.
Exemple du Cd. MT : métallothionéine ; ERM : élément de régulation métallique ; FTM : facteur de transcription métallique ; ITM : inhibiteur de la transcription métallique. D'après (Roesijadi 1996).

Il est important de noter que d'autres facteurs de stress comme le changement de la température ou une grande densité d'élevage sont aussi capables d'augmenter l'expression des gènes codant pour les MT indiquant qu'il ne s'agit pas d'un marqueur spécifique et qu'ils peuvent représenter un bon outil pour évaluer en général les conditions de stress chez les poissons (Van Cleef-Toedt, Kaplan, et Crivello 2001; Rosalba *et al.* 2004).

Les MT présentent, tout de même, un grand intérêt en tant que biomarqueurs s'ils sont utilisés avec précaution dans le cadre d'un programme d'échantillonnage bien conçu (choix de l'organisme, de l'organe et de la méthode d'analyse). En effet, l'induction des MT est une réponse biochimique à la présence de taux élevés de métaux dans l'environnement, ce qui correspond à la définition même d'un biomarqueur (Amiard *et al.* 2006).

b) L'impact des PE sur le développement sexuel des poissons

Les PE interagissent avec le système endocrinien des organismes et peuvent perturber les différents stades du développement des gonades des poissons. Une modification du sexe ratio au sein d'une population exposée à un ou plusieurs PE peut ainsi être observée. Cela dépend non seulement de la nature et de la concentration du PE mais aussi du moment et de la durée de l'exposition. En effet, selon le stade de développement, l'impact du PE peut être plus ou moins grave. Tous les stades de développement semblent être concernés par les PE. Les poissons juvéniles en voie de développement sont généralement plus vulnérables que les poissons adultes (Bahamonde, Munkittrick, et Martyniuk 2013). Chez des populations de poissons exposées à des œstrogènes ou à des anti-androgènes, qu'il s'agisse d'embryons, de

poissons juvéniles en période de différenciation sexuelle ou de poissons matures, le sexe ratio est biaisé en faveur des femelles. L'exposition d'œufs ou de larves à des PE est à l'origine d'effets plus délétères que ceux observés chez des poissons exposés à des PE à des stades de développement plus avancés (Figure 9).

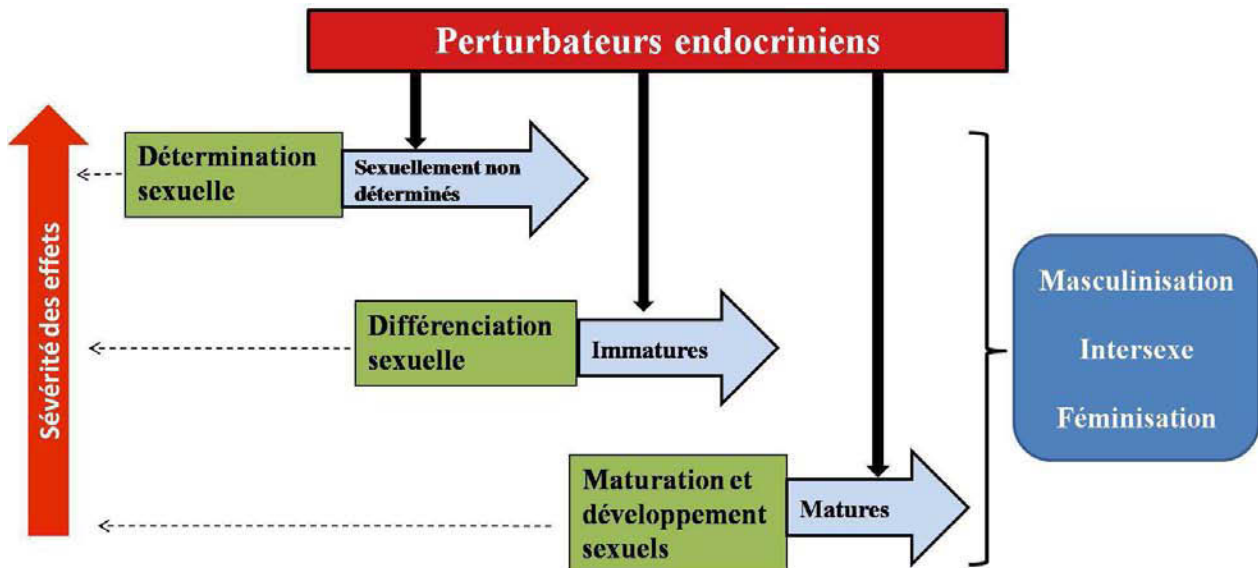


Figure 9 : Impacts des perturbateurs endocriniens chez les poissons à différents stades de développement.

i. La détermination et la différenciation sexuelles

La détermination sexuelle chez le poisson est définie par les processus génétiques (chromosomes sexuels ou systèmes polygéniques) et/ou environnementaux (stéroïdes exogènes, température, pollution...) qui établissent le sexe alors que la différenciation sexuelle est le processus par lequel des gonades indifférenciées se transforment en ovaires ou en testicules (Penman et Piferrer 2008).

Les variations génétiques sont rarement prises en compte dans les études qui portent sur l'exposition aux produits chimiques. Il est pourtant confirmé que l'exposition à de tels composés peut induire des réponses comme l'altération de la régulation de gènes ou encore des lésions de l'ADN (Rempel et Schlenk 2008). Il a également été démontré que les produits chimiques peuvent engendrer des mutations et des altérations de l'épissage dans les cellules germinales qui peuvent être liées au sexe (Anway *et al.* 2005; Swales et Spears 2005).

La période de différenciation sexuelle est très sensible aux PE du fait de la grande sensibilité de l'axe HHGH aux stéroïdes durant cette période. Une étude menée chez le poisson zèbre, où l'activité transcriptionnelle des ER a été mesurée grâce à l'utilisation du gène rapporteur luciférase, a montré que l'activité des ER était la plus importante pendant la

différenciation sexuelle ce qui expliquerait la raison pour laquelle la période de la différenciation sexuelle est particulièrement sensible aux perturbations causées par les composés œstrogéniques (Legler *et al.* 2000).

Il est possible d'induire artificiellement l'inversion du sexe chez les poissons par un traitement à l'œstradiol ou à la testostérone. Depuis la fin des années 1930, l'inversion sexuelle a largement été utilisée pour le contrôle du sexe dans les populations de poissons dans le domaine de l'aquaculture (Schreck 1974; Yamazaki 1983). La taille des femelles étant généralement plus importante que celle des mâles. Les œstrogènes et leurs analogues sont utilisés pour générer des femelles alors que la testostérone et les analogues des androgènes ainsi que les inhibiteurs de l'aromatase sont utilisés pour générer des poissons mâles (Kwon *et al.* 2000; T. Kobayashi, Kajiura-Kobayashi, et Nagahama 2003; Nagahama 2005; Raghuvier et Senthilkumaran 2009). En effet, comme on l'a précédemment signalé, l'aromatase cytochrome P450 convertit les androgènes en œstrogènes de manière irréversible et son rôle est crucial dans la différenciation sexuelle chez les poissons (Figure 10).

ii. La maturation sexuelle

Les mécanismes à l'origine de l'installation de la puberté et de la maturité sont sous le contrôle de l'axe HHG par le biais de la synthèse de la GnRH et la stimulation de la synthèse et la libération des GtHs (Zanuy *et al.* 2001). Il est donc normal que la maturation sexuelle soit affectée par les PE. Des changements du moment de la maturation sexuelle en accélérant ou en retardant cette dernière ont été observés. Ces changements peuvent affecter sérieusement le processus de la reproduction, en particulier si la maturation est complètement retardée. Dans ce contexte, Blázquez, Zanuy, *et al.* 1998 ont montré que les œstrogènes pouvaient provoquer un retard de la maturation sexuelle et la réduction de la production de sperme chez le loup bien que l'exposition aux œstrogènes ait eu lieu après la détermination du sexe et la différenciation des gonades.

L'exposition aux PE à tous les stades de développement cités ci-dessus peut ainsi être suivie par des altérations très sérieuses pouvant aller de l'intersexe à l'inversion sexuelle :

♦ L'INTERSEXE ou 'IMPOSEX' :

Il résulte de la perturbation de la différenciation sexuelle et se traduit par la présence simultanée au niveau d'une même gonade de tissu ovarien et de tissu testiculaire. L'intersexe a été observé chez le medaka suite à l'exposition à l'organochloré γ -HCH et le nonylphénol (Wester et Kim 1986; Gray et Metcalfe 1997) et chez le gardon exposé aux eaux usées contaminées par l'œstradiol (Routledge *et al.* 1998; Jobling *et al.* 1998). Chez le gardon intersexué, un certain nombre de malformations des conduits de l'appareil reproducteur associant des conduits femelles et des conduits spermatiques dans une même gonade ont été observés (Jobling *et al.* 2002b; Nolan *et al.* 2001; Rodgers-Gray *et al.* 2001).

D'autres polluants comme le 4-tert-pentylphénol, un pseudo-œstrogène, ont également été reconnus comme capables d'induire l'intersexe chez les populations de carpes (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) monosexes mâles pour des concentrations supérieures à 36 µg/l (Gimeno *et al.* 1998a; Gimeno *et al.* 1998b).

D'après Balch, Mackenzie, et Metcalfe 2004, des medaka traités au 17alpha-éthinyloestradiol et présentant un intersexe étaient capables de se reproduire normalement alors que Nash *et al.* 2004 ont montré que l'intersexe provoquait un échec de la reproduction chez les individus concernés.

Le nombre d'études utilisant l'intersexe comme indicateur d'une exposition aux PE ne cesse de croître. En revanche la prévalence non négligeable de l'intersexe chez les populations naturelles n'est souvent pas prise en compte dans les études toxicologiques. Cela constitue une véritable limite quant à l'utilisation de l'intersexe comme biomarqueur de l'exposition aux PE (Bahamonde, Munkittrick, et Martyniuk 2013).

Nous faisons la distinction entre l'apparition anormale d'intersexe suite à l'exposition à un PE et l'existence normale d'intersexe chez certaines espèces hermaphrodites de poissons.

◆ FEMINISATION :

L'exposition à l'E2 durant la différenciation sexuelle augmente la fréquence des femelles chez la lompe (*Cyclopterus lumpus*, Linnaeus, 1758) (Martinrobichaud *et al.* 1994), le pejerrey-flèche d'argent d'Argentine (*Odontesthes bonariensis*, Valenciennes, 1835) (Strussmann, Takashima, et Toda 1996), le poisson chat (*Silurus asotus*, Linnaeus, 1758) (Kim *et al.* 2001), la carpe (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) (Gimeno *et al.* 1998a; Gimeno *et al.* 1998b), le mené tête de mouton (*Cyprinodon variegatus*, Lacépède, 1803) (Zillioux *et al.* 2001). Le medaka japonais exposé à un stade précoce de développement (du stade d'œufs fertilisés à 60 jours après l'éclosion) au bisphénol A (355, et 1 820 µg/l) (Yokota *et al.* 2000) a également présenté un sexe ratio en faveur des femelles. Des effets similaires ont été rapportés chez les guppys juvéniles suite à une exposition à des composés anti-androgéniques (Bayley, Junge, et Baatrup 2002).

On a aussi observé une féminisation chez la truite arc-en-ciel mâle (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) exposé aux eaux usées (Harries *et al.* 1999; Jobling et Sumpter 1993; Purdom *et al.* 1994).

Les métaux lourds ont été décrits comme des PE pouvant altérer le sexe ratio au sein des populations de poissons. Dans ce contexte, des cas de féminisation ont été observés sous l'effet du méthylmercure (Matta *et al.* 2001).

◆ MASCULINISATION :

Les effluents des usines de pâtes à papier ont été reconnus pour avoir un effet masculinisant chez des gambusies (*Gambusia affinis*) femelles de l'Amérique du Nord et de

la nouvelle Zélande (Howell, Black, et Bortone 1980; Parks *et al.* 2001; Ellis *et al.* 2001). L'effet masculinisant des PE est soit direct, lié à une activité agoniste aux récepteurs androgéniques (Parks *et al.* 2001) soit indirect, lié à un effet inhibiteur du gène *cyp19a* étant donné que le complexe enzymatique Cyp 450 assure la conversion des androgènes en œstrogènes et que son inhibition engendre une accumulation des androgènes endogènes (Figure 10) (Navarro-Martín, Blázquez, et Piferrer 2009).

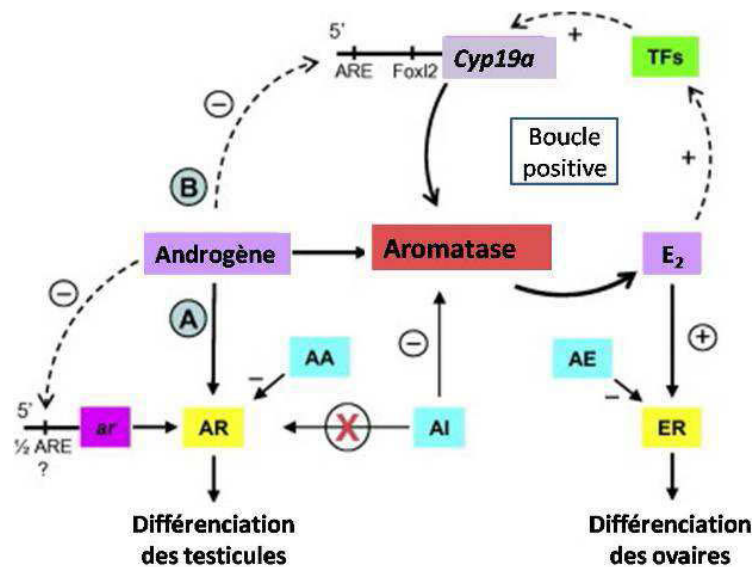


Figure 10 : Rôle de l'aromatase dans la différenciation sexuelle.

La voie A montre une masculinisation due à un effet androgénique direct. La voie B montre une masculinisation par inhibition du *cyp19a*. Abréviations : ar/AR : gène des récepteurs d'androgènes/ récepteurs d'androgènes, AI : inhibiteurs d'aromatase, ER : récepteurs d'œstrogène, AA : anti-androgène, AE : anti-œstrogène, ARE : élément de réponse aux androgènes. D'après Navarro-Martín, Blázquez, et Piferrer 2009.

c) L'impact des PE sur la production de gamètes et la fertilité

La mesure de l'indice gonado-somatique(GSI) (poids des gonades divisé par le poids total) constitue un moyen simple pour évaluer un dysfonctionnement des gonades. Une chute du GSI est indicatrice d'une diminution de l'activité hypothalamique, hypophysaire et gonadique. Le GSI est typiquement diminué après une exposition aux composés œstrogéniques ou anti-androgéniques, ce qui est souvent lié à une inhibition du développement des gonades. Une telle inhibition a été démontrée chez le vairon tête de boule (*Pimephales promelas*, Rafinesque, 1820) traité à l'EE2 (Palace *et al.* 2002) et au bisphénol A (Sohoni *et al.* 2001), et aussi chez le loup (*Dicentrarchus labrax*, Linneaus 1758) exposé aux œstrogènes au cours de la différenciation gonadique (Blázquez, Bosma, *et al.* 1998). Van den Belt *et al.* 2002 ont également observé chez le poisson zèbre traité par 10 ng/l d'EE2 une

réduction du GSI survenue après 24 jours de traitement chez les mâles et seulement 6 jours chez les femelles.

Un examen histologique des gonades peut montrer un blocage dans le développement et la maturation des spermatogonies ou des ovocytes (Kime 1999; Ansari et Ansari 2011). Il est donc intéressant de compléter la mesure du GSI par un examen histologique des gonades afin d'identifier les stades de maturation des cellules germinales concernés par l'altération due au PE et pour mieux comprendre le mécanisme d'action des polluants.

Chez le vairon tête de boule (*Pimephales promelas*) mature, exposé pendant 42 jours à deux concentrations différentes de 4-nonylphénol (1,1 ou 3,4 µg/l), on a pu observer chez les mâles des lésions traduisant une altération des cellules de Sertoli et des cellules germinales en nombre et en taille. Les mêmes concentrations de 4-nonylphénol n'ont pas provoqué d'effets notables chez les femelles (Miles-Richardson *et al.* 1999b).

En revanche des femelles traitées par 1000 ; 100 ; 10 ; 2 ; 1 ; 0,5 ; 0,25 ; 0,125 ; 0,1 ou 0,0625 nM d'E2 pendant 14 jours ont présenté à l'intérieur des ovaires, une présence plus importante des follicules immatures (avec 10 ; 2 et 0,1 nM d'E2). On décrit un blocage des follicules au premier stage de développement et une chute du nombre des follicules secondaires (avec 2 et 0,0625 nM d'E2) et de De Graaf (avec 10 ; 2 et 0,1 nM d'E2).

Chez les mâles, on a noté des altérations morphologiques des tubes séminifères, une hypertrophie des cellules de Sertoli ainsi qu'une perte des cellules germinales avec les concentrations 1000 ; 100 ; 10 ; 2 ; 1 et 0,5 nM d'E2 (les lésions étaient significativement plus importantes avec 1000 ; 100 ; 1 et 0,5 nM d'E2). Ces lésions étaient réversibles chez les mâles après l'arrêt de l'exposition à l'E2 (Miles-Richardson *et al.* 1999a).

Chez le xypho porte épée (*Xiphophorus helleri*, Heckel, 1848) traité avec le nonylphénol, le bisphénol A et leur mélange, une augmentation du nombre des cellules apoptotiques ainsi qu'une nécrose des tissus interstitiels à l'intérieur des testicules et des tubules séminifères ont été rapportés (Kwak *et al.* 2001).

L'altération de la spermatogenèse peut se traduire par un changement dans les proportions des cellules sexuelles dans les testicules, un blocage de la spermatogénèse à un stade précoce, une altération de la qualité du sperme ainsi qu'une diminution du nombre des cellules germinales (Milnes *et al.* 2006).

La qualité du sperme est la mesure de la capacité de ce dernier de fertiliser un ovule avec succès. Tout paramètre directement corrélé à la capacité de fertilisation du sperme peut potentiellement être utilisé en tant que mesure de la qualité du sperme. Certains PE peuvent provoquer chez des poissons mâles une détérioration de la qualité du sperme. Malgré le nombre réduit des études montrant la liaison entre la survenue de l'intersexe et ce paramètre (Marchand, Pieterse, et Barnhoorn 2010), il a été rapporté que chez les poissons présentant un stade sévère d'intersexe, la quantité et la densité du sperme produit étaient moins importantes et les spermatozoïdes montraient une mobilité réduite en comparaison avec les poissons mâles non contaminés (Jobling *et al.* 2002b).

L'altération de la spermatogénèse et du sperme a été observée chez plusieurs espèces :

- Le medaka adulte exposé au 4-tert-octylphenol (de 20 à 230 ppb pendant 21 jours) (Gronen *et al.* 1999).
- Le poisson rouge traité pendant 10 semaines à 50 ng d'E2/l (Schoenfuss *et al.* 2002).
- Le flet commun (*Platichthys flesus*, Linnaeus, 1758) provenant de rivières exposées aux effluents d'eaux usées et chez qui on a observé une forte perturbation de la spermatogénèse et une absence d'émission de laitance qui pourrait être due à une occlusion ou un dysfonctionnement des canaux spermatiques (Lye *et al.* 1997; Lye, Frid, et Gill 1998).
- Les gambusies mâles (*Gambusia affinis*, Baird et Girard, 1853) prélevés d'un lac en Floride (contaminé par plusieurs produits chimiques parmi lesquels certains sont reconnus comme PE) et présentant moins de spermatozoïdes par rapport aux poissons provenant de lacs avoisinants moins contaminés (Toft *et al.* 2003).
- Les vairons tête de boule exposés à 16 µg/l de bisphénol A. Des changements dans les proportions des cellules germinales dans les gonades ont été observés, témoignant une inhibition de la spermatogénèse (Sohoni *et al.* 2001).
- Des guppies (*Poecilia reticulata*, Peters, 1859) adultes et juvéniles exposés pendant 30 jours aux anti-androgéniques, le fongicide vinclozoline et le p,p0-DDE (principal métabolite du DDT) à des concentrations entre 0,1 et 100 µg/l, avec une réduction significative du nombre de cellules germinales dans le sperme (Baatrup et Junge 2001; Bayley, Junge, et Baatrup 2002).

Dans une étude portant sur l'effet d'une exposition à l'EE2 sur la physiologie reproductive chez le poisson zèbre, Van den Belt *et al.* 2002 ont rapporté que la réduction du GSI et les changements gonadiques observés chez les mâles et les femelles étaient réversibles une fois que le poisson placé dans un milieu non contaminé. Mais ce n'est pas toujours le cas pour un grand nombre de PE qui engendreraient des altérations irréversibles.

d) L'impact des PE sur l'expression génique

Les études sur les effets des PE sur l'organisme se sont longtemps limitées aux mécanismes faisant appel aux récepteurs hormonaux, essentiellement les récepteurs des hormones stéroïdes. Plus récemment, les études ont accordé de plus en plus d'intérêt aux autres mécanismes pouvant être impliqués dans l'interaction entre les PE et le système endocrinien. Parmi ces mécanismes figure l'impact des PE sur la stéroïdogenèse qui peut se traduire par une altération des concentrations des hormones produites par l'organisme ou

encore une altération de l'expression des gènes codant pour les hormones impliquées dans la stéroïdogénèse.

Les PE peuvent altérer l'expression normale des gènes par voie directe (voie des récepteurs d'hormones stéroïdes) mais aussi par voie indirecte à travers des mécanismes compensatoires (de rétrocontrôle) du fait du caractère complexe du système endocrinien. D'où l'intérêt des études qui tiennent en compte simultanément de la réponse de plusieurs gènes dans différents tissus. (X. Zhang *et al.* 2008).

Le gène *vtg* codant pour la vitellogénine représente une cible pour les PE. La synthèse de cette protéine par le foie est hormono-dépendante et se fait par le biais de l'interaction entre l'œstradiol et les ER.

Chez les mâles, l'activation des gènes sensibles aux œstrogènes est induite par de nombreux PE qui peuvent interférer avec la libération des gonadotrophines, la stéroïdogénèse et la liaison aux ER (Safe 2000; Murphy, Rose, et Thomas 2005). Normalement, la Vtg n'est sécrétée à des taux élevés que chez les femelles en période d'ovogénèse. Le gène *vtg* est présent, mais marginalement exprimé chez les mâles ou les juvéniles (Tyler *et al.* 1999). Toute fois, l'expression de *vtg* peut être induite chez les mâles suite à l'exposition à l'E2 ou les agonistes des œstrogènes. Chez les mâles et les juvéniles, des changements anormaux dans la synthèse de la Vtg gène représentent un bioindicateur d'une contamination œstrogénique (Sole' *et al.* 2003; Scott *et al.* 2006).

Autre que l'altération de l'expression de *vtg* et de la liaison aux ER, les composés œstrogéniques induisent des modifications dans l'expression d'une large gamme de gènes le long de l'axe HHGH, certains par effet direct par liaison aux ER et d'autres gènes par voies alternatives compensatoires (faisant intervenir les systèmes de rétrocontrôle négatif et positif). La cascade de gènes concernés est spécifique d'un tissu.

Tout au long de l'axe HHGH, de très nombreux gènes, comme le gène codant pour les récepteurs de la GnRH au niveau du cerveau ou le gène *arom a* au niveau des gonades, peuvent être affectés par les PE. Un même xénobiotique pourrait induire la sur-expression de certains gènes et la sous-expression d'autres.

X. Zhang *et al.* 2008 avaient établi chez des medaka japonais mâles, traités pendant 7 jours par trois concentrations différentes d'EE2 (5, 50 et 500 ng/l) un profil de réponses concentration-dépendantes des gènes le long de l'axe HHGH. La carte réalisée apporte des renseignements intéressants quant aux gènes sollicités à chaque niveau de l'axe HHGH et leurs degrés de réponse à l'EE2 (Figure 11).

Depuis quelques années, des études plus approfondies utilisant le séquençage d'ARN ont apporté beaucoup d'informations quant à l'expression de gènes en réponse au stress lié aux pollutions marines. Parmi ces études, celle de Garcia *et al.* 2012 réalisée chez le killi du golf (*Fundulus grandis*, Baird & Girard, 1853) de la côte nord du golfe du Mexique touchée

par le mélange complexe de polluants résultant de l'explosion de la plateforme pétrolière Deepwater Horizon. Les gènes étudiés étaient répartis en 5 groupes, des gènes impliqués dans mécanismes du CYP/AHR, d'autres dans la réponse à l'hypoxie, la réponse immunitaire, les gènes des protéines ribosomiques et les gènes de la choriogénine. Les résultats montrent des changements importants dans les niveaux d'expression des gènes et une réponse très complexe face à cette exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques ; 1070 gènes ont été sous-exprimés et 1251 ont été sur-exprimés suite à l'exposition.

Grâce aux avancées technologiques apportées par le développement du criblage automatisé, la chemogénomique, une discipline dont le but est d'étudier la réponse du génome à un composé chimique, est aujourd'hui en pleine émergence. Le criblage permet d'identifier parmi plusieurs molécules des composés bioactifs agissant sur une protéine, une cellule ou un organisme entier. [Lam et al. 2008](#) ont pu démontrer que la chemogénomique chez le poisson zèbre (sur organisme entier adulte), exposé aux hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés et à des composés œstrogéniques était pratique et efficace pour la prévention et la recherche en biologie et en chimie à grande échelle. Ils ont pu générer des modèles de prévision et identifier des gènes biomarqueurs dans de nombreux tissus cibles.

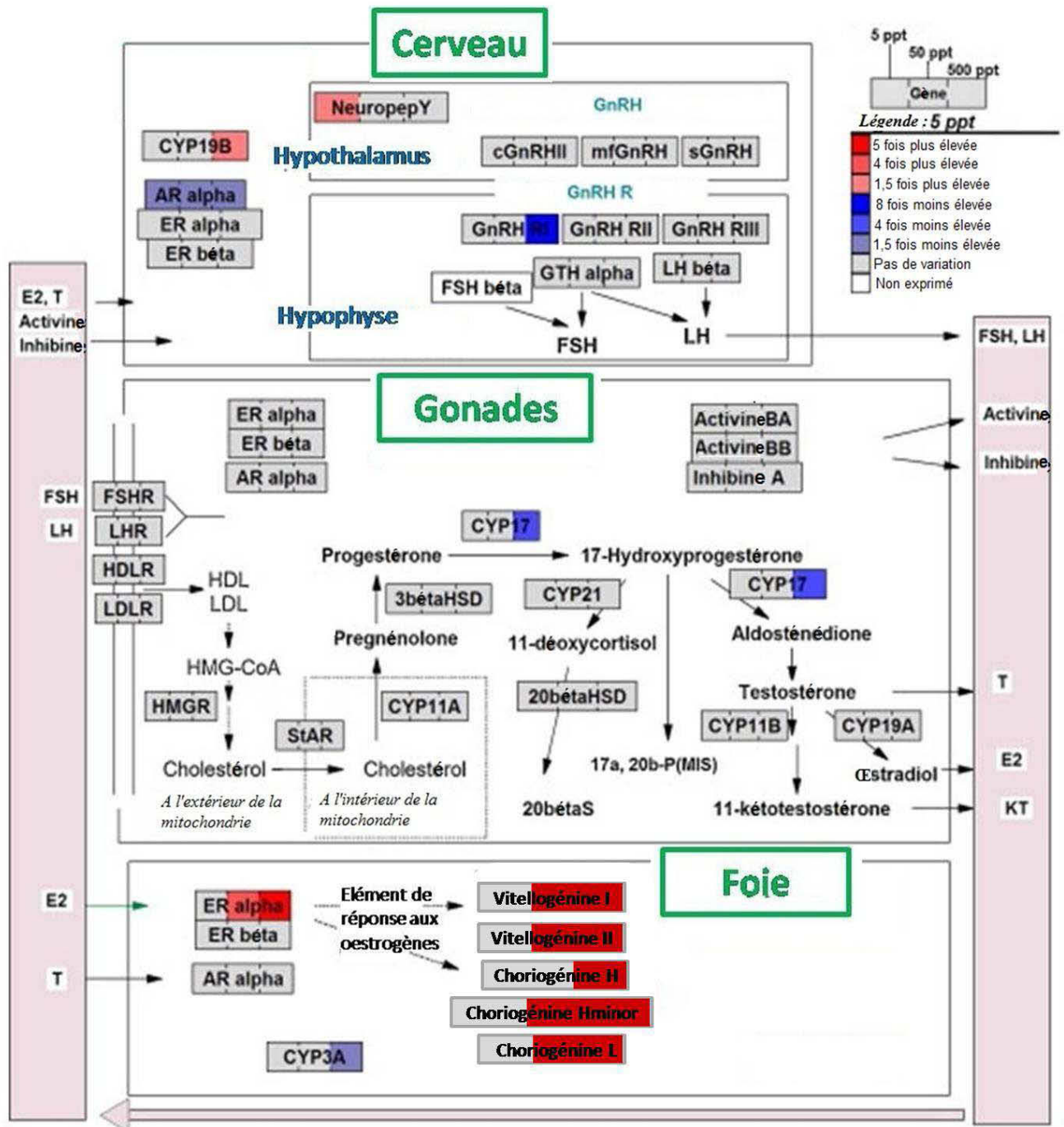


Figure 11 : Réponses concentration-dépendantes des gènes de l'axe HHGH chez le medaka (*Oryziaslatipes*, Temminck & Schlegel, 1846) suite à une exposition à l'EE2.

Les données sur l'expression des gènes sont obtenues chez medaka traité par 5, 50 et 500 ng d'EE2/l. La légende en haut et à droite du graphique décrit l'ordre des concentrations de l'EE2 et les 8 couleurs différentes représentent le degré de sur-expression ou de sous-expression des gènes. D'après X. Zhang *et al.* 2008.

4. Cas des métaux lourds en tant que PE

Ce sont des éléments-traces métalliques dont la densité est supérieure à 4 comme le plomb, le cadmium, le mercure, le zinc, le cuivre, le nickel... Certains métaux lourds comme le zinc, le cuivre ou le fer sont dits essentiels ; leur présence dans l'organisme, à des taux bien déterminés, est indispensable pour le bon déroulement de certains processus biologiques, d'autres sont dits non essentiels comme le plomb et le cadmium et n'ont aucun rôle connu dans les systèmes biologiques. Comme c'est le cas pour le plomb, certains métaux lourds peuvent être très toxiques même à de très faibles doses et leur toxicité est souvent liée à leur bioaccumulation dans les tissus.

La pollution des écosystèmes marins par les métaux lourds est un processus dynamique. Ils parviennent principalement en mer par l'air, les flux provenant de la terre et les rejets industriels. En France, très peu de sites disposent de données sur les flux et les rejets des métaux lourds. D'après le [Commissariat général au développement durable Service de l'observation et des statistiques 2011](#), la Côte d'Azur totalise, elle seule, 43,8% du total de tous les rejets de métaux lourds dans les zones côtières.

Depuis 2008, la surveillance environnementale de la contamination chimique des eaux par le suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCH) du littoral réalisée par Ifremer ne porte plus que sur le cadmium, le plomb et le mercure, les trois métaux réglementés au titre de la surveillance sanitaire ([Ifremer 2012](#)).

Dans ce travail, nous avons sélectionné deux de ces métaux pour mener nos études : le cadmium et le plomb. Notre choix s'est porté sur ces deux métaux car ils font partie de la liste des 32 substances prioritaires dans le domaine de l'eau, le cadmium y est considéré comme substance prioritaire dangereuse ([Arrêté du 8 juillet 2010 établissant la liste des substances prioritaires et fixant les modalités et délais de réduction progressive et d'élimination des déversements, écoulements, rejets directs ou indirects respectivement des substances prioritaires et des substances dangereuses visées à l'article R. 212-9 du code de l'environnement 2013](#)). Ils sont également, avec le mercure, les seuls métaux lourds surveillés par le Programme Environnemental des Nations Unies (UNEP) et qui font l'objet d'actions prioritaires afin d'en réduire l'utilisation et les répercussions environnementales. Il s'agit également de métaux dont l'effet perturbateur endocrinien a déjà été démontré mais dont les mécanismes d'action et les effets ne sont toujours pas complètement élucidés.

Tableau 1 : Liste des substances prioritaires dans le domaine de l'eau

Au titre de l'article R. 212-9 du code de l'environnement

N° UE	NUMERO CAS (1)	NUMERO UE (2)	NOM DE LA SUBSTANCE prioritaire (3)	SUBSTANCE DANGEREUSE prioritaire (X)	DATE D'INSCRIPTION dans la liste des substances prioritaires, par décision du Conseil et du Parlement européen
1	15972-60-8	240-110-8	Alachlore.		20 novembre 2001
2	120-12-7	204-371-1	Anthracène.	X	20 novembre 2001 en tant que substance prioritaire 16 décembre 2008 en tant que substance prioritaire dangereuse
3	1912-24-9	217-617-8	Atrazine.		20 novembre 2001
4	71-43-2	200-753-7	Benzène.		20 novembre 2001
5	Sans objet	Sans objet	Diphényléthers bromés (4).	X (5)	20 novembre 2001 en tant que substance prioritaire 16 décembre 2008 en tant que substance prioritaire dangereuse
	32534-81-9	sans objet	Pentabromodiphényléther (numéros de congénères 28, 47, 99, 100, 153 et 154).		16 décembre 2008
6	7440-43-9	231-152-8	Cadmium et ses composés.	X	20 novembre 2001
7	85535-84-8	287-476-5	Chloroalcanes, C10-13 (6).	X	20 novembre 2001
8	470-90-6	207-432-0	Chlorfénvinphos.		20 novembre 2001
9	2921-88-2	220-864-4	Chlorpyrifos. Ethylchlorpyriphos.		20 novembre 2001

(1) CAS : Chemical Abstracts Service.

(2) Numéro UE : inventaire européen des produits chimiques commercialisés (EINECS) ou liste européenne des substances chimiques notifiées (ELINCS).

(3) Lorsqu'un groupe de substances est retenu, un représentant typique de ce groupe est mentionné à titre de paramètre indicatif (entre parenthèses et sans numéro). Pour ces groupes de substances, le paramètre indicatif doit être défini en recourant à la méthode analytique.

(4) Ces groupes de substances englobent généralement un très grand nombre de composés. Pour le moment, il n'est pas possible de fournir des paramètres indicatifs appropriés.

(5) Uniquement pentabromodiphényléther (numéro CAS 32534-81-9).

(6) Ces groupes de substances englobent généralement un très grand nombre de composés. Pour le moment, il n'est pas possible de fournir des paramètres indicatifs appropriés.

N° UE	NUMERO CAS (7)	NUMERO UE (8)	NOM DE LA SUBSTANCE prioritaire (9)	SUBSTANCE DANGEREUSE prioritaire (X)	DATE D'INSCRIPTION dans la liste au niveau communautaire
10	107-06-2	203-458-1	1,2-dichloroéthane.		20 novembre 2001
11	75-09-2	200-838-9	Dichlorométhane.		20 novembre 2001
12	117-81-7	204-211-0	Di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP).		20 novembre 2001
13	330-54-1	206-354-4	Diuron.		20 novembre 2001
14	115-29-7	204-079-4	Endosulfan.	X	20 novembre 2001 16 décembre 2008 en tant que substance prioritaire dangereuse
15	206-44-0	205-912-4	Fluoranthène (10).		20 novembre 2001
16	118-74-1	204-273-9	Hexachlorobenzène.	X	20 novembre 2001
17	87-68-3	201-765-5	Hexachlorobutadiène.	X	20 novembre 2001
18	608-73-1	210-158-9	Hexachlorocyclohexane.	X	20 novembre 2001
19	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon.		20 novembre 2001
20	7439-92-1	231-100-4	Plomb et ses composés.		20 novembre 2001
21	7439-97-6	231-106-7	Mercure et ses composés.	X	20 novembre 2001
22	91-20-3	202-049-5	Naphthalène.		20 novembre 2001
23	7440-02-0	231-111-4	Nickel et ses composés.		20 novembre 2001
24	25154-52-3	246-672-0	Nonylphénol.	X	20 novembre 2001
	104-40-5	203-199-4	(4-nonylphénol).	X	20 novembre 2001
25	1806-26-4	217-302-5	Octylphénol.		20 novembre 2001
	140-66-9	sans objet	(4-(1,1',3,3'-tetraméthylbutyl)-phénol).		20 novembre 2001
26	608-93-5	210-172-5	Pentachlorobenzène.	X	20 novembre 2001
27	87-86-5	201-778-6	Pentachlorophénol.		20 novembre 2001
28	Sans objet	Sans objet	Hydrocarbures aromatiques	X	20 novembre 2001

			polycycliques.		
	50-32-8	200-028-5	(Benzo[a]pyrène).	X	20 novembre 2001
	205-99-2	205-911-9	(Benzo[b]fluoranthène).	X	20 novembre 2001
	191-24-2	205-883-8	(Benzo[g,h,i]perylène).	X	20 novembre 2001
	207-08-9	205-916-6	(Benzo[k]fluoranthène).	X	20 novembre 2001
	193-39-5	205-893-2	(Indeno[1,2,3-cd]pyrène).	X	20 novembre 2001
29	122-34-9	204-535-2	Simazine.		20 novembre 2001
	688-73-3	211-704-4	Composés du tributylétain.	X	20 novembre 2001 ³⁰
	36643-28-4	Sans objet	(Tributylétain-cation).	X	20 novembre 2001
31	12002-48-1	234-413-4	Trichlorobenzène.		20 novembre 2001
32	67-66-3	200-663-8	Trichlorométhane (chloroforme).		20 novembre 2001

(7) CAS : Chemical Abstracts Service.

(8) Numéro UE : inventaire européen des produits chimiques commercialisés (EINECS) ou liste européenne des substances chimiques notifiées (ELINCS).

(9) Lorsqu'un groupe de substances est retenu, un représentant typique de ce groupe est mentionné à titre de paramètre indicatif (entre parenthèses et sans numéro). Pour ces groupes de substances, le paramètre indicatif doit être défini en recourant à la méthode analytique.

(10) Le fluoranthène figure sur la liste en tant qu'indicateur d'autres hydrocarbures aromatiques polycycliques plus dangereux.

a) Le cadmium

i. Généralités

Le cadmium est un élément trace métallique ubiquitaire qui n'existe pas à l'état libre. Ses principaux composés sont le chlorure de cadmium (CdCl_2), l'oxyde de cadmium (CdO), le sulfate de cadmium (CdSO_4) et le sulfure de cadmium (CdS). Il est obtenu comme produit de raffinage du zinc, du plomb et du cuivre (INERIS 2011).

Il est principalement utilisé pour la fabrication des batteries, le traitement de surface (cadmiage) et la production de pigments colorés et notamment utilisés dans la fabrication du plastique. Il est très utilisé pour ses propriétés de malléabilité et sa résistance à la corrosion dans les revêtements des métaux ferreux. En 2006, son utilisation a été prohibée par la réglementation européenne dans l'industrie électrique et électronique, la coloration et la stabilisation de certains produits ainsi que dans le traitement de surface de produits métalliques destinés pour certaines applications (Renaut 2011).

Chez l'homme la toxicité du Cd sur le système respiratoire est reconnue depuis plus d'une soixantaine d'année. Une intoxication aigue peut être responsable de gastro-entérites, de crampes épigastriques, de vomissements, de diarrhées et de myalgies. Elle peut être létale à des concentrations égales à 5 g d'iodure de Cd (par ingestion). L'exposition chronique au Cd cible principalement les reins et peut provoquer des lésions rénales graves. Elle peut également induire une altération du système pulmonaire, des atteintes osseuses et même des neuropathies périphériques. Certaines études ont montré un lien entre l'exposition au Cd et l'apparition de certains cancers (INERIS 2011).

Le cadmium élémentaire, le chlorure de cadmium et le sulfate de cadmium sont classés comme « Substance devant-être assimilée à des substances altérant la fertilité dans l'espèce humaine ou causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine » par l'Union Européenne. **L'oxyde de cadmium et le sulfure de cadmium** sont classés en tant que « Substances préoccupantes pour la fertilité dans l'espèce humaine ou pour l'homme en raison d'effets toxiques possibles sur le développement ». Le Cd est également classé comme composé pouvant induire des mutations génétiques (JOCE 2004).

La dose journalière tolérable (DJT) chez l'homme est de $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$. Ainsi la concentration de Cd dans les produits destinés à la consommation humaine a été réglementée. La concentration maximale de cadmium tolérée dans la chair de poisson est de 0,05 ppm pour la plupart des espèces, à l'exception de l'anguille (0,10 ppm) et de l'espadon (0,30 ppm) (Renaut 2011).

Après absorption, le Cd est véhiculé par la transferrine, l'albumine (De Smet, Blust, and Moens 2001) et les MT (protéines de transport et de stockage du Cd) vers le foie et les reins (50-70%) principalement. Mais il est également transporté vers le pancréas, la glande thyroïde, les testicules et les glandes salivaires. Dans les tissus, le Cd est lié aux MT et le complexe Cd-MT est stocké dans les organes et c'est la fraction libre du Cd qui est

responsable des effets toxicologiques observés après contamination. La demi-vie du Cd dans les reins est de 20 à 30 ans et de 30 jours dans le sang (INERIS 2011).

ii. Ecotoxicologie

L'introduction du Cd dans le milieu marin peut résulter de l'érosion naturelle, du lessivage des sols, des rejets industriels, du traitement des effluents industriels ainsi que de l'activité minière. A l'état métallique, le Cd n'est pas soluble dans l'eau, mais ses sels le sont et leur solubilité dépend du pH et du contre ion (INERIS 2011). En mer, le cadmium est fortement bioaccumulé dans le phytoplancton, zooplancton et les bivalves filtreurs (Pierre 2009), d'ailleurs les moules et les huîtres sont utilisées comme bioindicateurs de contamination par le Cd et d'autres métaux lourds. Chez les poissons plusieurs valeurs de NOEC (No Observed Effect Concentration), qui correspond à la concentration maximale pour laquelle aucun effet n'est observable, ont été reportées chez plusieurs espèces (Tableau 2).

La toxicité du Cd pour les espèces aquatiques dépend de la spéciation. La concentration de l'ion libre Cd^{2+} est proportionnelle à la biodisponibilité du métal. La toxicité est réduite par la complexation de Cd^{2+} avec les anions inorganiques et organiques et par les interactions compétitives entre Ca^{2+} et Cd^{2+} pour les sites d'absorption. La toxicité aiguë par le Cd^{2+} implique une perturbation de l'homéostasie ionique, en particulier celle du Ca^{2+} , mais aussi de Na^{2+} et Mg^{2+} . L'exposition chronique implique des perturbations et des interruptions de la croissance, de la reproduction, du système immunitaire, du système endocrinien et du développement. Le cadmium s'accumule principalement dans le foie et les reins (McGeer, Niyogi, et Scott Smith 2011).

Chez les poissons, le cadmium est bioaccumulé également à l'intérieur des œufs (Rani 2000). Une mort embryonnaire, des déformations au cours du développement suite à l'exposition au Cd ont été rapportées dans la littérature (Cheng *et al.* 2000).

La toxicité du Cd est principalement liée à la perturbation de l'équilibre du cuivre et d'autres métaux essentiels à l'intérieur de l'organisme.

Le Cd est capable de perturber le fonctionnement normal du système endocrinien en altérant l'axe HHGH à différents niveaux chez les mâles comme chez les femelles (Thomas 1990). En effet, il a été démontré qu'il peut altérer la synthèse, la libération et la dégradation des hormones.

Le Cd possède des effets œstrogéniques et ce à travers différents mécanismes moléculaires et cellulaires. Il peut agir au niveau de l'hypophyse altérant indirectement la stéroïdogénèse, mais il peut aussi agir directement sur les gonades ou le foie. Le Cd modifie également l'homéostasie du calcium et perturbe la transduction des signaux responsables de la sécrétion d'hormones gonadiques et hypophysaires (Thomas 1999). D'autres études ont montré que le Cd est capable d'inhiber directement les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse gonadique et le métabolisme hépatique des hormones (Pandya *et al.* 2012).

Plusieurs études menées chez les mammifères et les poissons montrent que le Cd possède une forte affinité pour les ER (Safe 2003; Henson et Chedrese 2004). Des sites de liaison pour le Cd au niveau des ER ont même été identifiés (Nesatyy *et al.* 2005).

En revanche, d'autres études ont montré qu'en plus de l'activation des ER, le Cd est également capable de se fixer de manière compétitive aux AR empêchant la fixation des androgènes à leurs récepteurs (Sellin et Kolok 2006).

Des perturbations endocriniennes avec des modes d'action moins traditionnels comme l'altération des signaux de transduction et les processus liés aux ER impliquant des cations divalents comme le Ca^{2+} and Zn^{2+} ont été décrites par Thomas 1999. Cela peut altérer les signaux le long de l'axe HHGH ainsi que la synthèse de protéines directement liées aux ER comme la Vtg.

Cependant, quelques études ont montré un effet négatif du Cd sur les concentrations plasmatiques de l'œstradiol ou de la Vtg. Dans une étude sur l'effet du Cd sur l'axe HHGH chez des medaka japonais adultes mâles et femelles, et dans laquelle différentes concentrations de Cd ont été testées (0–10 $\mu\text{g/l}$) pendant 7 jours, les poissons ont présenté une diminution de la libération des stéroïdes par les gonades avec toutes les concentrations testées et les taux plasmatiques d'œstradiol ont significativement diminué chez les femelles avec les concentrations supérieures à 5 $\mu\text{g/l}$. Il n'y avait pourtant pas d'effets notables sur la synthèse de la Vtg ou les ER au niveau hépatique ainsi que sur le GSI. Ces résultats suggèrent que les réponses hormonales le long de l'axe HPG étaient plus sensibles à l'exposition au Cd que les éléments de la reproduction et de développement (GSI et Vtg), qui, eux, n'ont pas été affectés dans cette étude (Tilton, Foran, et Benson 2003). Cela pourrait être lié à la courte durée du traitement (7 jours) ne laissant pas le temps à l'installation de lésions plus sévères à ce niveau.

En revanche, l'implication du Cd dans l'induction d'altérations du développement de la reproduction a été établie depuis longtemps. Chez le poisson d'eau douce *Labeo bata*, Hamilton, 1822, l'exposition à 4mg/l de Cd a diminué de façon significative le GSI des ovaires et des testicules. L'analyse histologique a montré une altération des testicules avec des ruptures au niveau de l'épithélium germinale et des changements délétères dans les cellules germinales postméiotiques (absence de spermatozoïdes dans les testicules des mâles exposés au Cd). Chez les femelles, le développement folliculaire a été majoritairement arrêté aux premiers stades ovocytaires. Une atrésie ovarienne et un effondrement du nombre d'ovocytes plus matures ont également été notés. Des concentrations de Cd supérieures à 10 mg/l étaient létales pour les poissons (Das 1988). Une diminution du GSI ainsi qu'une diminution de la concentration plasmatique de la Vtg a également été rapportée chez la plie rouge (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum, 1792) avec 25 $\mu\text{g/l}$ de Cd pendant 71 jours (Pereira et al. 1993).

Une réduction de la synthèse de la Vtg liée à une inhibition de l'activité transcriptionnelle des ER par le Cd a été observée chez la truite arc-en-ciel (Le Guével et al. 2000).

Tableau 2 : Valeurs de NOEC disponibles pour les composés du cadmium reportées chez différentes espèces de poissons. D'après (INERIS 2011).

Espèce	Composé	Critère d'effet	Concentration (µg/l)	Référence
<i>Salmo salar</i>	CdCl ₂	NOEC (46j)	0,47	(Rombough et Garside 1982)
<i>Brachydanio rerio</i>	CdCl ₂	NOEC (36j)	1	(Bresch 1982)
<i>Catostomus commersoni</i>	CdCl ₂	NOEC (10-30j)	4,2	(Eaton, McKim, et Holcombe 1978)
<i>Esox lucius</i>	CdCl ₂	NOEC (7-28j)	1,3	
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	CdCl ₂	NOEC (20-27)	4,1	
<i>Salvelinus namaycush</i>	CdCl ₂	NOEC (10-31j)	4,4	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	CdCl ₂	NOEC (24-126j)	1,1	
<i>Salmo trutta</i>	CdCl ₂	NOEC (50-60j)	3,8	
<i>Salvelinus fontinalis</i>	CdCl ₂	NOEC (3ans)	0,9	
<i>Jordanella floridae</i>	CdCl ₂	NOEC (100 j)	4,1	(Spehar 1976)
<i>Salmo gairdneri</i>	CdSO ₄	NOEC (50j)	4	(Dave <i>et al.</i> 1981)
<i>Salmo gairdneri</i>	CdCl ₂	NOEC (84j)	12	(Lowe-Jinde et Niimi 1984)
<i>Pimephallus promelas</i>	CdSO ₄	NOEC (60j)	13	(Pickering et Gast 2011)

b) Le plomb

i. Généralités

Le Pb est un élément chimique de la famille des cristallogènes utilisé depuis l'antiquité pour sa malléabilité et sa résistance à la corrosion ainsi que la facilité de son extraction. La première source du Pb est la galène (PbS). Il est également présent dans d'autres minéraux comme la cérusite (PbCO₃) et l'anglésite (PbSO₄). Les principaux composés du Pb sont l'acétate de plomb (Pb(C₂H₃O₂)₂), le carbonate de plomb (PbCO₃), l'oxyde de plomb (PbO), le dioxyde de plomb (PbO₂), le sulfure de plomb (PbS) et le sulfate de plomb (PbSO₄) (INERIS 2003).

Le Pb a largement été utilisé pour la réalisation des conduits d'eau potable mais aujourd'hui il est principalement utilisé dans les batteries électriques (65-70% de l'utilisation du Pb dans le monde occidental), les alliages, les peintures, les cosmétiques, les câbles électriques... Depuis 1982, son utilisation a considérablement diminué, du fait qu'il ne soit plus utilisé comme additif aux essences de voiture en Amérique du nord et en Europe ce qui a nettement réduit la pollution atmosphérique par le Pb.

La production du Pb à partir des minerais a, elle aussi, beaucoup diminué pour laisser la place à la récupération du Pb par le recyclage des déchets ce qui représente en Europe et en France environ 60 % de l'utilisation globale du plomb (ILZSG 2004).

Chez l'homme, les sources de contamination par le Pb sont essentiellement environnementales ou professionnelles. La voie digestive est la principale voie d'absorption du Pb à l'intérieur de l'organisme, la deuxième étant l'absorption pulmonaire. Une absorption cutanée est également possible pour certaines formes liposolubles du Pb (le Pb organique) mais elle reste négligeable (INERIS 2003). Une fois à l'intérieur de l'organisme, la majorité de la fraction absorbée du Pb (95%) est fixée aux hématies (Mrugesh, Dipa, et Manishika 2011). Le reste représente la forme plasmatique libre diffusable qui sera stockée dans les tissus où éliminée par voie rénale qui constitue la principale voie d'excrétion du Pb (environ 75% du Pb absorbé). L'autre partie du Pb plasmatique est éliminé par voie gastro-intestinale, par la voie sudoripare, la voie salivaire ou encore dans les cheveux et les ongles. La demi-vie du Pb (dans le sang et certains tissus à échange rapide) est de 20 à 30 jours chez l'adulte (Bonnard *et al.* 2006) et va jusqu'à 10 mois chez les enfants à haut risque d'exposition au Pb. Le Pb se fixe préférentiellement au niveau de l'os où il est stocké et où il entre en compétition avec le Ca²⁺ (80-90% du Pb total absorbé). Le reste est réparti dans des tissus mous comme le foie, la rate et le cerveau et également dans d'autres tissus comme les ongles, les dents et les cheveux (INERIS 2003).

Chez l'adulte, une intoxication aigüe au Pb peut s'accompagner de troubles digestifs s'accompagnant de coliques, de douleurs et crampes abdominales et de vomissements pour des valeurs de plombémies comprises entre 1000 et 2000 µg/l. Une atteinte rénale, pouvant être très grave, et des lésions au niveau du système nerveux central ont également été

rapportées. L'exposition chronique au Pb entraîne principalement des lésions graves au niveau des systèmes nerveux central et périphérique, des anémies plus ou moins sévères, des lésions rénales pour les intoxications sévères au Pb... Le Pb est également reconnu pour être responsable de troubles de la reproduction et du développement. Une plombémie supérieure à 400 µg/l suite à une intoxication chronique au Pb s'étalant sur 6-10 ans s'accompagne d'une réduction du nombre de spermatozoïdes et d'un risque plus important d'infertilité (INERIS 2003; Bonnard *et al.* 2006).

D'après l'OMS, la DHT pour le Pb est fixée à 25 µg/l soit une DJT fixée à 3,5 µg/l (OMS 1993). Comme pour le Cd la teneur en Pb des denrées alimentaires est réglementée par l'union européenne qui fixe les concentrations maximales tolérables en plomb à 0,30 µg.g⁻¹ dans la chair des poissons.

ii. Ecotoxicologie

Les concentrations du Pb varient de 1 à 10 µg/l dans les eaux douces de surface. Elles sont inférieures à 50 ng/l dans les eaux de mer et à 3 µg/l dans les eaux de pluie (INERIS 2003). Les rejets aquatiques du Pb proviennent essentiellement des rejets industriels et plus précisément du domaine de la sidérurgie.

Dans l'eau de mer, le Pb se trouve principalement sous forme de carbonates PbCO₃ (40 à 80 %), de chlorures PbCl₂ (1 à 40 %) ou de PbCl⁺ (2 à 19 %). La majorité des composés organiques du Pb ne sont pas très solubles dans l'eau alors que les acétates de Pb et les composés halogénés du Pb représentent des formes plus solubles.

La biodisponibilité du Pb pour les organismes aquatiques dépend en grande partie du pH, de la dureté et de la teneur en matière organique naturelle des eaux. Chez les poissons, la toxicité aiguë par le Pb est due à l'asphyxie respiratoire en présence de concentrations extrêmes et la perturbation de l'homéostasie. Les effets chroniques sont semblables à ceux observés chez l'homme, impliquant principalement un dysfonctionnement hématologique et neurologique. Le plomb absorbé agit en substituant au calcium et éventuellement d'autres cations divalents essentiels, tels que le fer et le zinc. Par conséquent, le Pb se retrouve principalement dans les tissus calcifiés du squelette et des écailles, mais également dans le sang, les branchies et les reins. Bien que de grands progrès ont été accomplis dans la caractérisation de l'absorption, l'accumulation et la toxicité du plomb chez le poisson, il reste beaucoup à apprendre sur les voies spécifiques de transport et de distribution du Pb, ainsi que les mécanismes d'excrétion (Mager 2011).

Le nombre d'études sur l'effet perturbateur endocrinien du Pb chez les poissons reste relativement réduit par rapport à d'autres PE. Cependant ses effets délétères sur la reproduction et le développement des gamètes par l'altération du système endocrinien et l'inhibition de la production d'hormones ont déjà été démontré. Plusieurs valeurs de NOEC ont été établies chez plusieurs espèces de poissons (Tableau 3) (INERIS 2003).

Dans une étude (*in vitro*) menée sur des femelles de poissons chats post-vitellogéniques traitées avec différentes doses de nitrate de plomb (PbNO₃)₂ (0 ; 0,01 ; 0,1 ; 1 ; 3 et 10 µg/ml) pendant 12 ou 24h, l'effet sur les taux d'E2 et de testostérone était biphasique : un effet stimulateur à de faibles concentrations et un effet inhibiteur avec les concentrations les plus élevées. Par contre les taux de progestérone, de 17-hydroxyprogestérone, de 17,20β-dihydroxyprogestérone étaient inhibés de manière dose-dépendante ce qui présente le Pb comme perturbateur endocrinien potentiel de la stéroïdogénèse folliculaire. D'après cette étude, et contrairement à ce qui est connu sur le plomb, ce dernier aurait un effet bénéfique quand il est présent en quantité « traces » (le rôle de l'E2 dans la protection cellulaire étant connu), et les effets délétères n'apparaissent qu'à des concentrations élevées (Chaube, Mishra, et Singh 2010).

L'effet inhibiteur du Pb sur les stéroïdes a été largement étudié dans la littérature. Chez le Tambour Brésilien (*Micropogonias undulatus*), l'intoxication de femelles, en période de développement gonadique, par le Pb pendant un mois est suivie d'une diminution des concentrations plasmatiques des stéroïdes associée à une altération du développement des ovaires (Thomas 1999). Une diminution des concentrations de l'œstradiole et de progestérone chez les femelles et de la testostérone chez les mâles a également été rapportée chez des poissons (*Cyprinus carpio* et *Capoeta s.*) prélevés d'un site très contaminé par le Pb (Ebrahimi et Taherianfard 2009).

Plusieurs mécanismes par lesquels le Pb exerce son effet toxique sont proposés. L'effet inhibiteur du Pb pourrait être lié à son interaction avec les canaux Ca²⁺. En effet il a été démontré que le Pb pénètre à l'intérieur des cellules et bloque les canaux Ca²⁺ perturbant ainsi l'homéostasie du Ca²⁺ (Liu *et al.* 2001). Il a également été démontré que, chez l'homme, l'exposition des cellules de la granulosa au Pb induisait une réduction des niveaux transcriptionnels de l'aromatase et de l'activité de l'aromatase (Taupeau *et al.* 2003). Le Pb a un effet inhibiteur sur des enzymes comme P450_{sc} (qui catalyse le clivage de la chaîne latérale du cholestérol) et P450_{c17} (enzyme clé dans la synthèse des androgènes). Cette inhibition pourrait être liée au fait que le Pb soit connu pour pouvoir inhiber la synthèse de l'hème et que ces hormones sont des hémoprotéines (Thoreux-Manlay *et al.* 1995). Le Pb possède une grande affinité aux protéines thiols et aux enzymes impliquées dans la synthèse des stéroïdes et peut ainsi perturber leur fonctionnement normal (Persson, Krook, et Jörnvall 1991).

Le Pb peut avoir un effet sur le développement des gonades. Ainsi il a été constaté, dans une étude réalisée sur le poisson chat (*Pangasianodon hypophthalmus*) par Yamaguchi *et al.* 2007, qu'il existe une corrélation négative entre les concentrations de Pb mesurées dans le foie des poissons et le GSI. Des coupes histologiques des testicules des poissons à faible GSI ont montré une nécrose des spermatogonies avec absence de cellules germinales à d'autres stades de développement ainsi que des cellules de Sertoli hypertrophiées (Figure 12).

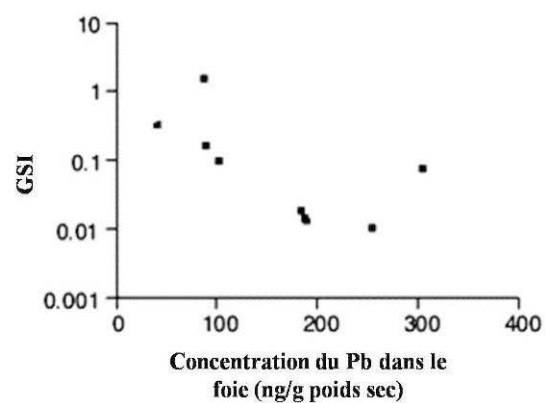


Figure 12 : Corrélation négative entre le GSI et la concentration du Pb au niveau du foie.

$P < 0,05$ et $r = -0,816$. D'après Yamaguchi *et al.* 2007

Tableau 3 : Valeurs de NOEC disponibles pour les composés du plomb reportées chez différentes espèces de poissons. D'après (INERIS 2011).

Espèce	Composé	Critère d'effet	Concentration (µg/l)	Référence
<i>Brachydanio rerio</i>	Pb(CH ₃ COO) ₂	NOEC (16j)	120	(Dave et Xiu 1991)
<i>Catostomus commersoni</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (60j)	120	(Sauter et al. 1976)
<i>Esox lucius</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (60j)	250	(Sauter et al. 1976)
<i>Ictalurus punctuatus</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (60 j)	75	(Sauter et al. 1976)
<i>Lepomis macrochirus</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (60 j)	70	(Sauter et al. 1976)
<i>Pimephales promelas</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEg (32 j)	170	(Sauter et al. 1976)
<i>Salmo gairdneri</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (19m)	41,2	(Sauter et al. 1976)
	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (19m)	13,2	(Sauter et al. 1976)
	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (19m)	7,2	(Davies et al. 1976)
	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (6 j)	71	(Sauter et al. 1976)
<i>Salmo gairdneri</i>		NOEC	23	Moyenne géométrique
<i>Salmo salar</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (90j)	20	(Grande et Andersen 1983)
<i>Salvelinus fontinalis</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (3a)	58	(Holcombe et al. 1976)
<i>Salvelinus namaycush</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (60j)	48	(Sauter et al. 1976)
<i>Stizostedion vitreum</i>	Pb(NO ₃) ₂	NOEC (30j)	240	(Sauter et al. 1976)

IV. Modèle animal : *Dicentrarchus labrax* L.

1. Pourquoi le loup ?

Le choix du loup en tant que modèle animal reposait en priorité sur :

- Toutes les connaissances biologiques et physiologiques disponibles dans la littérature sur cette espèce et ayant fait de lui un modèle d'étude connu et relativement simple.
- Le fait qu'il soit un modèle d'étude depuis plusieurs années dans notre laboratoire, un modèle dont on maîtrise la manipulation et l'entretien et qui convient parfaitement pour des expérimentations menées dans notre laboratoire de zootechnie.
- Sa large distribution géographique faisant de lui un modèle représentatif des poissons sauvages.
- Le grand intérêt porté pour cette espèce qu'il soit en pêche ou en aquaculture.
- La vulnérabilité potentielle de cette espèce dont la pêche n'est toujours pas soumise à un quota et dont la taille minimale de capture ne semble pas pouvoir préserver l'espèce à long terme.

2. Classification et répartition

Dicentrarchus labrax (Linneaus 1758) communément appelé bar, bar européen ou encore loup est un **téléostéen** de la classe des **Actinoptérygiens**, de l'ordre des **Perciformes** et de la famille des **Moronidés**. Il vit principalement en eau de mer. On le trouve à l'Est de l'océan Atlantique (de la Norvège au Maroc, les îles Canaries et le Sénégal), en Méditerranée et en mer Noire. Il habite dans les zones côtières et peut même se trouver à environ 100 m de profondeur et dans des eaux moins profondes ([FishBase 2013](#)).



Figure 13 : *Dicentrarchus labrax* L.
source : (Hillewaert 2005)

3. Biologie

La croissance et le métabolisme dépendent strictement de la température de l'eau chez *Dicentrarchus labrax* L. (Person-Le Ruyet, Mahe, *et al.* 2004; Enes *et al.* 2006). La température optimale de sa croissance est entre 22 et 25°C. Sa croissance est favorisée l'été entre mai et octobre alors qu'elle semble être arrêtée pour des températures comprises entre 11 et 15°C. Il s'agit d'une espèce eurytherme, capable de supporter de grands écarts de températures (2°C-32°C), 32°C étant la limite supérieure létale (Barnabé 1990). La température interagit non seulement avec les facteurs biologiques chez les poissons mais aussi avec les facteurs environnementaux comme la disponibilité de l'oxygène ou encore la salinité du milieu (Person-Le Ruyet, Mahe, *et al.* 2004).

Le loup est également une espèce euryhaline capable de supporter de grandes variations de la salinité pouvant aller de 0,5 ‰ à 40 ‰. Durant l'année, le loup effectue des migrations saisonnières de la mer vers les estuaires et les lagunes.

Le loup habite les eaux agitées et les zones côtières rocheuses très mouvementées par les vagues ce qui semble correspondre à la recherche d'eaux riches en oxygène (Pierre 2009). Cependant, on peut le trouver dans des endroits moins oxygénés comme les estuaires. C'est un prédateur qui se nourrit de crustacés et de petits poissons. Il vit jusqu'à une quinzaine d'années.

4. Reproduction

Dicentrarchus labrax L. est une espèce gonochorique différenciée, sans caractères sexuels secondaires morphologiques permettant de distinguer les mâles des femelles. Comme chez beaucoup de poissons, il n'existe pas chez le loup d'hétérochromosomes ou de marqueurs liés au sexe pouvant aider à différencier les mâles et les femelles. Cependant, il a été constaté que la croissance des individus est liée au sexe et que les femelles grandissaient plus rapidement et atteignaient des tailles plus importantes en comparaison avec les mâles (Piferrer *et al.* 2005). Certains ont évoqué la possibilité de différencier les mâles et les femelles simplement avec la longueur de la tête et de la pré-dorsale, qui seraient légèrement supérieures chez la femelle (Barnabé 1976). Mais avec un pourcentage d'erreur égal à 20% cette méthode n'est pas considérée fiable (Fritsch 2005). La présence fréquente d'ovocytes intratesticulaires chez les mâles juvéniles fait penser à une certaine labilité sexuelle chez cette espèce.

a) La différenciation sexuelle

La différenciation sexuelle commence quand les poissons atteignent 8-9 cm et se fait plus tôt chez les femelles. Elle semble dépendre plus de la taille que de l'âge (Piferrer *et al.* 2005). On parle de dimorphisme de croissance lié au sexe. La plupart des poissons se différencient à 8 mois et seuls quelques poissons atteignent 9 cm sans s'être différenciés. La différenciation des ovaires commence à 168 dpf (days post-fertilization) (8,3 cm) et se termine vers 419 dpf (12,3-18,5 cm). Chez les mâles la chronologie de la différenciation des gonades est plus variable. Chez certains la différenciation est précoce et se produit à 168 dpf (8,3-9,5 cm) alors que d'autres restent indifférenciés jusqu'à 250 dpf (11,8 cm) (Saillant *et al.* 2003).

Il a été démontré que la différenciation chez le loup est polyfactorielle avec un sexe ratio résultant de l'interaction entre les facteurs génétiques et environnementaux (Navarro-Martín, Blázquez, et Piferrer 2009).

Parmi ces facteurs qui influencent la différenciation sexuelle, la température vient en première place. Il a été démontré que des températures élevées favorisent un développement des gonades vers le sexe mâle. Cela serait même à l'origine des grandes proportions de mâles observés chez les poissons élevés en aquaculture. En effet les larves et les juvéniles sont élevés à des températures comprises entre 19 et 22°C, plus élevées que la température de l'eau lors de la ponte (14°C en général) ce qui se traduit par un sexe ratio en faveur des mâles avec un sexe ratio (mâles : femelles) de 3:1 et qui peut même atteindre 1:0 dans certains cas. Il a été proposé que la température agisse en inhibant l'activité de l'aromatase qui jouerait un rôle primordial dans la différenciation des gonades vers le sexe féminin. Cela pose un vrai problème pour les aquaculteurs puisque les mâles grandissent moins rapidement que les femelles et atteignent donc la taille commercialisable recommandée plus tard leur induisant ainsi des coûts supplémentaires (Piferrer *et al.* 2005).

Malgré cet effet confirmé de la température sur la différenciation sexuelle chez le loup, cette espèce n'est pas TDS même si elle est parfois attribuée à cette classe de poissons. En effet, la température agirait sur la différenciation sexuelle plutôt par les effets qu'elle induit sur la croissance des poissons (Ospina-Álvarez et Piferrer 2008).

b) L'installation de la puberté et maturation

La puberté inclut la période de l'installation de la production des cellules germinales et les changements qui précèdent la première reproduction. Elle est caractérisée par un développement rapide des tissus gonadiques.

En Méditerranée, les loups femelles ont une taille plus importante que les mâles et atteignent leur puberté à l'âge de 3 ans, ce qui correspond au premier cycle vitellogénique. Les mâles, eux, deviennent pubères à 2 ans (ce qui coïncide normalement avec l'âge de leur commercialisation en aquaculture) et cette puberté est accompagnée d'un retard de croissance (Zanuy *et al.* 2001). Il est important de signaler que l'âge de la maturité chez cette espèce varie d'une région à une autre. Il peut se prolonger jusqu'à 5-8 ans pour les femelles et 4-7 ans pour les mâles dans les îles Britanniques par exemple (Pierre 2009).

Pendant cette période le GSI connaît des variations importantes. Chez des loups mâles et femelles, durant leur 1^{ère} période de maturation, les valeurs du GSI sont basses (inférieures à 0,1%) durant l'été et le début de l'automne (Juillet-Octobre). Chez les mâles, le GSI commence à augmenter au mois de novembre pour atteindre des valeurs élevées (~1,25-1,75%) en décembre et est maintenu ainsi durant la spermatogenèse et la spermiation. Chez les femelles, le GSI augmente rapidement après novembre pour atteindre un pic en février (~15 %) ce qui correspond au stade de maturation-ovulation. Une diminution progressive du GSI est ensuite observée chez les mâles et les femelles à partir du mois de mars (Rocha 2009).

Des changements importants dans les taux des hormones plasmatiques accompagnent également cette phase. La concentration plasmatique de la 11-KT chez les mâles commence à augmenter en milieu de la spermatogenèse et atteint son pic au dernier stade de spermatogenèse (~10 ng/ml). Ces concentrations ont considérablement chuté lors de la spermiation complète et sont maintenues ainsi après la ponte (~0,5 ng/ml). Les concentrations plasmatiques de LH augmentent significativement en fin de spermatogenèse (~3 ng/ml) et sont maintenues ainsi jusqu'à la fin du cycle.

Chez les femelles, les taux d'E2 augmentent progressivement au début de la vitellogenèse. Ils atteignent des valeurs maximales en fin de la vitellogenèse et après la vitellogenèse (~4 ng/ml) puis diminuent légèrement durant la maturation/ovulation. Avant et au début de la vitellogenèse, les concentrations plasmatiques de LH restent basses (< 0,5 ng/ml) et commencent à augmenter à la fin et après la vitellogenèse. Elles atteignent leur pic durant la maturation/ovulation (~2,75 ng/ml) et restent élevées durant l'atresie des ovaires (Rocha 2009).

Les mécanismes à l'origine de l'installation de la puberté font intervenir l'axe HHG qui contrôle la maturation des gonades grâce à la GnRH par la stimulation de la synthèse et la libération des GtHs (Zanuy *et al.* 2001).

Une fois matures, les loups se reproduisent tous les ans. Il existe chez les loups des pontes « successives », il s'agit d'une espèce à pontes fractionnées ; deux à quatre lots d'ovocytes (Ovocyte II, métaphaseII) sont émis successivement par les femelles durant la période de reproduction (Fritsch 2005). La ponte a lieu entre décembre et mars en Méditerranée. Les gamètes mâles sont émis simultanément dans l'eau et la fécondation est externe.

5. Exploitation de la ressource loup

a) Pêche

Fortement apprécié pour la qualité de sa chair et ses propriétés organoleptiques, le loup est exploité depuis des siècles. Sa forte valeur ajoutée, pouvant dépasser les vingt euros le kilogramme en Criée, fait de lui l'une des espèces les plus recherchées en pêche professionnelle. La ressource du loup est dite partagée car elle est exploitée par plusieurs pays de l'Europe parmi lesquels figure la France comme le principal pays européen dans ce domaine. Ce dernier vient en quatrième position après le thon, la sole et la baudroie sur la liste des espèces les plus commercialisées en France avec des parts en valeur estimées à 71 millions d'euros (7,2%). Ses débarquements sont estimés à 4000 T environ par an.

A côté des pêcheries professionnelles, sa pêche récréative est très appréciée et contribue de façon non négligeable à l'exploitation des ressources du loup. Elle peut même présenter un risque d'ouverture de filière illégale de commercialisation et concurrencer la pêche professionnelle (Ministère de l'agriculture et de la pêche 2007). A titre indicatif la pêche récréative française a été estimée en 2005 à plus de 2000 T de captures pour les trois façades maritimes Manche, Atlantique et Méditerranée. L'évaluation de la ressource du loup, estimant la diminution annuelle des stocks à -7% à -12% (incluant la mortalité annuelle), ne juge pas pour le moment l'espèce comme étant en danger bien qu'elle soit classée dans la liste rouge des espèces menacées selon l'Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN).

Cependant l'absence de quota pour la pêche, la pression de pêche exercée sur le loup, la taille minimale de la capture du loup, fixée en 2013 à 30 cm en Méditerranée et qui ne permet pas à toutes les femelles d'atteindre leur maturité sexuelle (42 cm environ) pourraient rapidement aggraver la situation (*Arrêté du 29 janvier 2013 déterminant la taille minimale ou le poids minimal de capture des poissons et autres organismes marins (pour une espèce donnée ou pour une zone géographique donnée) effectuée dans le cadre de la pêche maritime de loisir* 2013) (Fritsch 2005).

b) Aquaculture

Face au grand intérêt commercial qui a depuis longtemps entouré le loup, les premiers essais de sa reproduction artificielle en aquaculture ont commencé dans les années 70. Durant plus d'une décennie, les recherches se sont accentuées afin de mieux comprendre et optimiser son élevage (Fritsch 2005) ; des recherches en biologie, en contrôle de reproduction, en gestion de stocks, en techniques d'élevage... qui ont permis un développement très important du secteur de l'aquaculture du loup et l'augmentation rapide de sa production. Il faut deux à trois ans avant d'atteindre la taille commercialisable recommandée.

Les mâles atteignent leur puberté à 2 ans et présente, en comparaison avec les femelles, un retard de croissance. Cela constitue une limitation importante pour les aquaculteurs qui se trouvent obligés de les commercialiser à petite taille ou les garder plus longtemps que les femelles (Zanuy *et al.* 2001).

L'élevage du loup est localisé essentiellement en Méditerranée. Sa production occupe la première place en France et est estimée à 4200 T par an pour une production totale de poissons de 8208 T (Ministère de l'agriculture et de la pêche 2007).

L'objectif de ce travail consiste d'une part à étudier la réponse du gène *ho-1* au stress thermique chez le loup, et d'autre part à étudier l'effet du stress chimique lié aux métaux (le Cd et le Pb) sur l'expression de gènes clefs de l'axe HHGH.

Notre choix s'est porté sur le Cd et le Pb car notre situation géographique (la rade de Toulon) est directement concernée par les pollutions anthropiques : l'industrie (présence de port civil et militaire), la communauté d'agglomération Toulon Provence Méditerranée (TPM) (plus de 400 milles habitants d'après le dernier recensement de 2009) et l'agriculture (particulièrement la viticulture). Ainsi, on trouve dans la rade différents types de polluants, notamment le Cd et le Pb. Ces deux métaux qui font partie de la liste des 32 substances prioritaires dans le domaine de l'eau, sont, avec mercure, les seuls métaux lourds surveillés par le Programme Environnemental des nations Unies (UNEP).

Jouant un rôle primordial dans la cytoprotection, *ho-1* a été sélectionné car son induction constitue une défense cellulaire adaptative contre différents types de stress notamment le stress thermique et le stress induit par les métaux lourds.

Les problématiques autour desquelles a été fondée cette recherche sont les suivantes :

La première problématique porte sur la réponse de *ho-1* au stress thermique ; la réponse de ce gène dépend-elle de la durée du stress, et est ce qu'elle diffère d'un organe à un autre ?

La deuxième problématique porte sur l'effet du stress chimique sur l'axe HHGH, *ho-1* répond-il à ce type de stress et quels sont les effets de ce type de stress sur l'expression de gènes clés de l'axe : *fsh β* , *lh β* , *gpa* et *arom b* dans le cerveau, *arom a* dans les gonades, *mt* et *vtg* dans le foie ?

MATERIEL ET METHODES

I. Zootechnie

1. Installations et aquariums

Nos expériences ont été menées dans notre laboratoire de zootechnie à la bouée océanographique Bora2 (Figure 14) où l'EB2M a mis en place une installation hydraulique et des aquariums qui permettent d'accueillir les poissons et de mener les différents projets de l'équipe (Figure 15).



**Figure 14 : La bouée océanographique
Bora2.**

Le système se compose d'un circuit principal de récupération d'eau, l'eau est directement pompée dans la rade à proximité de la bouée à l'aide d'une pompe de débit 3,6 m³/h. L'eau pompée est reçue dans un grand bac tampon (de capacité 1000 l) puis conduite dans un premier temps vers un filtre mécanique de granulométrie comprise entre 0,5 et 1 mm, ensuite vers un système UV qui permet la stérilisation de l'eau et la suppression de tous les germes pouvant y être présents sans pour autant changer la qualité chimique de l'eau. L'eau passe ensuite à travers un filtre biologique constitué de zéolite, matériau utilisé comme support de bactéries nitrifiantes. A sa sortie, l'eau passe par un système de microfiltration qui se compose de six cartouches de maillages différents allant de 0,5 µm à 10 µm. L'eau ainsi récupérée après ces différentes étapes de filtration est conduite, grâce à un système de pompage, à l'étage où se trouvent les aquariums (Figure 15 et Figure 16).



Figure 15 : Circuit principal d'eau et systèmes de filtration



Figure 16: Schéma de l'installation hydraulique et des aquariums

Les aquariums sont répartis en quatre colonnes (5 aquariums par colonne : 4 aquariums de 75 l et un aquarium de 150 l) (Figure 17). Tous les aquariums sont montés en série et chaque aquarium est doté d'un robinet qui permet de réguler le débit de remplissage par l'eau issue du bac tampon. Une fois mis en eau, les aquariums fonctionnent en circuit fermé, régulés par une pompe d'aquarium qui contribue également à un meilleur apport en oxygène et à la distribution de la nourriture aux poissons (par la création d'un courant d'eau). Dans le compartiment arrière de chaque aquarium, deux systèmes de filtration, le premier en mousse bleue filtrante maille large, le 2^{ème} en ouate de filtration, ont été installés. L'installation des aquariums est également équipée par un circuit d'air ; chaque aquarium est doté d'un diffuseur qui règle le débit d'air grâce à une vanne.



Figure 17 : Colonnes des aquariums mises en eau

L'équilibre de l'eau à l'intérieur des aquariums est maintenu grâce à un système de surverse installé dans les compartiments arrières des aquariums. Quant à l'eau contaminée, elle est recueillie dans des poches d'évaporation de volume de 250 l où elle va séjourner pendant environ 3 mois en plein air avant d'être adressée à une plateforme spécialisée pour être retraitée (Pierre 2009) (Figure 18).



Figure 18 : Poches d'évaporation contenant de l'eau contaminée par les métaux

2. Réception et entretien des poissons

Quatre semaines avant la réception des poissons, les aquariums ont été mis en eau et chaque filtre a étéensemencé avec un mélange de bactéries nitrifiantes et dénitrifiantes (BioDigest, PRODIBIO).

Les taux de nitrites et de nitrates ont été contrôlés de façon quotidienne grâce à des tests colorimétriques (Tetratest NO_2^- et Tetratest NO_3^-) afin de surveiller le passage des pics de nitrites et de nitrates. La température de l'eau des aquariums, le pH, la salinité et la concentration de l'oxygène dissout O_2 ont également été surveillés. La température de l'eau dépendait de la température du laboratoire et variait de 8 à 12°C tout au long des expérimentations. Le pH était $7,9 \pm 0,2$, la salinité était de $30\text{‰} \pm 2$ et l' O_2 de $90\% \pm 1$.

Les poissons proviennent de la ferme Tamaris Sud Fish. Ils ont été pêchés le matin même à jeun et transportés dans un volume d'eau de mer d'environ 80 l dans l'obscurité totale (Figure 19 et Figure 20). L'oxygénation de l'eau a été assurée par un bulleur à piles fixé sur la paroi du conteneur. Le véhicule transportant le conteneur parcourt le trajet jusqu'à la bouée à très faible vitesse afin de réduire au plus le stress induit par le transport.



Figure 19 : La pêche des loups, ferme Tamaris Sud fish



Figure 20 : Transport des loups depuis la ferme Tamaris Sud Fish jusqu'au quai

Avant de répartir les poissons dans les aquariums, ces derniers sont plongés pendant 10 min dans de l'eau contenant 0,1% de formol, connu pour être un antiseptique et un désinfectant à large spectre. Le but étant d'éliminer au maximum les germes et les bactéries qui pourraient être à la surface des poissons et qui pourraient déclencher des maladies une fois les poissons en circuit fermé. Les loups sont ensuite répartis dans les aquariums (3 individus par aquarium de 75 l et 6 par aquarium de 150 l). Les paramètres de l'eau (NO_2^- , NO_3^- , T° , Salinité, O_2 ...) continuent à être surveillés et l'eau des aquariums est changée tous les jours la première semaine puis tous les 2 jours les quatre semaines suivantes. L'acclimatation des poissons dure 5 semaines, durant lesquelles les poissons sont restés au calme, à la température de la salle et sous photopériode naturelle (12 : 12), ils sont nourris *ad libitum* avec de la nourriture en granulés provenant de chez Le Gouessant (NeoStart2) à partir du huitième jour (à leur arrivée, ils sont stressés et ne s'alimentent pas) et sont habitués petit à petit à la présence d'une personne dans la salle. Ainsi les variations de l'expression des gènes étudiés seront dues uniquement au stress généré par les expérimentations et non aux stress liés aux conditions expérimentales.



Figure 21 : Répartition des poissons dans les aquariums.
(3 individus par aquarium de 75 l et 6 par aquarium de 150 l)

II. Etude de l'effet de la température sur l'expression de *ho-1*

L'étude de la température sur l'expression de *ho-1* a été effectuée sur 18 loups juvéniles âgés d'un an (80-100g) qui ont été reçus et acclimatés comme décrit ci-dessus. Elle a été menée selon le protocole de [Watabe, Kikuchi, et Aida 1993](#).

Nous avons prélevé trois individus témoins (12°C), puis on a chauffé l'eau des aquariums d'un degré toutes les heures jusqu'à atteindre 30°C. Un groupe de trois individus a été prélevé dans chacune des conditions suivantes : à 1 heure à 30°C, une semaine, deux semaines, trois semaines et quatre semaines (Figure 22). Une fois les poissons échantillonnés, ils ont été anesthésiés au Phénoxyéthanol (500 ppm) puis sacrifiés. Huit organes ont été prélevés : le cerveau, le cœur, les branchies, le foie, la rate, les intestins, les reins et le muscle et ont été placés dans des tubes eppendorf contenant 5 à 10 volumes de RNAlater® (Ambion, Applied Biosystems, France) puis conservés à -80° afin d'être analysés ultérieurement.



Figure 22 : Les poissons au cours de l'application du stress thermique

III. Etude de l'impact des métaux lourds sur l'axe hypothalamo-hypophysogonado-hépatique

1. Etudes préliminaires

Pour que les intoxications des poissons aux métaux soient réellement réalisées avec les concentrations souhaitées, il a été précédemment vérifié, en l'absence de poissons, que les métaux n'interagissent pas avec le système et qu'il n'existe pas de phénomène d'adsorption (filtres, bactéries, parois des aquariums...). Ainsi, durant la période d'intoxication les concentrations des métaux dans l'eau des aquariums ne varient pas et restent stables durant toute la durée de l'expérimentation. Il a également été vérifié qu'il n'y a pas de pollution générée par le circuit par comparaison des concentrations des métaux dans l'eau de la rade de Toulon et l'eau à l'intérieur des aquariums.

2. Détermination des concentrations d'intoxication des métaux

Pour déterminer les différentes concentrations en cadmium et en plomb avec lesquelles nous effectuerons nos intoxications, nous nous sommes référés aux concentrations moyennes de ces métaux dans le milieu naturel et nous avons constaté que les taux de contamination par ces métaux varient significativement d'un milieu à un autre.

Nous avons donc classé les milieux en non pollués, moyennement pollués et très pollués selon les concentrations de chaque métal :

Tableau 4 : Classement des milieux de « non pollué » à « très pollué » selon leur concentrations en cadmium et en plomb

Métal	Non pollué	Moyennement pollué	Très pollué
Cadmium	< 0,06 µg/l (0,5 nM)	> 0,06 µg/l (0,5 nM) < 0,1 µg /l (1 nM)	> 0,1 µg /l (1 nM)
Plomb	< 0,2 µg/l (1 nM)	> 0,2 µg/l (1 nM) < 1 µg /l (5 nM)	> 1 µg /l (5 nM)

D'après des études préalables réalisées au sein du laboratoire (Pierre 2009), on a choisi de travailler sur deux concentrations différentes pour chaque métal. Une première concentration qui se rapproche des taux qu'on peut trouver dans le milieu naturel (non pollué) et légèrement supérieure à celles qui se trouvent dans les eaux des aquariums. La deuxième concentration est 100 fois plus élevée que la première et est largement supérieure aux concentrations pouvant exister dans le milieu naturel. Une telle concentration a été choisie justement pour provoquer une réponse optimale de l'organisme et une variation observable de l'expression des gènes.

Pour le cadmium nous avons fixé la première concentration Cd1 à 0,5 µg/l et la deuxième Cd2 à 50 µg/l. Pour le plomb la première concentration de Pb1 a été fixée à 1 µg/l et la deuxième concentration Pb2 à 100 µg/l.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des concentrations choisies.

		Concentration	
		µg/l	nM
Cd	Cd1	0,5	4,4
	Cd2	50	444,8
Pb	Pb1	1	4,8
	Pb2	100	482,6

Pour les intoxications, nous avons utilisé des solutions mères de l'équipe CAPTE. La concentration de la solution de cadmium était de 1,99 g/l et celle du plomb de 2,01 g/l. Nous avons calculé les volumes des solutions des métaux qu'il fallait ajouter dans les aquariums pour obtenir les concentrations souhaitées.

3. Intoxication aux métaux

60 poissons, âgés de 15 mois et mesurant 20-28 cm ont été reçus, répartis dans les aquariums (3 individus par aquarium de 75 l et 6 par aquarium 150 l) et acclimatés comme décrit ci-dessus. Nous avons opté pour une méthode d'intoxication aigue qui s'étend sur 96 h comme c'est souvent décrit dans la littérature et nous avons choisi le mode d'intoxication qui se rapproche le plus de celui qui pourrait se trouver en milieu naturel et qui consiste à la contamination via l'eau. Les poissons ont été répartis comme suit : 2 aquariums 75 l et un aquarium 150 l pour chaque concentration des métaux (Cd1, Cd2, Pb1 et Pb2) et 4 aquariums 75 l pour les poissons témoins où l'on ne rajoutera pas de métaux. Ce qui résulte à 12 individus par condition. Nous avons effectué à T₀ l'intoxication des poissons en rajoutant les volumes de métaux calculés ci-dessus. A partir du moment où l'eau est contaminée, on ne procédera plus à aucun changement d'eau. Une observation stricte des poissons et des paramètres de l'eau des aquariums a été assurée tout au long de la durée de l'intoxication.

Durant cette période un faible taux de mortalité a été observé : 2 individus intoxiqués au Cd1 au bout de 48h, et au bout de 96h, 1 individu intoxiqué au Pb2 au bout de 72h et deux individus intoxiqués au Pb1.

Quand les 96 heures se sont écoulées, les poissons ont été anesthésiés au Phénoxyéthanol (500 ppm) puis pesés, mesurés et sacrifiés (Figure 23). Trois séries d'échantillonnage ont été réalisées, une série pour les analyses chimiques, une deuxième pour l'étude microscopique et une dernière pour la biologie moléculaire.



Figure 23 : Mesure de la taille et pesée des poissons

Pour les analyses chimiques des tissus, une partie du foie de tous les individus a été prélevée, pesée et stockée à -20° pour être analysée plus tard par l'équipe CAPTE. Des échantillons d'eau de chaque aquarium ont également été prélevés dans des bouteilles en HDPE (Nalgene) après acidification ($\text{pH} < 2$) par ajout d' HNO_3 69% (J.T. Baker, Trace Metal Analysis) afin de vérifier la composition de l'eau et sa teneur en cadmium et en plomb.

Pour l'étude microscopique, on a prélevé une petite partie des gonades qu'on a observée au microscope afin de déterminer le sexe de chaque individu (cette méthode sera décrite en détail ultérieurement).

Pour l'étude de l'expression des gènes, nous avons procédé au prélèvement de trois organes : le cerveau (Figure 24), une partie du foie (Figure 25) et les gonades (Figure 26) (après étude microscopique) qu'on a stocké dans des tubes eppendorf contenant du *RNAlater*[®] (Ambion, Applied Biosystems, France) à -80°C en l'attente d'analyses ultérieures.



Figure 24 : Prélèvement du cerveau chez les lousps



Figure 25 : Prélèvement du foie chez les lousps



Figure 26 : Prélèvement des gonades chez les lousps

IV. Analyses chimiques

1. Dosage des métaux dans l'eau

Le dosage des métaux dans l'eau a été réalisé grâce à une technique électrochimique appelée la Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV). Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un voltamètre AutolabIII (EcoChemie) contrôlé par un logiciel GPE 4,9 (EchoChemie) connecté à un système à 3 électrodes (663 VA Stand, Metrohm) (Louis *et al.* 2009) avec comme électrode de référence (Ag/AgCl/KCL 3 M), une électrode auxiliaire de platine et une électrode de travail à goutte de mercure statique (SMDE). Les paramètres de la DPASV ont été adaptés d'après Jean *et al.* 2012 et Oursel *et al.* 2013.

La détermination des métaux a été réalisée en utilisant une méthode d'ajout d'étalon automatique utilisant des pompes seringues CavroXE1000 et les voltamogrammes obtenus sont été traités en utilisant le logiciel ECDSOFT (Omanović *et al.* 2006). Les écarts-types des concentrations de métaux mesurées sont en dessous de 5%. Les analyses ont été validées d'après la référence certifiée « Nearshore Seawater Reference Material for Trace Metals » – CASS5 (NRC CNRC).

Les concentrations des métaux sur lesquelles nous avons choisi de travailler ont été vérifiées avec les concentrations de métaux retrouvées dans les eaux des aquariums par l'analyse chimique.

2. Dosage des métaux dans le foie

Les métaux lourds ont été mesurés après une digestion semi-totale optimisée (Aqua Regia extraction) sur des foies préalablement lyophilisés : pour cela 100-300 mg de tissu ont été rajoutés à 8 ml d'acide (HNO₃:HCl 3 V:1 -V, Fisher Scientific® Trace Analysis grade, HNO₃ 70%-16 M, HCl 37%-12 M) dans des bombes Teflon (PTFE) 50 ml utilisant un four micro-ondes (ANTON PAAR Multiwave 3000) à pression et température contrôlées (Tessier *et al.* 2011). La suspension obtenue a ensuite été filtrée à travers un filtre (0.45 µm, Whatman) et diluée dans 50 mL d'eau ultrapure. Les éléments traces ont été quantifiés dans des solutions de foies minéralisés dilués 5 fois (avec 2% HNO₃, Merck suprapur) en utilisant la spectrométrie de masse à plasma à couplage inductif (ICP-MS Nexion 300X, Perkin Elmer), une technique qui permet la séparation et la quantification des éléments en fonction de leur masse.

En plus des deux métaux utilisés lors de nos intoxications nous avons également effectués le dosage des teneurs d'autres métaux dans le foie afin d'étudier d'éventuelles interactions pouvant exister entre la concentration du Cd ou du Pb et les autres métaux. Ces

métaux dont la concentration a été mesurée sont : le cuivre (Cu), le zinc (Zn), l'arsenic (As), le fer (Fe), le cobalt (Co), le manganèse (Mg).

Les limites de détection pour les différents éléments dosés est de 1 µg/g pour le Zn, 0,15 µg/g pour le Cu et 0,02 µg/g pour le reste des éléments.

La présence de tous ces métaux dans le foie des poissons provenant de la ferme Tamaris Sud Fish, témoigne qu'ils ont été en contact avec ces métaux (y compris le Cd et le Pb) pendant leur période d'élevage dans la rade. Tout au long de notre analyse, les poissons intoxiqués aux Cd et au Pb seront comparés aux témoins provenant eux aussi de la même ferme et ayant été maintenus dans les mêmes conditions expérimentales que les poissons traités avec la seule différence l'intoxication par le Cd et le Pb.

Il serait tout de même intéressant dans des études ultérieures de se référer également à un témoin négatif provenant d'un milieu « non pollué » ou de mener l'étude sur des poissons élevés dans un milieu contrôlé comme dans de l'eau de mer reconstituée.

V. Etudes macroscopique et microscopique

Les gonades ont d'abord été pesées, examinées et les caractères morphologiques relevés : couleur, forme et présence ou non de laitance (Figure 27, Figure 28, Figure 29). En effet, les gonades femelles sont généralement orangères et leur forme est arrondie alors que les gonades mâles sont plutôt transparentes et leur forme est triangulaire. L'examen macroscopique à cet âge permettait, quand cela était possible, de déterminer le sexe phénotypique des poissons.



Figure 27 : Examen macroscopique : gonade femelle



Figure 28 : Examen macroscopique: gonade mâle



Figure 29 : Pesée des gonades

Nous avons ensuite procédé à une observation microscopique des gonades en suivant le protocole de [Guerrero et Shelton 1974](#) pour le sexage des poissons juvéniles. Pour cela, nous avons préalablement préparé une solution d'acéto-carminé en rajoutant 0,5g de carmine à 100 ml d'acide acétique 45%. Le mélange a été porté à ébullition pendant 2-4 min puis filtré, une fois refroidi, à l'aide de papier filtre. Une couche très fine de gonade est découpée, placée sur lame de microscope et couverte par 1-2 gouttes d'acéto-carminé. Le tout est recouvert ensuite d'une lamelle et observé avec un microscope optique (grossissement X50). L'observation microscopique viendra confirmer le sexe déterminé par l'examen macroscopique des gonades ou déterminer le sexe dans le cas où cela n'a pas été possible par ce dernier.



Figure 30 : Gonades mâles vues au microscope optique (grossissement X50).

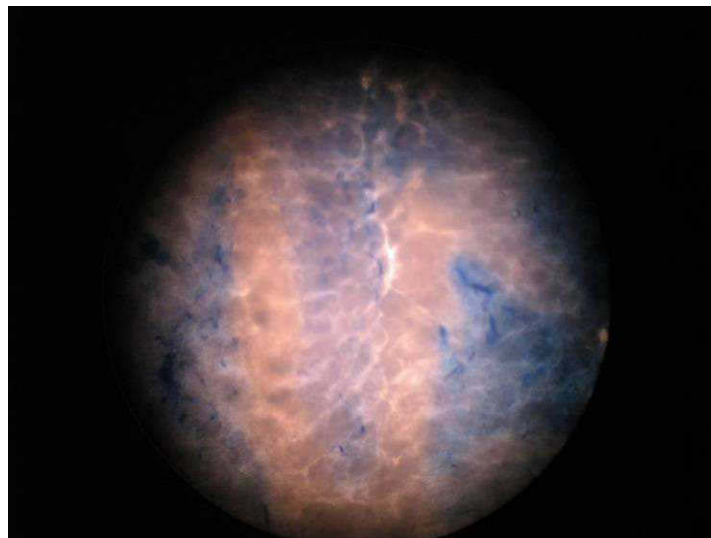


Figure 31 : Gonades femelles vues au microscope optique (grossissement X50).

VI. Biologie moléculaire

1. Extraction des ARN totaux

Tous les échantillons des différents tissus ont été prélevés et placés dans des tubes eppendorf contenant 5 à 10 volumes de RNAlater® (Ambion, Applied Biosystems, France) qui permettra la stabilisation et la conservation de l'ARN. Ensuite ils ont été stockés à -80°C pour les futures analyses.

Les extractions ont été réalisées selon la méthode Eurobio de l'EXTRACT'ALL®

Les ARN sont ensuite traités à la DNase (DNase I Amp Grade, Invitrogen) pour éliminer toute contamination à l'ADN. Pour 50 µl on a rajouté :

- 12 µl de MgCl₂ (Invitrogen, 50 mM)
- 10 µl de DTT (Eurobio, 100 mM)
- 10 µl de Tampon DNase (×10)
- 1 µl RNase inhibitor (RNaseOUT, Invitrogen, 40 U/µl)
- 1 µl DNase (DNase I Amp Grade, Invitrogen, 1 U/µl)
- 16 µl d'eau ultra-pure.

La vérification de la pureté des ARN totaux ainsi que de la détermination des concentrations des échantillons ont été réalisées par spectrophotométrie sur NANODROP 1000. Seuls les ARN totaux dont le rapport DO 260/280 est supérieur à 1,8 et le rapport DO 260/230 est inférieur à 2,1 sont considérés de bonne qualité et retenus pour nos analyses.

A la fin des extractions, on a procédé à une vérification de la non contamination des ARN totaux par de l'ADN. Pour cela on a réalisé une PCR sur 1 µl d'ARN totaux en utilisant des amorces d'un gène invariant, RPL17 et un témoin positif (PCR réalisée sur de l'ADNc de loup). L'absence de toute amplification après migration des produits de PCR sur gel d'agarose témoigne de la bonne qualité de l'ARN et de sa non contamination.

2. Transcription inverse

La synthèse de l'ADN complémentaire a été réalisée selon le protocole standard de la Superscript II RNase H Reverse Transcriptase (Invitrogen) avec une amorce avec une queue poly(dT) (PROLIGO, 100 µM) dont la séquence

5' CCA CGC GTC GAC TAG TAC AGC CAA TGA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT 3'

Pour cela on a ajouté 1 μ l d'ARN au mix suivant :

1^{er} Mix RT/ V= 12 μ l

- 2 μ l de dNTP à 5 mM (Invitrogen, 100 mM)
 - 1 μ l PolydT₁₂Tail2 (PROLIGO, 100 μ M)
 - qsp 12 μ l d'eau ultrapure
- 65°C, 5 min

Nous avons ensuite effectué un 2^{ème} mix qu'on a ajouté au mix précédent après les 5 min d'incubation :

2^{ème} Mix RT/ V_{final} = 19 μ l

- 4 μ l de tampon RT 5X
 - 2 μ l de DTT (100mM)
 - 1 μ l de RNase Inhibitor (RnaseOUT, Invitrogen, 40 U/ μ l)
- 42°C, 2 min

Pour finir, on a rajouté au mélange le mix suivant :

3^{ème} Mix RT/ V_{final} = 20 μ l

- 1 μ l de Superscript II reverse Transcriptase (200 U/ μ l, Invitrogen)
- 42°C, 40 min
70°C, 15 min

3. Réaction de polymérisation en chaîne

La PCR comporte :

- Une phase exponentielle durant laquelle on double à chaque cycle la quantité d'ADN obtenu au cycle précédent et qui suit donc l'équation : $N = N_0(1+E)^n$ (N_0 : quantité initiale d'ADN ; E : l'efficacité de la PCR, elle est comprise entre 0 et 1 ; n : nombre de cycles).
- Une phase « plateau » durant laquelle il n'y a plus d'amplification et la quantité d'ADN reste stable essentiellement à cause de la diminution de la quantité des réactifs. Parmi les facteurs qui interviennent dans cette phase on cite: la consommation des amorces et des dNTP, la dégradation de la Taq polymérase ou encore les amplifiats eux-mêmes... (Khiri et Torresani 1996).

Nous avons opté pour la PCR semi-quantitative qui consiste à arrêter la réaction de la PCR avant d'atteindre cette phase plateau. On a ainsi réalisé les mises au point des PCR des gènes étudiés en choisissant un nombre de cycles où la réaction est encore dans sa phase exponentielle. La détermination de la température d'hybridation optimale a été réalisée en effectuant un gradient de températures. La normalisation de la PCR se fait par rapport à un standard interne, un gène invariant (RPL17 ou la β actine selon la taille du fragment à amplifier). L'expression de ces gènes est présumée constante ; ils ont la propriété de

s'exprimer dans tous types de cellules et leur expression est indépendante de l'état physiologique des individus ou des conditions expérimentales. Cette technique permet ainsi d'éliminer les variations qui pourraient être dues aux problèmes de rendement de la PCR ou encore les variations dues aux manipulations voire la différence de température pouvant exister entre deux puits différents d'un même thermocycleur.

Pour toutes les PCR, un témoin négatif (TN) a été réalisé en utilisant le même mix PCR et en remplaçant la quantité d'ADNc prévue par la même quantité en eau ultrapure afin de vérifier la contamination possible de nos réactifs. Toutes les PCR ont été réalisées sur thermocycleur Eppendorf (Master cycler gradient).

Les PCR de *ho-1*, d'*aroma*, d'*arom b* ont été réalisées en ajoutant 1 µl d'ADNc au mix suivant :

Mix PCR / V= 50 µl

- 2 µl de dNTP à 5mM
- 5 µl de tampon 10X de la Hot Master Taq
- 0,2 µl de la Hot Master Taq polymérase (5U/µl, Eppendorf)
- 1 µl d'amorce (gène) Dir à 10pmoles/µl
- 1 µl d'amorce (gène) Rev à 10pmoles/µl
- 1 µl d'amorce *rpl17* Dir à 10pmoles/µl
- 1 µl d'amorce *rpl17*Rev à 10pmoles/µl
- qsp 50 µl d'eau ultrapure

Les PCR de la *gpa*, de la *fsh*, de la *lh* ont été réalisées en ajoutant 1 µl d'ADNc au mix suivant :

Mix PCR / V= 50 µl

- 2 µl de dNTP à 5mM
- 5 µl de tampon 10X de la Hot Master Taq
- 0,2 µl de la Hot Master Taq polymérase (5U/µl, Eppendorf)
- 2,5 µl d'amorce (gène) Dir à 10pmoles/µl
- 2,5 µl d'amorce (gène) Rev à 10pmoles/µl
- 1 µl d'amorce *rpl17* Dir à 10pmoles/µl
- 1 µl d'amorce *rpl17* Rev à 10pmoles/µl
- qsp 50 µl d'eau ultrapure

Pour la *vtg*, on a ajouté 1 µl d'ADNc au mix suivant :

Mix PCR / V= 50 µl

- 2 µl de dNTP à 5mM
- 5 µl de tampon 10X de la Hot Master Taq
- 0,2 µl de la Hot Master Taq polymérase (5U/µl, Eppendorf)
- 2 µl d'amorce *vtg* Dir à 10pmoles/µl
- 2 µl d'amorce *vtg* Rev à 10pmoles/µl

- 1 µl d'amorce *rpl17* Dir à 10pmoles/µl
- 1 µl d'amorce *rpl17* Rev à 10pmoles/µl
- qsp 50 µl d'eau ultrapure

Pour *mt*, nous avons ajouté 1 µl d'ADNc à :

Mix PCR / V= 25 µl

- 1 µl de dNTP à 5mM
- 2,5 µl de tampon 10X de la Hot Master Taq
- 0,2 µl de la Hot Master Taq polymérase (5U/µl, Eppendorf)
- 1 µl d'amorce *mt* Dir à 10 pmoles/µl
- 1 µl d'amorce *mt* Rev à 10 pmoles/µl
- 0,5 µl d'amorce *actineβ* Dir à 10 pmoles/µl
- 0,5 µl d'amorce *actineβ* Rev à 10 pmoles/µl
- qsp 25 µl d'eau ultrapure

Le programme d'amplification utilisé à chaque fois est le suivant

Programme

- 1- 94°C 2 min
 - 2- 94°C 45 sec
 - 3- T_m°C 45 sec
 - 4- 72°C 2 min
- Goto 2 rep n**
- 5- 72°C 5 min
 - 6- Hold 14°C
 - 7- End

Nous avons jugé indispensable d'effectuer un « dropping » pour certaines de ces PCR. Cela consiste à rajouter le couple d'amorces de *rpl17* à la réaction de la PCR plus tardivement que les amorces du gène en question. En effet, dans une étude de cycles de *rpl17* que nous avons préalablement réalisée, le nombre de cycles optimal nécessaire pour la PCR de ce gène est de 30 cycles. Un « dropping » permet d'éviter que l'amplification de RPL17 entre dans la phase « plateau » à la fin de la PCR. Cela évite aussi la compétition entre les deux couples d'amorces qui se ferait au détriment des gènes en question peu exprimés par rapport à RPL17 au début de la réaction. Pour la mise au point, plusieurs « dropping » ont été testés et l'efficacité de la PCR a été calculée afin de déterminer le nombre de cycles adéquat pour le « dropping ».

Les séquences des amorces utilisées, les températures d'hybridation, le nombre de cycles, ainsi que le numéro de cycle correspondant au dropping sont résumés dans le Tableau 6.

a) L'hème oxygénase 1

L'expression de *ho-1* chez le loup a fait le sujet d'études au sein de notre équipe pendant plusieurs années. En effet, l'ADNc de *ho-1* a été cloné et séquencé en 2008 et la

séquence publiée sur le site de NCBI sous le numéro d'accès : EF139130. Le protocole de PCR a été mis au point et l'expression de *ho-1* a été préalablement étudiée dans plusieurs tissus (Prévot-D'Alvise *et al.* 2008).

L'expression de *ho-1* est étudiée sur les huit tissus prélevés chez les poissons destinés à l'étude de l'effet de la température (le cerveau, le cœur, les branchies, le foie, la rate, les intestins, les reins et le muscle) ainsi que les trois tissus : cerveaux, foies et gonades prélevés des poissons intoxiqués par les métaux.

b) L'aromatase α et l'aromatase β

Les amorces de l'*arom α* et celles de l'*arom β* ont été choisies en suivant le protocole de Blázquez et Piferrer 2004.

L'étude de l'expression de l'*arom β* et de l'*arom α* a été réalisée respectivement sur des tissus de cerveaux et de gonades prélevés chez les poissons contaminés aux métaux lourds.

c) La glycoprotéine α , l'hormone folliculo-stimulante, sous unité β et l'hormone lutéinisante, sous unité β

Pour l'expression des gènes codant pour la FSH et la LH, nous nous sommes intéressés aux deux sous unités de chacune des hormones : la sous-unité commune aux deux hormones, la *gpa* et les deux sous-unités variables : *fsh β* et *lh β* codant respectivement pour la FSH et la LH.

L'étude de ces gènes a été menée sur de l'ARNm extraits de tissus de cerveaux prélevés des poissons intoxiqués aux métaux.

Les amorces ont été choisies en se référant aux séquences d'amorces déjà dessinées et publiées par Felip *et al.* 2008.

d) Vitellogénine

La séquence du gène de la VTG chez le loup n'est pas connue. Afin d'étudier l'expression de ce gène suite aux intoxications par les métaux nous avons commencé par faire un alignement multiple de plusieurs séquences d'ARNm de vitellogénine de plusieurs poissons disponibles sur GenBank sur plus de 5607 pb (Figure 32):

- *Oreochromis aureus* (GenBank : AF017250.1)
- *Morone saxatilis* (GenBank : HQ846510.1)
- *Morone americana* (GenBank : DQ020121.1)
- *Pagrus major* (GenBank : AB181839.1)
- *Thunnus thynnus* (GenBank : GU217572.1)
- *Mugil Cephalus* (GenBank : AB288933.1)
- *Hippoglossus hippoglossus* (GenBank : EF582607.1)
- *Verasper moseri* (GenBank : AB181834.1)
- *Fundulus heteroclitus* (GenBank : U07055.2)
- *Oryzias latipes* (GenBank : AB074891.1)

Nous avons ensuite choisi une séquence « consensus », très conservée chez toutes les espèces et on a dessiné un couple d'amorces dégénérées : Vtg₀₁ Dir et Vtg₀₁ Rev (les séquences des amorces seront détaillées dans le (Tableau 6). Nous avons commencé par tester ces amorces sur de l'ADNc de foies de loups femelles adultes (1 µl) chez qui la vitellogénine est normalement exprimée.

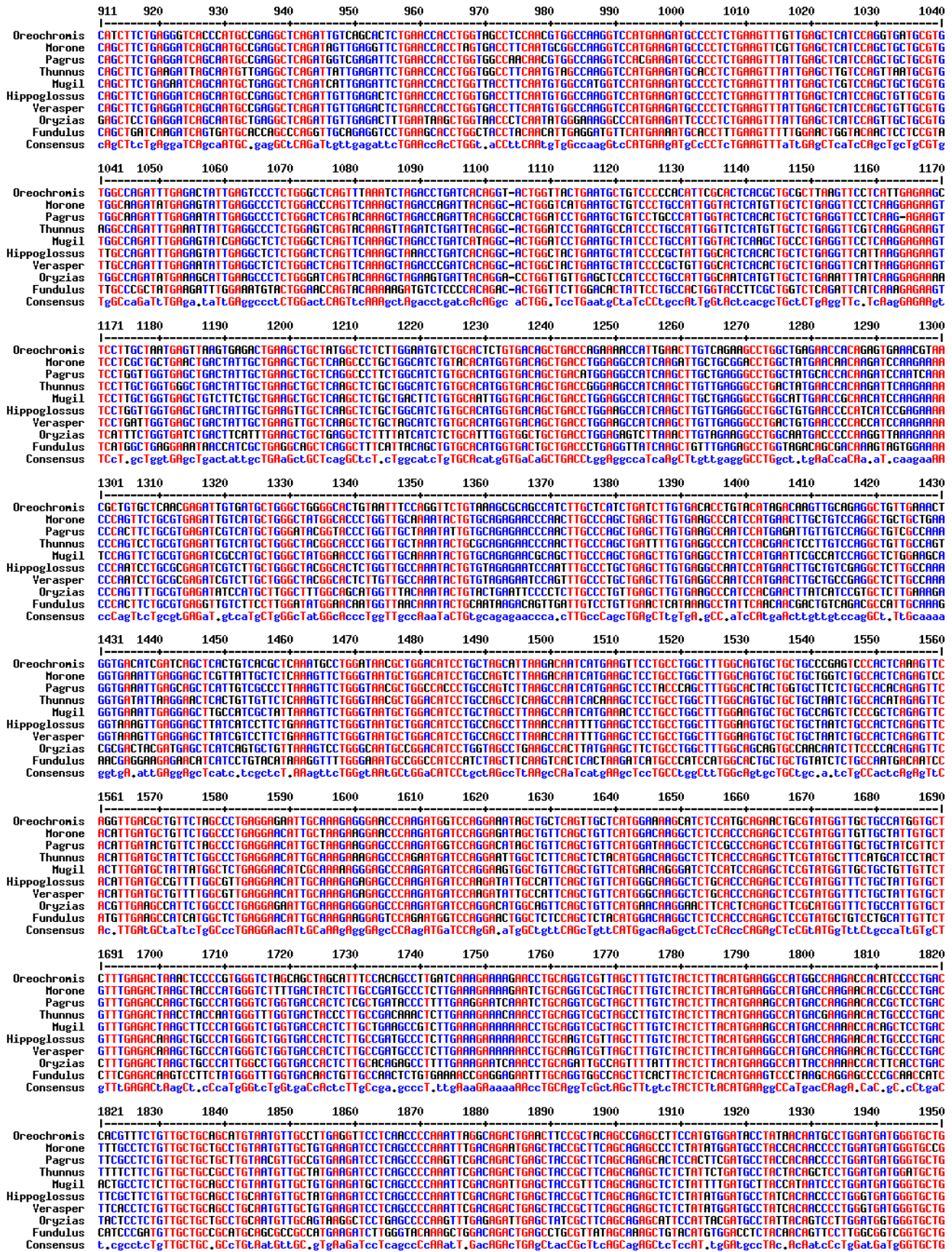


Figure 32 : Alignement des séquences d'ARNm de la vitellogénine chez 10 espèces de poissons.

Oreochromis aureus, *Morone saxatilis*, *Morone americana*, *Pagrus major*, *Thunnus thynnus*, *Mugil Cephalus*, *Hippoglossus hippoglossus*, *Verasper moseri*, *Fundulus heteroclitus*, *Oryzias latipes*. Alignement réalisé sur plus de 5607 pb, seule la zone comportant le plus de séquences conservées est représentée.

❖ Détermination des amorces spécifiques :

Nous avons réalisé une PCR sur de l'ADNc de foie de loup femelle adulte en utilisant le programme optimisé précédemment décrit. Le produit de PCR a été par la suite envoyé pour séquençage chez GATC BIOTECH. L'alignement entre la séquence *vtg* directe et la séquence *vtg* reverse nous a permis de dessiner une partie de la séquence d'ARNm de la vitellogénine chez *Dicentrarchus labrax*.

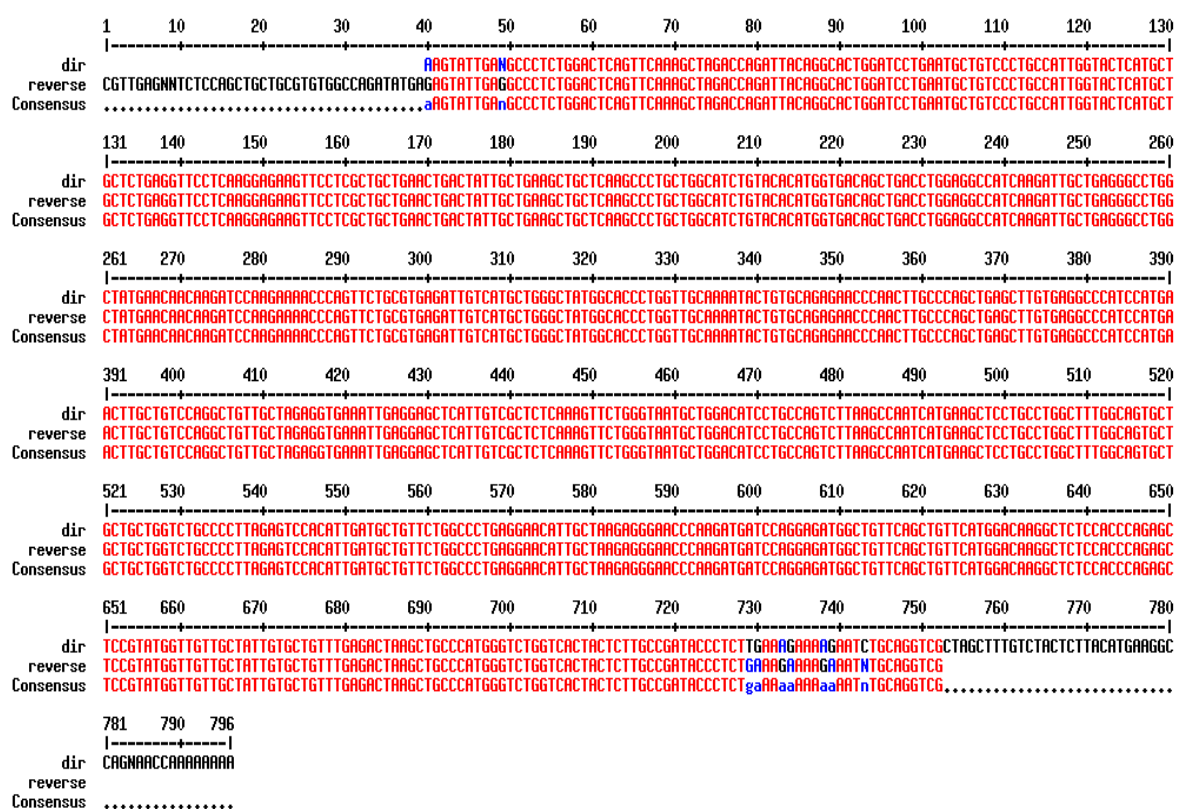


Figure 33 : Résultats du séquençage de l'ADNc de la vitellogénine à partir des amorces dégénérées chez le loup

Nous avons par la suite dessiné de nouvelles amorces : Vtg Dir et Vtg Rev que nous avons testés en suivant le protocole optimisé sur 5 individus femelles matures ce qui nous a permis de valider ce nouveau couple d'amorces. Un deuxième séquençage des amplifiats a été réalisé chez GATC Biotech afin de confirmer la séquence de la *vtg* chez le loup.

Nous avons ensuite utilisé ces amorces pour amplifier l'ADNc pour étudier l'expression de la vitellogénine dans le foie des poissons intoxiqués par les métaux.

e) Métallothionéine

Le choix des amorces a été réalisé en se basant sur le travail de [Rosalba et al. 2004](#). La mise au point du protocole d'amplification a été réalisée sur des foies d'individus qui ont été intoxiqués au Cd chez qui on s'attend à une induction de l'expression du gène *mt*.

Tableau 6 : Liste des amorces utilisées dans les réactions de polymérisation en chaîne

Gène	Amorces	Séquence (5'→3')	Taille Fragment (pb)	Tm (°C)	Nombre de cycles	Cycle Dropping (rpl17)
<i>ho-1</i>	ho-1 Dir	CCC TGA ATT TCT AGT TGC CCA TGC	201	63	30	-
	ho-1 Rev	TCC GTC AGC TCC ACG CTG TTC ATC				
<i>arom a</i>	arom a Dir	GGC AGA CTG TGC TGA TCA AA	493	59	35	5
	arom a Rev	TTC GGT ACC CTG TAG CCA TC				
<i>arom b</i>	arom b Dir	GTC GTT TCT TCC AGC CCT TC	230	59	35	5
	arom b Rev	TGA AGG TTG TGC TGT TCG AG				
<i>gpa</i>	gpa Dir	TGG ACT TAT CAA ACA TGG G	245	58	35	8
	gpa Rev	GTG GCA GTC TGT GTG GTT TC				
<i>fshβ</i>	fshβ Dir	GTC ATC CCA CCA ACA TCA G	275	60,2	35	5
	fshβ Rev	TAT GTC TCC AGG AAA GCG				
<i>lhβ</i>	lhβ Dir	GCT CAT CAA CCA GAC AGT G	286	60	37	7
	lhβ Rev	CAG GCT CTC GAA GGT TAC AG				
<i>vtg</i>	Vtg ₀₁ Dir	CGT TGA GCT CAT CCA GCT GCT G	792	62	35	-
	Vtg ₀₁ Rev	TTC TTG GTC ATG GCC TTC ATG TAA GAG				
	Vtg Dir	AGC TGC TGC GTG TGG CCA G	768			
	Vtg Rev	TGG CCT TCA TGT AAG AGT AGA C				
<i>mt</i>	MT Dir	TTT TGT TTT CAA GGT GGA ACC	432	59	30	-
	MT Rev	AGA GGT TGG TGA ACT TTG TGG				
<i>rpl 17</i>	rpl17 Dir	GGT GGT TCA TCT GGA GCC AAG TTC C	389	-	-	-
	rpl17 Rev	TTA GAG GCT ATC CGG GGC C				
<i>βactine</i>	Actine Dir	CAG AGC AAG AGA GAG GTA TCC TGA CC	895	-	-	-
	Actine Rev	ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG GAC				

4. Electrophorèse

a) Sur gel d'agarose

Les amplifiats sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5% ou 2% (selon leurs poids moléculaires) à 120 Volts. La migration est effectuée dans un tampon TBE 1X (Tris Borate EDTA – Invitrogen) et dure environ 45 min. Elle est suivie d'une coloration du gel dans un bain de TBE contenant du bromure d'éthidium (BEt, Invitrogen) qui a la propriété de s'intercaler entre les paires de bases et d'émettre de la fluorescence sous rayonnements ultraviolets. La révélation du gel est réalisée grâce à un analyseur d'images (Photo Imageur, Vilber Lourmat). La semi-quantification de l'intensité des amplifiats est réalisée ensuite grâce au logiciel Image J (Rasband 1997). Une première étape consiste à éliminer une première fois le bruit de fond en supprimant les niveaux du gris du gel. On sélectionne ensuite les bandes correspondant aux amplifiats qu'on veut quantifier puis on élimine le bruit de fond restant en délimitant avec une ligne l'aire sous la courbe de chaque pic. Le logiciel nous donne les aires sous la courbe correspondant à chaque amplifiat. La normalisation est réalisée par la suite par rapport aux gènes invariants choisis (RPL17 ou β actine).

b) Electrophorèse capillaire

Elle est réalisée grâce au QIAxcel[®], un système rapide (moins de 10 min pour la migration de 12 échantillons), de grande sensibilité (moins de 0,1 ng d'ADN/ μ l) et de très haute résolution (3 à 5 pb pour les fragments de taille inférieure à 500 pb). La migration se fait grâce à des cartouches de gel, prêtes à l'emploi, constituées de 12 micro canaux contenant le gel de migration. La migration se fait sur des microvolumes (0,1 μ l) ce qui permet une économie sur les échantillons pour d'éventuelles analyses ultérieures. L'analyse est ensuite assurée par un système de diodes émettrices et de capteurs optiques pour la détection de fluorescence. Le traitement des résultats se fait grâce au logiciel QIAxcel Screen Gel. Nous avons utilisé la cartouche « QIAxcel DNA Screening Catridge » et la méthode AM320 (voltage d'injection : 5 KV ; temps d'injection : 10 sec). Le marqueur d'alignement qu'on a utilisé était le QX 15 bp-3 kb et le marqueur de taille le 100 bp-2,5 Kb (20 ng/ μ l). Les résultats sont représentés non seulement sous forme de gels classiques mais aussi sous forme d'électrophérogrammes. Pour l'analyse semi-quantitative de l'expression des gènes, on a la possibilité de faire un appel de pic en déterminant par avance la taille des pics recherchés ainsi que le rapport entre l'intensité du signal du gène qu'on veut étudier par celui du gène invariant (RPL17 ou β actine). Cette méthode a aussi pour avantage de limiter l'exposition aux produits toxiques (BEt) lors de la révélation des gels classiques et d'éliminer les erreurs liées aux manipulations.

5. Outils statistiques

a) Etude de l'effet de la Température sur l'expression de *ho-1* au niveau des tissus

L'expression de *ho-1* a été quantifiée avec le logiciel *ImageJ* et normalisée avec l'expression de *rpl17*.

L'analyse des résultats obtenus a été effectuée en utilisant ANOVA avec le logiciel XLSTAT. L'hypothèse nulle supposant qu'il n'existe pas de différence significative entre les groupes a été rejetée pour une probabilité en dessous de 0,05. Nous avons utilisé le teste de Tukey pour déterminer les différences significatives entre deux groupes.

b) Etude de l'effet du Cd et du Pb sur l'expression des gènes le long de l'axe HHGH

L'expression des différents gènes étudiés suite à la contamination par les métaux a été quantifiée grâce au logiciel QIAxcel ScreenGel et normalisée avec l'expression de *rpl17* ou de la *βactine* selon la taille de la séquence considérée. Ne suivant pas une loi normale, l'analyse des résultats a été réalisée en utilisant un test non paramétrique, le test de Kruskal-Wallis. La détermination des différences significatives entre les différents groupes a été effectuée avec le test de Dunn. L'hypothèse nulle (aucune différence significative entre les groupes) a été rejetée pour une probabilité inférieure à 0,05.

L'analyse statistique des résultats concernant la variation de la concentration des métaux dans le foie et la recherche de corrélation entre les différents métaux ont été réalisées avec le logiciel R. L'hypothèse nulle a été rejetée pour des valeurs de p inférieures à 0,05.

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude comporte deux parties, une première portant sur l'effet de la température sur l'expression de *ho-1* et une seconde qui porte sur l'impact des métaux lourds sur l'axe HHGH chez *Dicentrarchus labrax*.

Nous commencerons ainsi par présenter les variations de l'expression de *ho-1* sous l'effet de différentes durées d'exposition à une température de 30°C au niveau de 8 tissus. Cette première partie nous permettra d'évaluer la réponse de l'organisme au stress thermique.

Nous présenterons ensuite les résultats obtenus au terme des 96h d'intoxication des loupes par deux concentrations différentes de Cd et de Pb (une première du même ordre que les concentrations environnementales et une deuxième cent fois plus élevée).

Dans cette deuxième partie nous évaluerons d'une part l'impact direct du Cd et du Pb sur la physiologie, la bioaccumulation et le niveau d'expression de certains gènes le long de l'axe HHGH, et d'autre part la capacité des poissons à répondre au stress généré par la contamination aux métaux lourds à travers l'évaluation de l'expression des métallothionéines dans le foie et de *ho-1* le long de l'axe HHGH.

I. Etude de l'effet de la température sur l'expression de *ho-1*

Dans cette étude, nous avons étudié l'expression de *ho-1* en réponse au stress thermique dans différents tissus chez *Dicentrarchus labrax* (le foie, la rate, les reins, le cœur, le cerveau, les branchies, les intestins et les muscles).

1. Dans le foie

Une heure après le début du stress thermique, nous avons constaté une augmentation de 2,5 fois de l'expression de *ho-1* par rapport au groupe témoin. D'une heure à 3 semaines, l'expression de *ho-1* a continué à augmenter pour atteindre au bout de 4 semaines, une valeur 4,5 fois plus élevée que le niveau d'expression initial ($p= 0,005$), mettant en évidence la réponse positive de *ho-1* à la variation de la température et qui est durée-dépendante (Figure 34 et Figure 35).

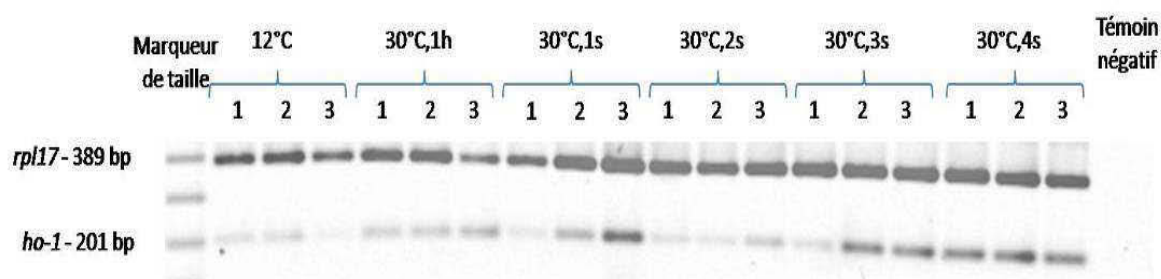


Figure 34 : Résultat d'électrophorèse des produits de PCR de *ho-1* chez *Dicentrarchus labrax* suite à l'augmentation de la température.

h : heures, s : semaine, pb : paire de bases, 1, 2, 3 : numéro de l'individu.

Dans une étude précédente réalisée au sein de notre laboratoire dans le cadre des travaux de thèse de [Pierre et al. 2011](#), on a étudié les effets de l'augmentation de la température (dans les mêmes conditions expérimentales que dans notre étude actuelle sur *ho-1*) sur l'expression de deux autres gènes impliqués dans les processus d'acclimatation dans le foie : *wap65-1* (une isoforme de la «warm temperature acclimation-related 65 kDa protein») et *hsp70* (heat shock protein qui agit comme protéine chaperon et assiste les protéines de transport nouvellement synthétisées ([Rössner, Binková, et Šrám 2003](#))). Les résultats obtenus pour ces deux gènes, en plus des résultats que nous avons obtenus pour *ho-1* sont illustrés dans la Figure 36.

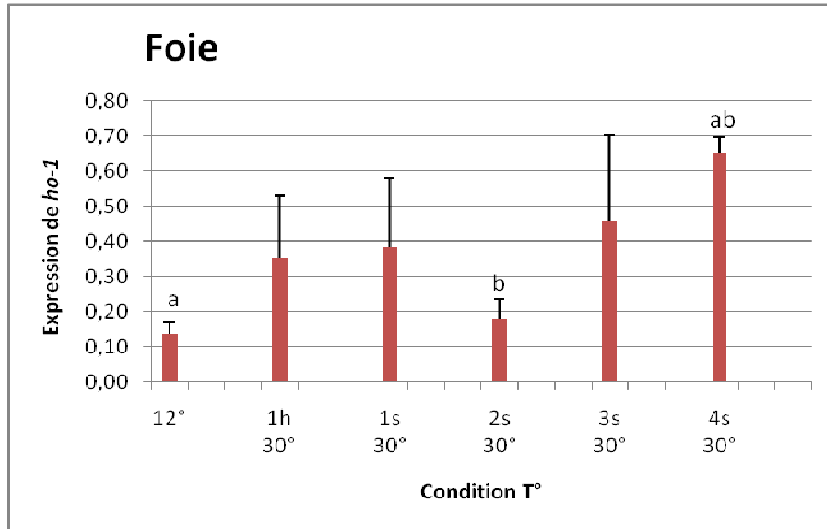


Figure 35 : Expression de *ho-1* dans le foie chez *Dicentrarchus labrax* suite à un stress thermique.

Les taux relatifs d'ARNm (ratio gène étudié/gène invariant) de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Tukey).

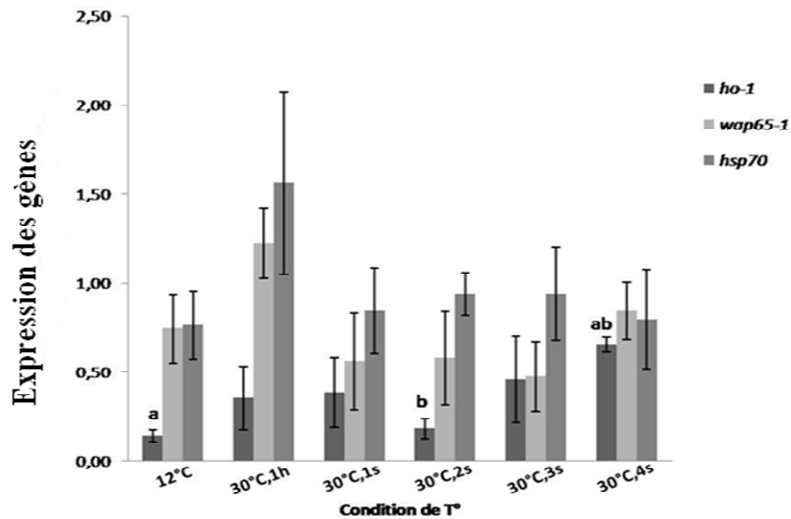


Figure 36 : Expression de *ho-1*, *wap65* et *hsp70* dans le foie chez *Dicentrarchus labrax* suite à l'augmentation de la température de l'eau.

L'expression de *wap65* et *hsp70* a été préalablement déterminée et publiée (S Pierre *et al.* 2011). Les taux relatifs d'ARNm de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Tukey).

Nos résultats pour *wap65-1* et *hsp70* ont montré des similitudes avec ceux observés dans la présente étude sur *ho-1*. En effet, ces trois gènes sont exprimés dans le foie à 12°C en dehors de tout stress thermique. *ho-1* présente un niveau d'expression beaucoup plus bas que celui de *wap65-1* et de *hsp70* (5 fois moins). Ceci paraît plausible puisque l'expression de *ho-1* n'est normalement induite que dans des conditions de stress cellulaires contrairement à *ho-2* et *ho-3* qui, eux, sont exprimés de manière constitutive dans les cellules (Rössner, Binková, et Šrám 2003). Après le début du traitement thermique, nous avons noté une augmentation de 2 à 2,5 fois de l'expression des trois gènes et cela dès une heure d'exposition à 30°C. Au-delà d'une heure, l'expression de *ho-1* a continué d'augmenter (significativement à 4s), alors que celles de *wap65-1* et de *hsp70* a diminué et a retrouvé des valeurs du même ordre que celles trouvées chez les témoins.

Les trois gènes *wap65-1*, *hsp70* et *ho-1* semblent impliqués chez le loup dans la réponse au stress thermique. *wap65-1* et *hsp70* seraient impliqués à des stades précoces de la réponse à l'hyperthermie, alors que la réponse de *ho-1* est maintenue plus longtemps et atteint des valeurs plus élevées que le niveau d'expression de *ho-1* en dehors du stress thermique.

Dans une étude menée chez le rat, Raju et Maines 2002 ont également rapporté une augmentation de l'expression de *ho-1* dans le foie suite à un traitement hyperthermique (42°C, 20 min). En revanche, les variations de l'expression de *ho-1* observées dans cette étude ne reproduisent pas le même schéma de variation que dans la notre. En effet, une expression maximale de *ho-1* a été notée dès la 1^{ère} heure après le stress thermique avec des valeurs 20 à 40 fois plus grandes que celles des témoins. Six heures après l'exposition au traitement hyperthermique, *ho-1* reprends des niveaux d'expression du même ordre que ceux du groupe contrôle.

2. Dans la rate

Au niveau de la rate, nous avons constaté, au terme de la 4^{ème} semaine de stress thermique, une diminution significative ($p= 0,014$) de l'expression de *ho-1* (Figure 37). Cette diminution se traduit par des valeurs inférieures au niveau d'expression de base observées dans le groupe de poissons témoins (12° C).

Dans la rate, en dehors du stress, l'expression de *ho-1* est semblable à celle rapportée par une autre étude chez la même espèce (Prévot-D'Alvise *et al.* 2008). Parmi tous les organes étudiés, l'expression initiale de *ho-1* est la plus importante dans la rate où a lieu principalement la dégradation de l'hémoglobine et qui nécessite de manière continue l'induction de *ho-1* (Braggins *et al.* 1986; Ryter, Alam, et Choi 2006).

Suite au stress thermique, on a relevé une diminution remarquable de l'expression de *ho-1* dans la rate. Il a pourtant été rapporté par d'autres études, une sur-expression significative de *ho-1* dans la rate suite à l'exposition à d'autres type de stress telle que l'exposition à des agents hémolytiques (l'aniline, la phénylhydrazine ou la phénacétine) chez le rat (Rokushima *et al.* 2007; J. Wang *et al.* 2010).

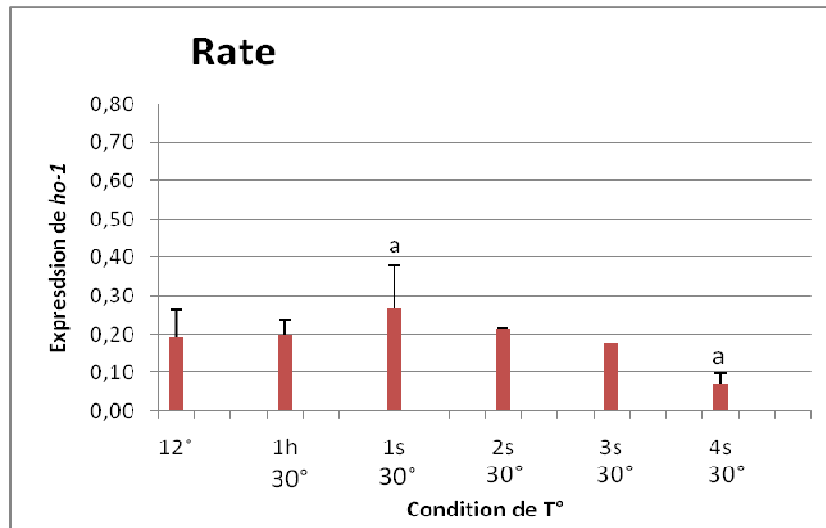


Figure 37 : Expression de *ho-1* dans la rate chez *Dicentrarchus labrax* suite à l'exposition au stress thermique.

Les taux relatifs d'ARNm de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Tukey).

3. Dans les reins

Une importante baisse de l'expression de *ho-1* a également été observée au niveau des reins (Figure 38). Cette diminution est apparue plus tôt que celle constatée dans la rate bien que dans les deux organes le niveau d'expression initial en dehors du stress thermique était similaire. En effet, dès la première heure d'augmentation de la température, l'expression de *ho-1* a atteint des valeurs nulles et a été maintenue à ce niveau jusqu'à la fin de l'expérience.

Dans la même étude réalisée par [Raju et Maines 2002](#) sur les rats, une induction de l'expression de *ho-1* a été observée dans les reins contrairement à notre étude. Les différences dans les températures employées, dans la durée de l'exposition ainsi que l'espèce animale expliquent sans doute une telle divergence dans les résultats ([Raju et Maines 2002](#); [Hachfi et al. 2012](#)).

La contribution de *ho-1* dans la cytoprotection rénale a été démontrée depuis longtemps ([Pimstone et al. 1971](#)) et même si *ho-1* est faiblement exprimé à ce niveau dans les conditions normales, son expression est rapidement induite au cours des lésions rénales. En effet, HO-1 est impliqué dans la protection contre les lésions rénales et même dans la prévention et la réversibilité des fibroses rénales ([Correa, Amano, et Câmara 2012](#); [Costa et al. 2009](#); [Courtney et Maxwell 2008](#)).

Très peu de travaux se sont intéressés au mode de variation de l'expression de *ho-1* en réponse au stress thermique dans les reins.

Une étude portant sur l'effet de l'hypoxie sur l'expression de *ho-1* chez le poisson rouge (1% O₂ pendant 24h) a montré qu'avant l'exposition des poissons au stress, le niveau transcriptionnel de *ho-1* au niveau des reins était déjà élevé, comme c'est le cas dans notre étude. Après l'induction du stress, une induction importante de l'expression de *ho-1* a été observée dans les reins, précisément dans les zones postérieures (7,8 fois plus élevée que chez les témoins) (D. Wang *et al.* 2008).

Etant donné que l'hyperthermie a souvent été associée à une induction d'hypoxie dans les tissus et même à une chute dans les activités ventilatoires et circulatoires chez les poissons (Heise *et al.* 2006; Pörtner 2002), on s'est plutôt attendu à une induction de *ho-1* à ce niveau. Mais cette induction n'a pas eu lieu.

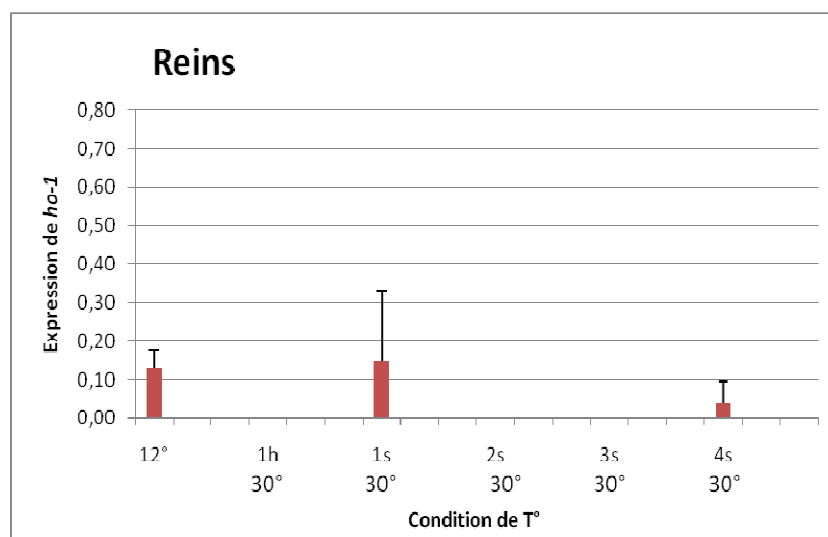


Figure 38 : Expression de *ho-1* dans les reins chez *Dicentrarchus labrax* suite à l'exposition au stress thermique.

Les taux relatifs d'ARNm de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type (Test de Tukey).

4. Dans l'intestin

Au niveau intestinal, nos résultats ont montré que *ho-1* est exprimé dans ce tissu en dehors du stress. Son expression a été maintenue au même niveau initial même après induction du stress thermique et quelque soit la durée du traitement (du même ordre que l'expression de *ho-1* chez le groupe contrôle). Nous n'avons noté aucun effet statistiquement significatif de la température sur l'expression de *ho-1* dans ce tissu (Figure 39).

Nos résultats sont en accord avec l'étude menée par Wang *et al.* 2008 sur le poisson rouge et dans laquelle *ho-1* était initialement exprimé dans les intestins avant l'induction du

stress. L'exposition des poissons rouges au stress hypoxique n'a pas induit de changement dans l'expression de *ho-1* dans ce tissu, comme c'est le cas pour le stress thermique.

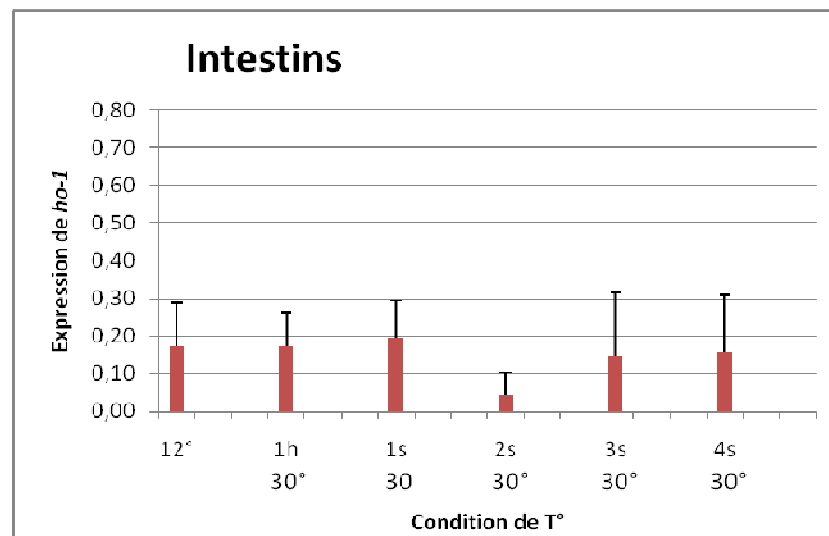


Figure 39 : Expression de *ho-1* dans les intestins chez *Dicentrarchus labrax* suite à l'exposition au stress thermique.

Les taux relatifs d'ARNm de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type (Test de Tukey).

5. Dans le cœur, le cerveau, le muscle et les branchies

Au niveau du reste des organes étudiés (le cœur, le cerveau, le muscle et les branchies), le niveau d'expression de *ho-1* a été quasiment nul à l'état physiologique normal (groupe 12°) et n'a à aucun moment été affecté par l'augmentation de la température quelque soit la durée de l'exposition (Figure 40).

Au niveau cardiaque, il a déjà été démontré que *ho-1* est exprimé dans cet organe et qu'il joue un rôle primordial dans la régulation de la pression sanguine à travers la production de monoxyde de carbone. Une sur-expression de *ho-1* a été observée après l'administration de l'angiotensine comme réponse adaptative aux lésions cardiaques induites par ce traitement. Le rôle cardioprotecteur de *ho-1* a également été démontré chez des souris « knockout » transgéniques maintenues dans des conditions d'hypoxie (Yet *et al.* 1999). En revanche d'autres études ont rapporté que *ho-1* ne s'exprime pas dans le cœur chez *Dicentrarchus labrax* en conditions normales et que même le choc thermique n'induit pas sa transcription dans ce tissu.

Chez les rats, il a été démontré que l'expression de *ho-1* au niveau du cœur était induite par le stress thermique (42°C, 20 min) ce qui s'oppose à nos résultats pour cet organe où aucune

expression de *ho-1* n'a été observée le long de l'expérience (Raju et Maines 2002). Comme pour les reins, nous pensons que cela soit lié aux différences de température, la durée d'exposition et de l'espèce animale utilisée.

En ce qui concerne le cerveau, l'absence de toute expression de *ho-1* avant et après le stress thermique reviendrait sans doute au fait que *ho-1* ne représente pas l'isoforme principale de l'hème oxygénase dans ce tissu même s'il existe des études chez le rat qui ont montré une expression de ce gène dans le cerveau après traitement hyperthermique (Ewing et Maines 1991) et qui ont même identifié plus tard le stress thermique comme étant le seul agent de stress qui pourrait augmenter la transcription de *ho-1* dans ce tissu (Ewing, Haber, et Maines 2012). Mais bien qu'une expression de *ho-1* ait aussi été rapportée chez *Dicentrarchus labrax* par Prévot-D'Alvise *et al.* 2008, *ho-2* reste de loin l'isoforme prédominante de l'hème oxygénase dans ce tissu. Malgré un effet neuroprotecteur et immunologique déjà mis en évidence, le rôle de *ho-1* dans ce tissu reste mal connu (Ahmad, Zhuang, et Doré 2006; Maines et Gibbs 2005).

Au niveau des branchies, nos résultats s'opposent à ceux de D. Wang *et al.* 2008 qui ont montré qu'en dehors de tout stress l'expression de *ho-1* au niveau des branchies chez le poisson rouge était initialement élevée. Nos résultats restent divergents après induction du stress. En effet, après exposition des poissons au stress hypoxique, D. Wang *et al.* 2008 ont noté une sur-expression de *ho-1* dans ce tissu alors que nous n'avons noté aucun effet du stress thermique au niveau des branchies.

L'ensemble de nos résultats, montrent qu'en dehors de toute situation de stress, *ho-1* est exprimé préférentiellement au niveau du foie, de la rate, des reins, et des intestins. Suite à l'exposition des poissons au stress thermique, la réponse de *ho-1* à l'augmentation de la température dépend non seulement du tissu mais aussi de la durée du stress thermique. En effet, l'exposition des poissons à une température égale à 30°C a été suivie d'une sur-expression de *ho-1* au niveau du foie et de sa sous-expression au niveau de la rate au bout de 4 semaines de traitement. Avant ce terme (4 semaines), la température n'a pas engendré d'effets significativement différents des témoins. Une sous-expression de *ho-1* au niveau des reins a également été observée. Cette dernière survient plus rapidement que dans la rate. Au niveau des intestins, bien que *ho-1* soit initialement exprimé dans ce tissu (à 12°C), il ne semble pas répondre au stress thermique.

D'autres études semblent nécessaires afin d'étudier les mécanismes qui sont à l'origine de cette réponse différente d'un tissu à un autre.

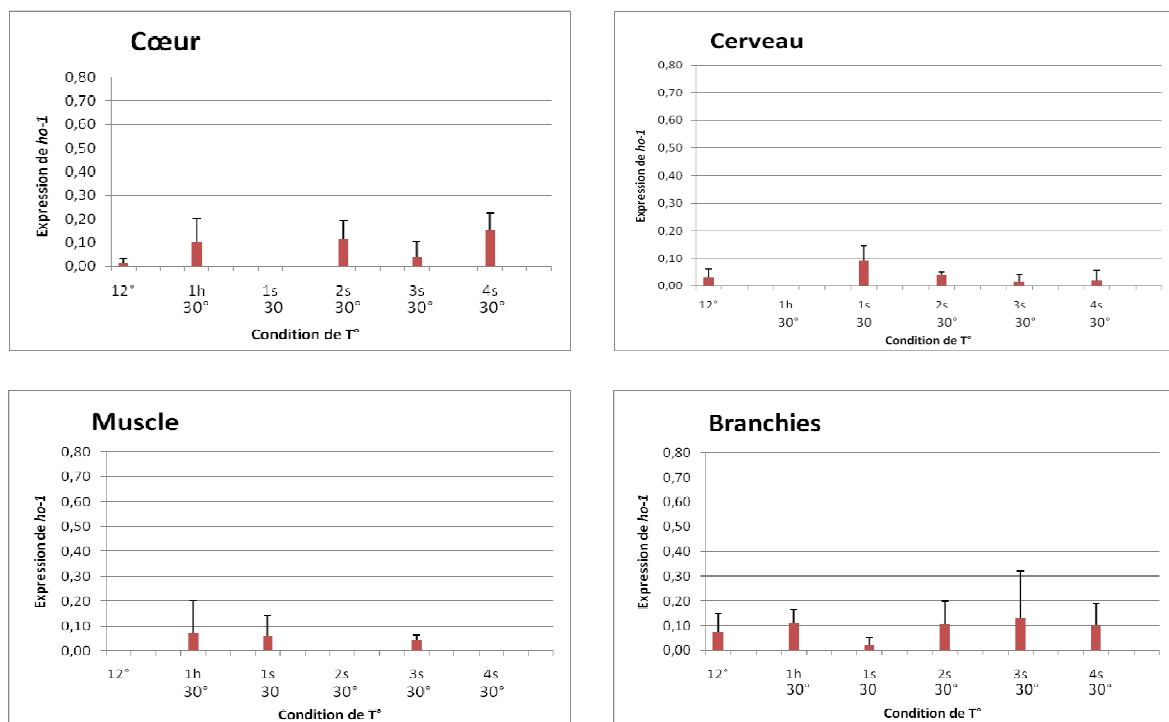


Figure 40 : Expression de *ho-1* dans le cœur, le cerveau, le muscle, les branchies chez *Dicentrarchus labrax* suite à l'exposition au stress thermique.

Les taux relatifs d'ARNm de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne \pm erreur type (Test de Tukey).

II. Etude de l'effet des métaux lourds sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique

1. Impacts physiologiques

a) Mortalité

Lors de la période de contamination des poissons fixée à 96h, nous avons eu un taux de mortalité de 8% parmi les 60 poissons utilisés dans notre expérimentation. Deux poissons appartenaient au groupe Cd1 (taux de mortalité dans le groupe Cd1 = 0,16%), la mort est survenue environ 48h après le début de l'intoxication. Un autre poisson appartenant au groupe Pb2 (taux de mortalité dans le groupe Pb2 = 0,08%) est mort environ 72h après le début du traitement. Les deux derniers poissons faisaient partie du groupe Pb1 (taux de mortalité dans le groupe Pb1 = 0,16%) et sont morts quelques heures avant la fin de la durée de l'intoxication (à environ 94h).

Les poissons morts ne présentaient pas de lésions apparentes pouvant être dues à une maladie quelconque. Les taux de mortalité étaient similaires dans les deux groupes traités (traitement avec les concentrations environnementales et traitement avec les concentrations 100 fois plus élevées). Ces données vont dans le sens d'une absence de lien de causalité entre les intoxications et la mortalité chez le loup.

b) Croissance

La taille et le poids des poissons sont illustrés par les Figure 41 et Figure 42.

Les concentrations utilisées lors de nos expérimentations ne semblent à aucun moment affecter la taille ou le poids des poissons traités au Cd et au Pb et même si à première vue on pourrait penser à une légère diminution du poids chez les poissons traités, cette différence ne s'est révélée statistiquement significative avec aucune des doses administrées de métaux. Cela est logique puisque le délai des intoxications, après lequel les poissons ont été sacrifiés, est court pour pouvoir observer un effet visible sur la croissance des lousps à ce stade de développement.

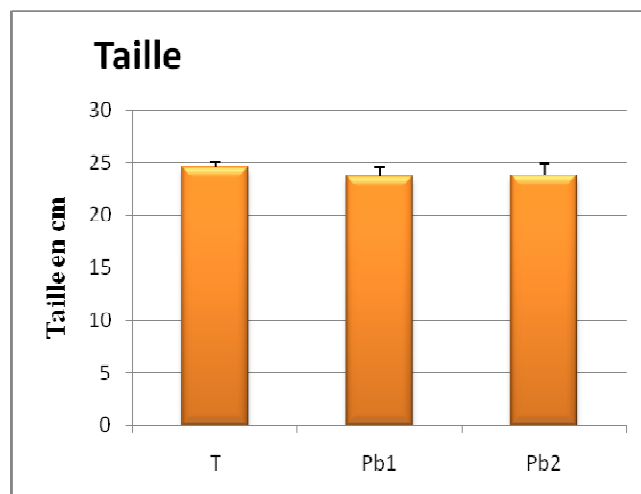
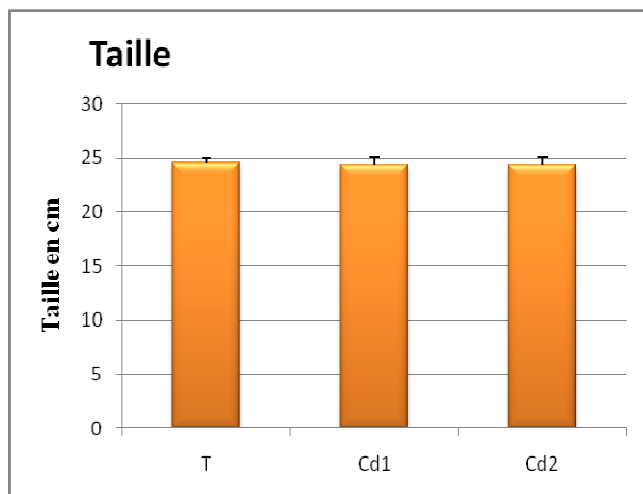


Figure 41 : Taille des loups après intoxication (96h) par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).

Les données sont exprimées en cm et représentées en moyenne ± erreur type. Test de Kruskal-Wallis et Dunn.

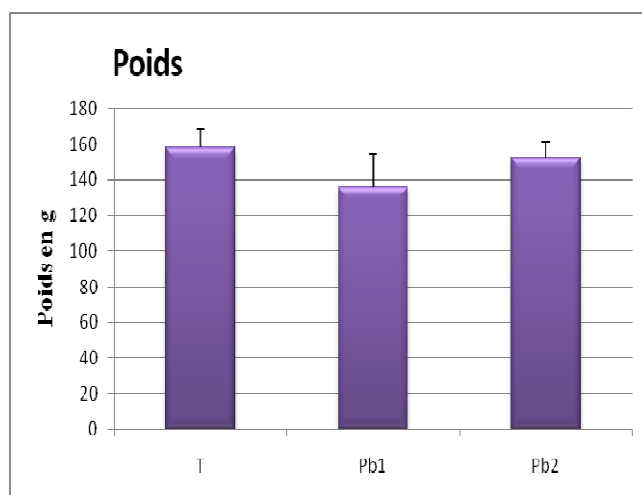
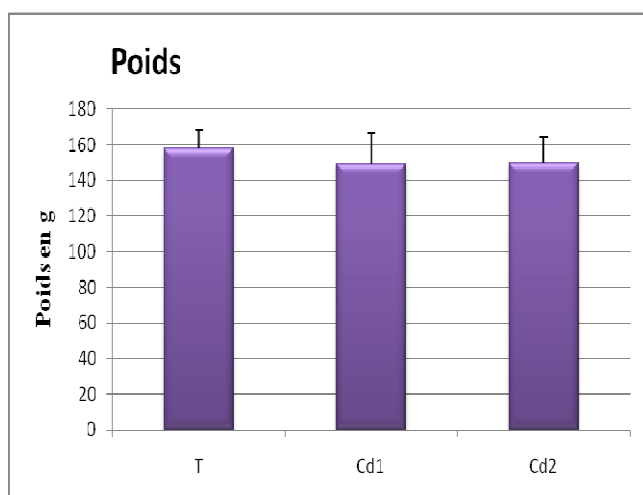


Figure 42 : Poids des loups après intoxication (96h) par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).

Les données sont exprimées en g et représentées en moyenne ± erreur type. Test de Kruskal-Wallis et Dunn.

2. Bioaccumulation métallique au niveau du foie

Dans cette étude, nous avons choisi d'évaluer la bioaccumulation du Cd et du Pb au niveau du foie, connu pour être l'organe préférentiel pour l'accumulation de plusieurs métaux lourds et le lieu de détoxification.

Les teneurs du Cd mesurées dans le foie sont représentées sous forme de graphiques (Figure 43) ainsi que celles du Pb (Figure 44).

Nos résultats ont montré une nette augmentation, par rapport aux témoins, des teneurs en Cd et en Pb dans les foies des poissons intoxiqués respectivement par le Cd et le Pb.

Nous avons observé chez le groupe de poissons intoxiqués au Cd une augmentation significative de la teneur en Cd du foie chez les poissons contaminés par 0,5 µg/l ($p= 0,049$) et aussi chez les loups traités par 50 µg/l ($p= 0,013$).

Nos résultats confirment les données sur le Cd dans la littérature décrivant le foie comme le principal organe de stockage de ce métal. En effet, une fois absorbé, le Cd est véhiculé par l'hémoglobine vers le foie où il est chélaté par les métallothionéines et stocké. Les MT réduisent ainsi sa fraction libre responsable de l'effet toxique du métal.

En ce qui concerne les poissons intoxiqués au Pb, la bioaccumulation de ce métal au niveau du foie n'a été significativement augmentée que chez le groupe intoxiqué par la concentration la plus élevée de Pb, 100 µg/l et chez qui la teneur en Pb du foie a plus que doublé par rapport aux poissons non contaminés ($p= 0,026$).

A faible concentration (Pb1), les teneurs en Pb du foie étaient semblables à celles mesurées chez les témoins. Effectivement, une fois à l'intérieur de l'organisme le Pb est préférentiellement dirigé via le sang vers les tissus osseux (environ 90%) et seulement 5 à 10 % sont stockés dans d'autres organes y compris le foie (INERIS 2003). A cela s'ajoute la faible affinité des métallothionéines au Pb par rapport à d'autres métaux comme le Cd. Cela explique donc la raison pour laquelle la bioaccumulation du Pb dans le foie n'a été considérablement augmentée qu'avec une concentration 100 fois plus élevée que la première.

La teneur en Pb et en Cd du foie retrouvée est donc d'autant plus importante que les concentrations de Cd et de Pb utilisées lors des intoxications sont élevées (Cd2 et Pb2).

Nous soulignons le fait que la majorité des travaux ont recours à des modes d'intoxication qui diffèrent du notre (le plus souvent par injections intrapéritonéales) ce qui rend difficile la comparaison de nos résultats à ceux rapportés par la littérature.

Etant donné que la toxicité de certains métaux comme le Cd est connue pour être liée à la perturbation de l'équilibre d'autres métaux présents à l'intérieur de l'organisme, nous nous sommes également proposés d'étudier la teneur du foie en d'autres métaux naturellement présents dans l'organisme comme : le cuivre, le zinc, l'arsenic, le fer, le cobalt, le manganèse.

L'analyse de nos résultats représentés dans le Tableau 7, a montré que, mis à part le Cd et le Pb, d'autres métaux ont présenté eux aussi une augmentation, très importante pour certains de leur bioaccumulation au niveau hépatique.

En effet, nous avons constaté une augmentation très importante de la concentration de l'As dans le foie des poissons traités ainsi que celle du Mn et du Fe. La teneur en Mn par exemple a été multipliée par 1,5 chez les poissons traités par Cd1 et par 1,7 chez ceux traités par Pb1. La concentration du Fe dans le foie a plus que doublé chez les lous contaminés par Pb1.

La concentration du Zn dans le foie elle, n'a présenté d'augmentation significative que chez les poissons traités par le Cd à 50 µg/l ($p=0,049$) et chez ceux contaminés par 1 µg/l de Pb. On note tout de même une tendance à l'augmentation de la bioaccumulation du Zn. Les teneurs en Co et en Cu du foie n'ont par contre pas changé.

Nous avons également constaté une diminution de la teneur en Pb dans le foie chez les poissons traités par 0,5 µg/l de Cd1 ($p=0,021$) alors que la concentration du Cd, dans le foie des poissons traités au Pb, n'apas été changée (**Test de Kruskal-Wallis et Dunn**).

Cela nous a amené à rechercher s'il existe des corrélations entre la teneur des métaux étudiés et la concentration des autres métaux dans le foie. Effectivement nous avons pu démontrer :

- Une corrélation positive entre la concentration du Cd et celle de l'As ($p=7,472^{-06}$ et $r=0,711$) et une corrélation positive entre la concentration du Cd et la concentration de Zn ($p=5,434^{-05}$ et $r=0,659$) chez les poissons traités au Cd
- Une corrélation entre la concentration du Pb et celle du Zn chez ceux traités au Pb ($p=0,0031$ et $r=0,535$) chez les poissons traités au Pb.

De telles interactions entre les métaux ont déjà été rapportées dans la littérature ([Pierre 2009](#)). Cependant le nombre d'études dans ce contexte est très réduit et les mécanismes à l'origine de ce phénomène restent mal connus. Les résultats que nous avons obtenus représentent des résultats préliminaires ; nous ne sommes pas en mesure d'identifier les mécanismes qui pourraient être à l'origine de ces changements ou qui pourraient expliquer les interactions observées entre ces métaux.

Pour le cadmium, il a déjà été démontré un effet protecteur du zinc contre la toxicité du Cd chez le rat ([El Heni et al. 2008](#); [Rogalska, Pilat-Marcinkiewicz, et Brzóska 2011](#)). Ce qui pourrait expliquer en partie les changements des teneurs du foie en Zn chez les poissons traités au Cd. Mais mis à part le zinc, nous ne pouvons pas apporter d'explications sur l'origine de ces variations.

Nous ne savons pas si ces métaux sont impliqués dans le processus de détoxification de l'organisme et mobilisés pour faire face à cette intoxication ou si au contraire l'intoxication par le Cd ou le Pb perturbe l'équilibre d'autres métaux, un déséquilibre qui contribuerait à l'effet toxique du métal en question.

Les résultats obtenus montrent d'une part, l'intérêt de compléter nos analyses chimiques par la biologie moléculaire (par l'étude de l'expression de gènes : *fshβ*, *lhβ*, *gpa*, *arom b*, *arom a*, *mt*, *vlg* et *ho-1*) afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu lors des intoxications par les métaux et d'autre part, l'importance d'étudier les interactions pouvant exister entre les métaux lors d'études ultérieures.

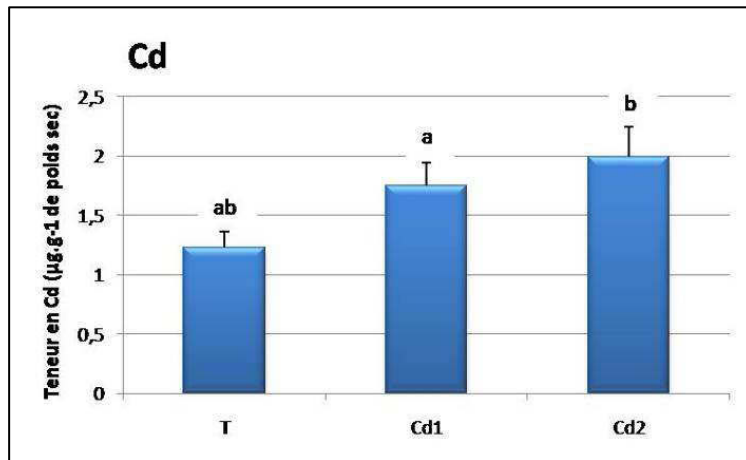


Figure 43 : Teneur en Cd dans le foie chez *Dicentrarchus labrax* après intoxication par deux concentrations différentes Cd (0,5 et 50 µg/l).

Les données sont exprimées en µg/g (foie sec) et représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

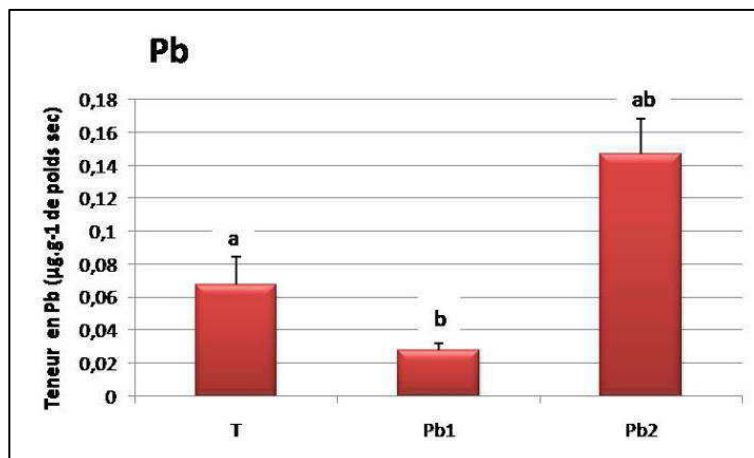


Figure 44 : Teneur en Pb dans le foie chez *Dicentrarchus labrax* après intoxication par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l).

Les données sont exprimées en µg/g (foie sec) et représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

Tableau 7 : Variations de la teneur en métaux dans le foie suite aux contaminations par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l).

Les données sont représentées en moyenne et exprimées en µg/g de foie sec. Les lettres indiquent des différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (P<0,05) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

	Co	Cu	Zn	As	Fe	Mn
Témoins	0,102	443,660	98,714	4,471	81,805	3,784
Cd1	0,119	522,858	122,883	6,133	153,143	5,872
Cd2	0,106	546,124	124,512	6,198	157,016	5,505
Pb1	0,111	480,270	117,983	6,006	169,223	6,433
Pb2	0,109	426,063	105,429	5,560	147,294	5,250

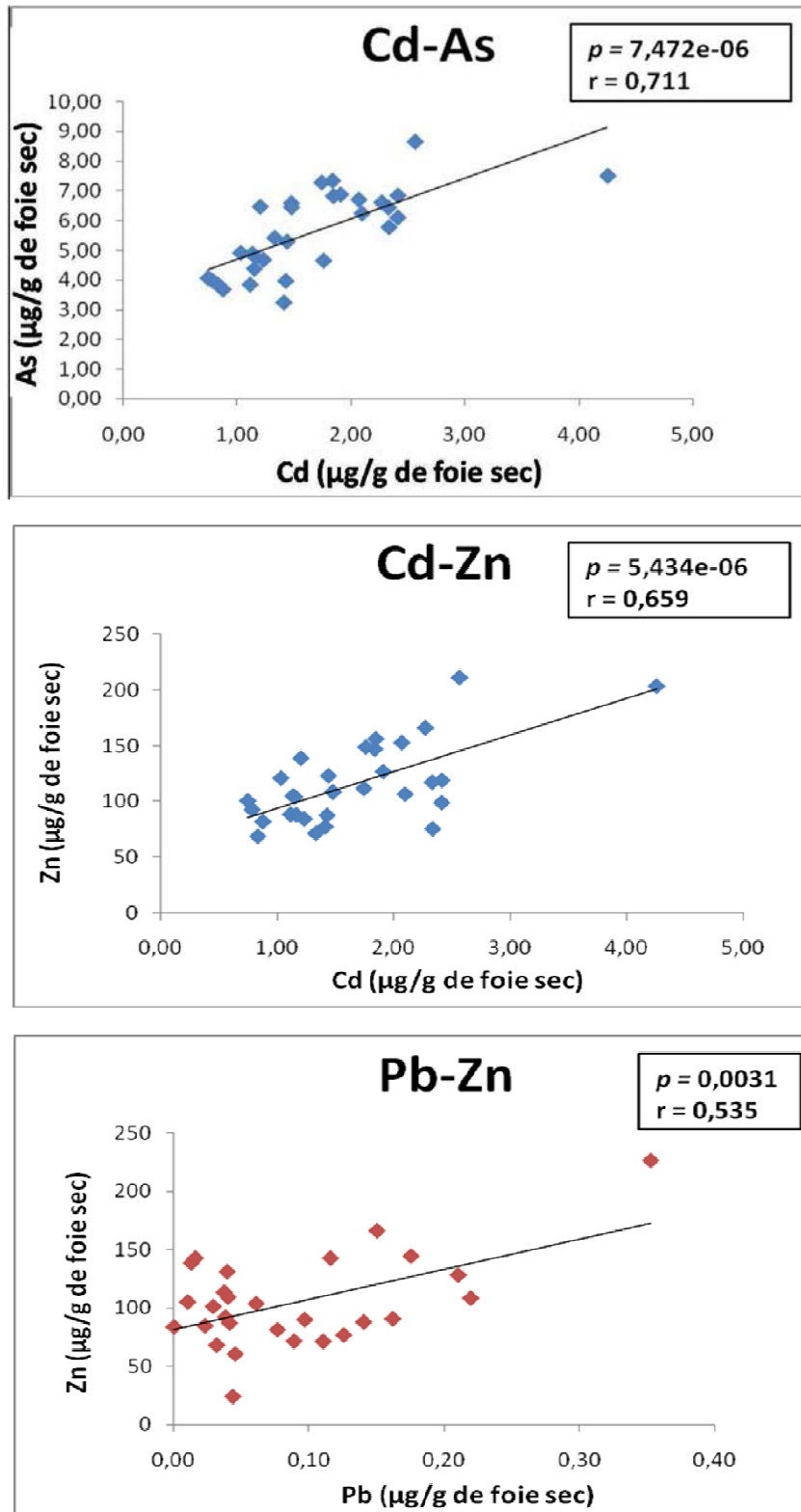


Figure 45 : Corrélations entre les teneurs en : Cd et As ; Cd et Zn ; Pb et Zn dans le foie
 Les concentrations sont données en µg/g de foie sec. (logiciel R)

3. Indice gonado-somatique

Considéré comme l'un des moyens les plus simples pour déceler un dysfonctionnement au niveau des gonades, nous nous sommes proposés dans cette étude d'évaluer la variation du GSI après intoxication des loups par le Cd et le Pb.

Nous n'avons noté aucune variation significative du GSI ni chez les poissons intoxiqués par les faibles concentrations des métaux (Cd1 et Pb1) ni chez ceux traités par les concentrations 100 fois plus élevées (Cd2 et Pb2) (Figure 46). Ces concentrations bien que très élevées ne semblent pas suffisantes pour déclencher un dysfonctionnement visible au niveau gonadique et ne semblent pas donc avoir une toxicité directe sur les cellules germinales à ce stade de l'expérience. On ne peut cependant exclure que le Cd et le Pb puissent avoir un effet indirect à long terme sur le fonctionnement gonadique via la perturbation de l'axe HHGH et qui aurait nécessité plus de temps (plus de 96h) pour que les effets sur les gonades deviennent visibles.

On peut également penser que la forte bioaccumulation du Cd et du Pb (décrite dans le paragraphe précédent) témoigne d'une détoxification « efficace » de l'organisme de ces deux métaux. Cette réponse au stress aurait donc pu protéger les gonades de l'effet toxique du Cd et du Pb et prévenir les lésions gonadiques qui auraient pu engendrer une réduction du GSI.

L'étude de l'expression de certains gènes le long de l'axe HHGH, nous apportera certainement des réponses à ces hypothèses et nous renseignera plus sur les mécanismes impliqués dans la toxicité du Cd et du Pb.

Si l'axe HHGH est affecté par les métaux, on pourra confirmer que l'effet toxique du Cd et du Pb est central (hypothalamus-hypophyse) et non périphérique (les gonades). Cela expliquerait la raison pour laquelle nous n'avons pas observé de modification du GSI après 96h d'intoxication. Cependant, il aurait pu y avoir une réduction du GSI avant de là de 96h car elle aurait pu nécessiter plus de temps pour s'installer au cas où l'effet des métaux ne se fait pas directement sur les gonades.

Dans le cas contraire (pas d'effets observés au niveau de l'axe HHGH), la conservation de GSI normal serait plutôt le résultat de la défense de l'organisme et de sa capacité à répondre au stress causé par les métaux.

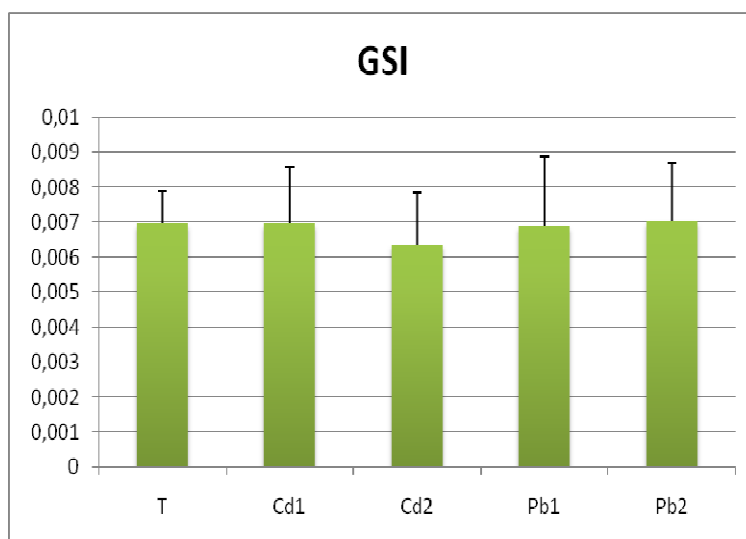


Figure 46 : Variation du GSI chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par différentes concentrations de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l). Les données sont représentées en moyenne ± erreur type (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

4. Niveau d'expression de gènes représentatifs de l'axe

HHGH

Il a déjà été démontré dans la littérature que les PE sont capables d'altérer l'expression normale des gènes le long de l'axe HHGH. Cette altération peut être directe par la liaison à des ERE ou des ARE, ou aussi indirecte à travers des mécanismes compensatoires survenant suite à l'impact des PE sur d'autres niveaux de l'axe HHGH mais qui se traduisent à la fin par une modification du niveau transcriptionnel de certains gènes. Un grand nombre de gènes situés à différents niveaux de l'axe HHGH peuvent être la cible des PE. De ce fait, nous nous sommes proposés d'étudier plusieurs gènes de l'axe HHGH : *fshβ*, *lhβ*, *gpa* et *arom b* dans le cerveau, *arom a* dans les gonades, *mt* et *vtg* dans le foie. Cette étude nous permettra d'avoir une vision globale sur la réponse de l'axe à la contamination par les métaux et d'étudier les interactions entre les différents niveaux de l'axe.

Nous avons regroupé l'ensemble des variations de l'expression des gènes sélectionnés le long de l'axe HHGH, au terme de l'intoxication des loups par les différentes concentrations de Cd (0,5 et 50 µg/l) et de Pb (1 et 100 µg/l) dans le Tableau 8.

a) Dans le cerveau

Chacune des hormones gonadotrophines se compose de deux sous-unités, une sous-unité commune, la *Gpa* et une sous-unité variable *FSHβ* et *LHβ*, ces sous-unités sont respectivement codées par les gènes *gpa*, *fshβ* et *lhβ*. Dans cet organe, nous nous sommes intéressés à l'effet du Cd et du Pb sur l'expression de ces gènes en plus du gène *arom b*. Les variations d'expression de ces gènes dans le cerveau sont respectivement illustrées dans la Figure 47 et la Figure 48.

Les résultats obtenus chez les poissons intoxiqués par le Cd montrent une tendance à l'augmentation du niveau de transcription de *fshβ*, de *lhβ*, de *gpa* chez le groupe qui a reçu 50 µg/l, sans pour autant qu'elle soit statistiquement significative en comparaison avec le groupe contrôle. En revanche, nous notons une différence significative de l'expression de *fshβ* et de *gpa* entre les poissons traités par 0,5 µg/l de Cd et ceux traités par 50 µg/l de Cd ($p = 0,049$ et $0,042$ respectivement).

Si cette augmentation de l'expression de ces gènes se traduisait par des niveaux protéiques plus élevés, cela pourrait aboutir à une stimulation de la stéroïdogenèse au niveau gonadique et à l'augmentation par la suite des taux de stéroïdes endogènes circulants.

Chez les poissons traités par le Pb, les gènes codant pour les GtHs ne semblent pas être affectés par les intoxications malgré une légère tendance à la sur-expression de *fshβ* et *lhβ* chez les loups avec 1 µg/l de Pb. Néanmoins, cette différence n'a à aucun moment été significative et on retrouve chez les poissons traités par 100 µg/l de Pb le même niveau d'expression initial (retrouvés chez les témoins). Cette absence d'effet avec une aussi forte

concentration de Pb serait probablement liée à l'accumulation du Pb au niveau du squelette et au fait que seuls 5 à 10% de la fraction absorbée est répartie sur le reste des tissus, y compris le foie, le cerveau et les gonades.

Nous avons également remarqué que les gènes des gonadotrophines seraient légèrement plus sensibles à la contamination au Pb qu'au Cd puisqu'on a pu observer bien que minime une réponse de ces gènes avec uniquement 1 µg/l de Pb. D'ailleurs si on compare le niveau de transcription de *fshβ* et de *lhβ* obtenus avec Cd1 et avec Pb1, nous constatons une réponse plus importante de ces deux gènes avec le Pb ($p = 0,071$ pour *fshβ* et $p = 0,062$ pour *lhβ*).

Âgés de 16 mois au moment du sacrifice, les loups étaient en période prépubère. La maturité est normalement précédée par une cascade de changements hormonaux pour que les poissons commencent leur première phase de production de sperme et d'ovules. Parmi ces changements, des études ont montré des variations du contenu hypophysaire de GnRH. En effet, l'isoforme sbGnRH (GnRH de daurade), contrairement aux deux autres isoformes sGnRH (GnRH de saumon) et cGnRH (GnRH de poulet) qui restent inchangées, montre des fluctuations très importantes avec un pic au moment de l'apparition des premiers mâles producteurs de sperme. Cette augmentation est suivie par une augmentation des concentrations plasmatiques de LH et des stéroïdes qui jouent un rôle primordial dans l'installation de la maturation sexuelle.

Il paraît plausible que les modifications au niveau de la transcription des gènes codant pour les hormones hypophysaires observées au cours de nos expérimentations auraient probablement un effet sur les concentrations d'œstrogènes et d'androgènes circulants ce qui pourrait avoir des répercussions sur la maturité chez les loups. Dans ce contexte, nous avançons l'hypothèse que de telles augmentations dans l'expression de *lhβ* et de *fshβ* pourraient être à l'origine de maturation précoce chez les loups juvéniles.

Il serait intéressant ultérieurement d'approfondir encore notre étude par des dosages plasmatiques des stéroïdes circulants (T, 11KT et œstradiol) afin d'aborder l'impact des PE sur l'axe HHGH sous différents angles.

En ce qui concerne l'effet du Cd et du Pb sur l'expression de l'*arom b*, les résultats que nous avons obtenu montrent une diminution importante de l'expression de ce gène chez les poissons intoxiqués par 0,5 µg/l de Cd et également chez ceux traités par 50 µg/l de Cd ($p = 0,017$).

La diminution de l'expression de l'*arom b* a encore été plus sévère avec le Pb. En effet, elle a été réduite au tiers avec seulement 1 µg/l ($p = 0,009$). Chez les poissons traités par 100 µg/l, nos résultats ont également montré une sous-expression de l'*arom b* par rapport aux témoins ($p = 0,029$) mais qui reste du même ordre de grandeur observé chez les loups contaminés par Pb1.

Bien que la principale source des stéroïdes soit les gonades, il existe aussi une synthèse périphérique dans d'autres tissus comme le cerveau, les neurostéroïdes (17-hydroxy-prégnénolone, déhydroépiandrostérone, androstènedione, testostérone, dihydrotestostérone, E2, estrone, progestérone, dihydro- et tétrahydro-progestérone) (Diotel *et al.* 2011). L'Aromb est aussi impliquée dans la différenciation sexuelle chez le loup. Elle est impliquée également dans le comportement sexuel et dans la neurogénèse.

Pour le Pb nos résultats sont cohérents avec la littérature qui décrit le Pb comme inhibiteur de l'aromatase (Taupeau *et al.* 2003), par contre ce n'est pas le cas pour le Cd souvent décrit comme œstrogénique. Ces deux métaux pourraient donc avoir un effet sur le comportement sexuel chez le loup ou encore sur la neurogénèse.

La diminution de l'expression de l'*arom b*, observée suite aux intoxications des poissons par les métaux, se traduit normalement par une diminution de la conversion des androgènes en œstrogènes et prévenir une éventuelle augmentation de la synthèse des œstrogènes par la sur-expression des gènes codants pour les GtH. L'axe HHGH met ainsi un mécanisme compensatoire chez *Dicentrarchus labrax*. En effet, les variations précédemment décrites dans les niveaux transcriptionnels des gènes des GtHse seraient normalement accompagnés d'une augmentation des taux d'œstrogènes endogènes du moins pour le Cd, dont l'effet œstrogénique est déjà bien connu.

En effet, comme on a pu le décrire précédemment, les métaux peuvent agir par d'autres mécanismes (que celui de l'aromatase) pour exercer leurs effets œstrogéniques ou androgéniques ; en agissant par exemple directement sur la stéroïdogenèse ou simplement par l'existence de site de fixation de ces métaux sur les ER comme cela a été démontré pour le Cd (Nesatyy *et al.* 2005). D'autres études sembleraient nécessaires pour confirmer ou infirmer le caractère œstrogénique ou androgénique de ces deux métaux chez *Dicentrarchus labrax*.

Il est admis que l'*arom b* joue un rôle important chez *Dicentrarchus labrax* lors de la différenciation sexuelle. En revanche son rôle reste mal connu durant les stades de développement plus avancés chez ce poisson. Certaines études confirment son implication dans la neurogénèse chez cette espèce dont le développement cérébral est continu tout au long de sa vie (Blázquez et Piferrer 2004). Dans ce contexte, et face à la répression de l'*arom b* observée chez les poissons traités avec les métaux lourds, nous pouvons penser que ces derniers peuvent avoir un effet sur la neurogénèse chez *Dicentrarchus labrax*.

Etant donné que l'expression de l'*arom b* dépend du sexe, il est intéressant de mener la recherche séparément sur deux groupes de sexes différents. Le nombre réduit des femelles dans chacun de nos groupe de poissons (T, Cd1, Cd2, Pb1 et Pb2) ne nous a pas permis d'établir une analyse statistique de nos résultats dans ce sens.

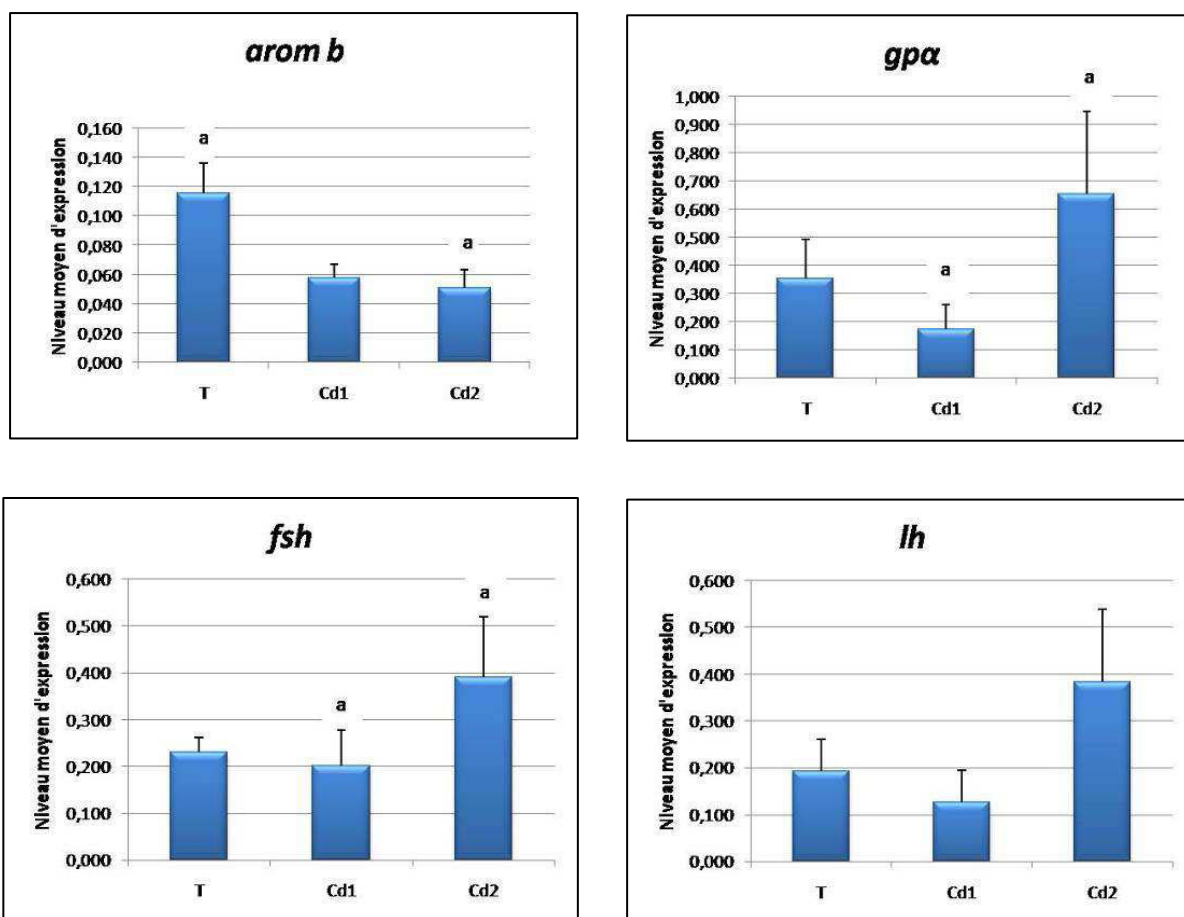


Figure 47 : Expression de l'*arom b*, *fsh* β , *lh* β , *gpa* dans le cerveau chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 μ g/l). Les taux relatifs d'ARNm des gènes ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne \pm erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

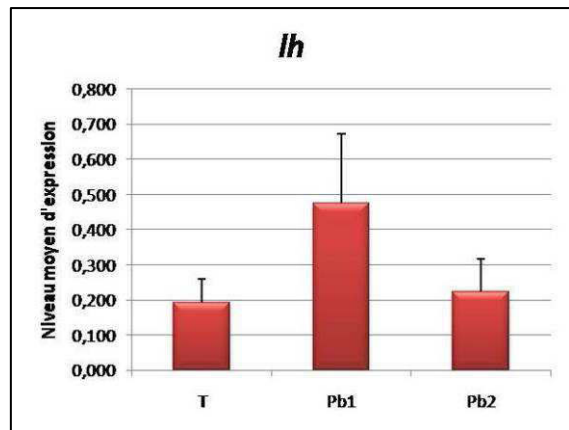
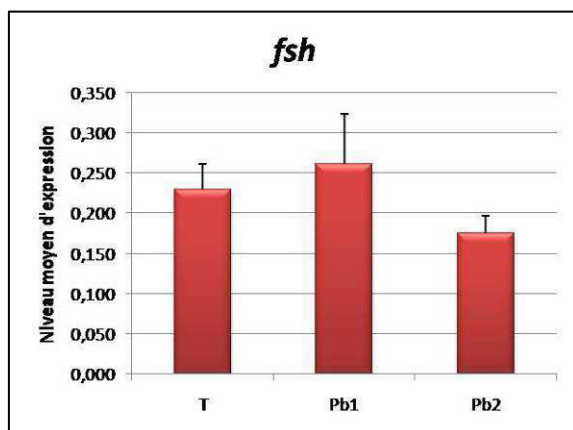
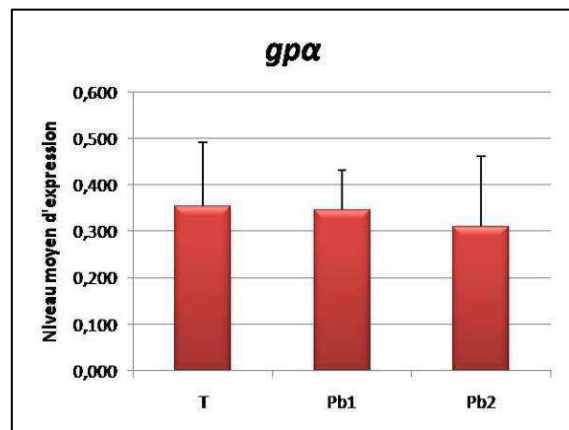
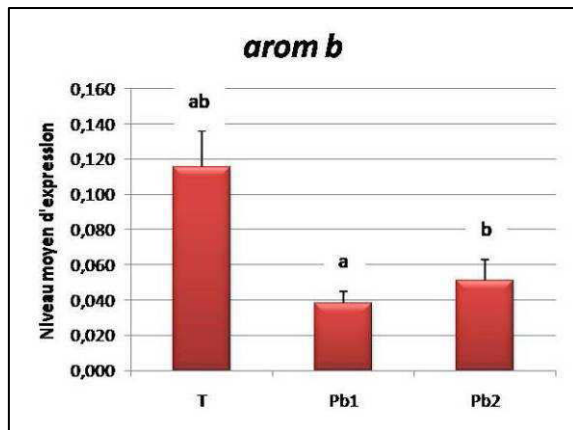


Figure 48 : Expression de l'*arom b*, *fsh* β , *lh* β , *gpa* dans le cerveau chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 $\mu\text{g/l}$).

Les taux relatifs d'ARNm des gènes ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne \pm erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-wallis et Dunn).

b) Dans les gonades

Nous avons illustré les variations de l'expression de l'*arom a* dans les gonades par la Figure 49 pour les poissons intoxiqués au Cd et par la Figure 50 pour ceux intoxiqués au Pb.

D'après nos résultats, les deux concentrations de Cd employées ne modifient pas l'expression de l'*arom a*. En revanche, le Pb à 1 µg/l induit une sur-expression que nous considérerons non significative étant donné la grande variabilité observée entre les individus (écart type important). Avec Pb2, l'expression de l'*arom a* a les mêmes niveaux d'expression que ceux des témoins.

L'activité de l'aromatase dans les gonades est principalement attribuée à l'*arom a* chez les téléostéens, même si une légère expression de *arom b* a été détectée chez certaines espèces (Blázquez et Piferrer 2004). Les niveaux les plus élevés d'expression de l'*arom a* sont rapportés au cours des stades d'ovocyte III (ovocyte vitellogénique) ce qui traduit le rôle essentiel des œstrogènes dans le développement des ovaires à ce stade. L'*arom a*, qui assure la conversion des androgènes en œstrogènes, est aussi retrouvée chez les mâles mais avec des niveaux d'expression beaucoup plus bas.

Suite à l'intoxication par les métaux, l'expression de ce gène n'a pas été augmentée, contrairement à ce qu'on aurait pu s'attendre par rapport à l'augmentation d'expression observée précédemment pour la *lhβ* et l'effet œstrogénique connu pour le Cd.

Nous pensons que la diminution de l'expression de l'*arom b* dans le cerveau, a contribué au maintien d'un équilibre du niveau d'expression de l'*arom a* dans les gonades en ayant prévenu une éventuelle augmentation de la synthèse des œstrogènes qui aurait pu être provoquée par la sur-expression des gènes des GtH. Il s'agit de mécanisme compensatoire qui a eu lieu en amont des gonades et qui prévenu une éventuelle modification de l'expression de l'*arom a*. A cela s'ajoute la détoxification des métaux par les MT qui aurait certainement protégé les gonades d'une toxicité directe et la forte accumulation des métaux dans le foie.

À ce stade, seules les réponses hormonales sont affectées par l'intoxication par les métaux puisque le GSI, lui, n'a pas été réduit. Avec une concentration de Pb 100 fois plus élevée, le système de rétrocontrôle au niveau de l'axe HHGH a été suffisamment stimulé par cette forte dose de Pb pour corriger ce trouble en amont des gonades.

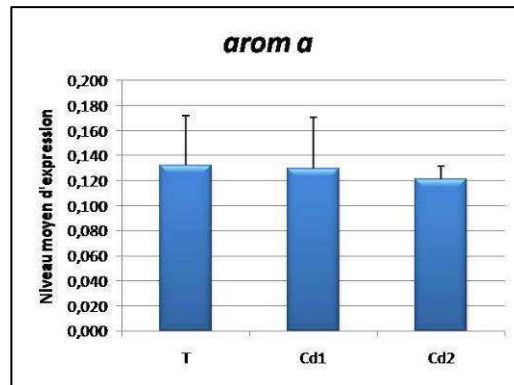


Figure 49 : Expression de l'*arom a* dans les gonades chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l).

Les taux relatifs d'ARNm des gènes ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne \pm erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

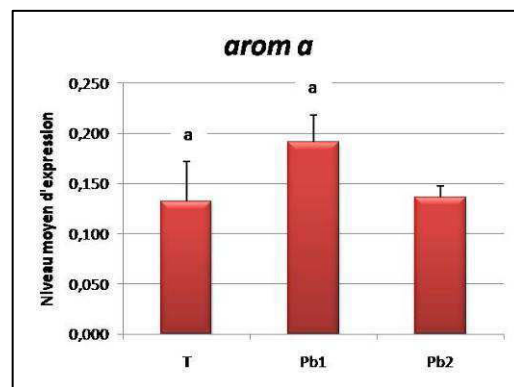


Figure 50 : Expression de l'*arom a* dans les gonades chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l).

Les taux relatifs d'ARNm des gènes ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne \pm erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

c) Dans le foie

◆ Expression de *mt*

Nous avons illustré les résultats obtenus pour les variations de l'expression de *mt* suite aux intoxications au Cd et au Pb respectivement par la Figure 51 et la Figure 52.

Nous avons constaté une augmentation considérable de l'expression de ce gène dans le foie après intoxication au Cd. Cette sur-expression se traduit par des niveaux d'expression environ 8,5 fois plus élevés avec Cd1 ($p=0,022$) et allant jusqu'à 12,5 fois avec Cd2 ($p=0,040$) en comparaison avec le groupe contrôle (Figure 51). Pour le Pb et bien que les différences d'expression n'étaient pas statistiquement significatives, nous notons tout de même une nette tendance à la sur-expression du gène *mt* et qui serait d'autant plus importante que la concentration du Pb utilisée est grande (Figure 52). Ces résultats sont corrélés avec la bioaccumulation de ces deux métaux dans le foie (résultats présentés dans le paragraphe 2-Bioaccumulation métallique au niveau du foie). Une telle sur-expression était prévisible étant donné le rôle connu des MT dans la détoxification des métaux lourds au niveau du foie. La grande affinité des résidus cystéines des MT au Cd et avec un moindre degré au Pb explique la différence obtenue quant à la réponse de ce gène à la contamination par le Cd et par le Pb. A cela s'ajoute le fait que le Pb, contrairement au Cd, ne soit pas véhiculé préférentiellement vers le foie et que moins de 10% de sa fraction absorbée soit véhiculée vers ce tissu.

Nos résultats témoignent, du rôle important que jouent les MT dans la détoxification de l'organisme du Cd. Les MT semblent également intervenir bien que faiblement dans la détoxification du Pb contrairement à ce qu'on peut trouver parfois dans la littérature. En deuxième lieu, les variations observées dans l'expression de *mt* pourraient expliquer en partie l'absence d'effets délétères au niveau gonadique (absence de variation du GSI). En effet, si cette sur-expression est suivie par une synthèse et une activité protéique élevée, la mobilisation très importante des MT permettra de diminuer la toxicité des métaux lourds. Effectivement cela se traduira par une réduction de leur fraction libre biodisponible responsable de leur effet toxique et pourra épargner les gonades des effets toxiques du Pb et du Cd. A cela s'ajoute également la courte durée de l'expérience (96h), qui certainement n'est pas suffisante pour pouvoir observer des effets notables au niveau des gonades.

◆ Expression de *vtg*

En ce qui concerne *vtg*, nous n'avons noté aucune expression de ce gène au niveau du tissu hépatique. En effet, chez *Dicentrarchus labrax*, les femelles commencent normalement leur premier cycle vitellogénique à trois ans. Nos poissons, âgés de 16 mois à la fin de l'expérience, ne sont pas encore matures et en dehors des conditions expérimentales, il est tout à fait normal que ce gène ne soit pas exprimé.

Nous voulions cependant rechercher un éventuel effet œstrogénique du Cd et/ou du Pb avec les deux concentrations qu'on a voulu tester pour chaque métal. En effet, les composés œstrogéniques sont connus pour être capables d'induire une maturation précoce chez les

poissons contaminés ou encore une féminisation des mâles se traduisant par une expression de *vtg* chez ces derniers.

D'après nos résultats, ni les concentrations du même ordre de grandeur que les concentrations environnementales du Cd et du Pb, ni celles 100 fois plus élevées n'entraînent l'expression de *vtg* chez les poissons préalablement identifiés mâles par l'examen histologique ou l'expression de ce gène chez les juvéniles d'une manière plus générale.

L'absence d'expression du gène *vtg* répond à l'hypothèse que nous avons posée dans le paragraphe 4-a) qui suppose que l'augmentation de l'expression de *lhβ* pourrait induire une installation précoce de la maturité chez nos poissons juvéniles et donc une expression de *vtg*. Malgré l'importance des concentrations utilisées avec les deux métaux, une telle perturbation n'a pas été observée. Nous pensons que la mise en jeu du système de rétrocontrôle négatif au niveau de l'axe HHGH et de phénomènes compensatoires tels que la répression du gène de l'*arom b* au niveau cérébral, étaient relativement suffisants pour prévenir une maturité précoce chez les juvéniles ou la production de VTG chez les mâles.

Peu d'études sont portées sur l'effet du Pb sur l'expression de *vtg*, cependant les données sur l'effet du Cd sur l'expression de *vtg* sont très divergentes.

Certains décrivent le Cd comme ayant un effet coopératif (amplificateur) avec l'E2 dans l'induction de *vtg*. C'est le cas de l'étude réalisée par [Lee et al. 2010](#) lors de laquelle, le traitement d'hépatocytes de grenouilles taureau mâles (*Rana catesbeiana*) par du CdCl₂ (100 nM) associé à l'E2 (100 nM) provoquait une induction de l'expression de *vtg* significativement plus élevée qu'avec l'E2 seul.

En revanche d'autres études *in vivo* le décrivent comme un élément inhibiteur de l'expression de *vtg* induite par l'E2 sur des cellules d'hépatocytes de la truite arc en ciel (Cd à 1 μM) ([Hwang, Kagawa, et Mugiya 2000](#)).

Dans notre étude, aucun effet n'a été observé sur l'expression de *vtg* quelque soit le métal utilisé ou les concentrations utilisées. Dans nos conditions expérimentales, les deux métaux n'entraînent pas de perturbations du développement ou de maturation chez les lousps juvéniles.

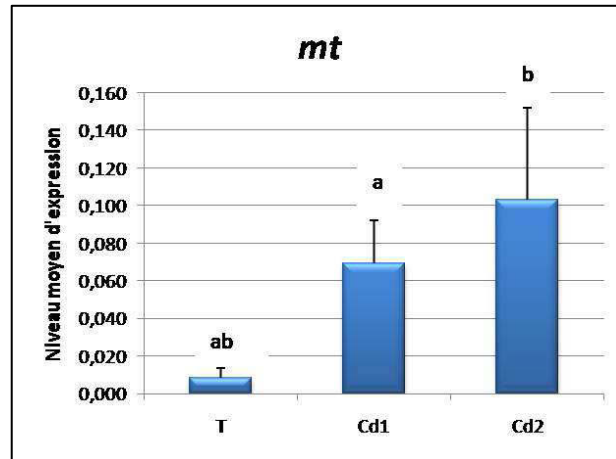


Figure 51 : Expression de *mt* dans le foie chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l).

Les taux relatifs d'ARNm des gènes ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

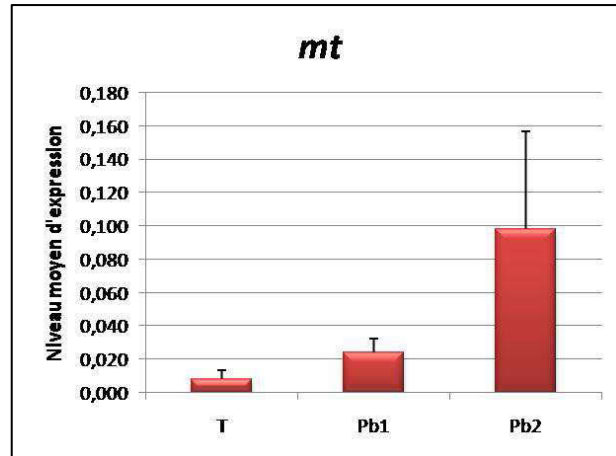


Figure 52 : Expression de *mt* dans le foie chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l).

Les taux relatifs d'ARNm des gènes ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($P < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des ratios gène étudié/gène invariant de : l'arom b, fsh β , lh β , gpa dans le cerveau, de l'arom a dans les gonades et de mt dans le foie chez *Dicentrarchus labrax* après contamination par différentes concentrations de Cd (0,5 et 50 μ g/l) et de Pb (1 et 100 μ g/l).

sd : écart-type, CV% : coefficient de variation en pourcentage, n : nombre d'individus considérés.

		<i>arom b</i>	<i>arom a</i>	<i>fshβ</i>	<i>Lhβ</i>	<i>gpa</i>	<i>vtg</i>	<i>Mt</i>
T	Moyenne	0,115	0,132	0,230	0,194	0,354	0,000	0,008
	sd	0,069	0,136	0,099	0,224	0,460	0,000	0,014
	CV%	60	103	43	116	130	—	173
	N	11	12	10	11	11	8	7
	Erreur type	0,021	0,039	0,031	0,068	0,139	0,000	0,005
Cd1 (0,5μg/l)	Moyenne	0,058	0,129	0,202	0,126	0,174	0,000	0,069
	sd	0,030	0,130	0,239	0,218	0,268	0,000	0,060
	CV%	51	100	118	173	154	—	87
	N	10	10	10	10	10	10	7
	Erreur type	0,009	0,041	0,076	0,069	0,085	0,000	0,023
Cd2 (50 μg/l)	Moyenne	0,051	0,121	0,391	0,384	0,654	0,000	0,103
	sd	0,044	0,037	0,446	0,539	0,968	0,000	0,155
	CV%	86	30	114	140	148	—	150
	N	12	12	12	12	11	11	10
	Erreur type	0,013	0,011	0,129	0,156	0,292	0,000	0,049
Pb1 (1 μg/l)	Moyenne	0,038	0,191	0,262	0,475	0,346	0,000	0,024
	sd	0,021	0,080	0,195	0,624	0,242	0,000	0,020
	CV%	57	42	75	131	70	—	81
	N	10	9	10	10	8	9	6
	Erreur type	0,007	0,027	0,062	0,197	0,086	0,000	0,008
Pb2 (100 μg/l)	Moyenne	0,051	0,136	0,175	0,223	0,310	0,000	0,098
	sd	0,039	0,040	0,070	0,314	0,504	0,000	0,187
	CV%	77	29	40	141	162	—	190
	N	11	11	11	11	11	10	10
	Erreur type	0,012	0,012	0,021	0,095	0,152	0,000	0,059

5. Effet du Cd et du Pb sur l'expression de *ho-1*

A travers l'étude du niveau de transcription de *ho-1* dans le cerveau, les gonades et le foie nous évaluons entre autre la réponse de l'organisme au stress induit par la contamination par les métaux et plus précisément celle de l'axe HHGH.

Les niveaux d'expression moyens de *ho-1* retrouvés suite aux intoxications par le Cd et le Pb sont résumés dans le Tableau 9 et illustrés par les graphiques présentés par la Figure 53 pour le Cd par la Figure 54 pour le Pb.

a) Réponse de *ho-1* au Cd

Au niveau du cerveau et des gonades, les moyennes de l'expression de *ho-1* étaient statistiquement équivalentes chez les poissons intoxiqués au Cd et ceux qui n'ont pas été contaminés. Nous n'avons donc constaté aucun effet de ce métal ni avec Cd1 ni avec Cd2. Cette absence de réponse de *ho-1* au stress infligé par l'intoxication au Cd traduit probablement une absence d'adaptation au stress à ce niveau et pourrait expliquer les variations de l'expression des gènes codant pour les GtHs précédemment décrites dans le **paragraphe 4. a)** et qui étaient d'autant plus importantes avec Cd2.

En revanche, au niveau du foie, nous avons constaté une légère augmentation de l'expression de *ho-1* chez les poissons traités par 0,5 µg/l de Cd mais qui n'était pas statistiquement significative. Chez les lours intoxiqués par 50 µg/l de Cd la sur-expression de ce gène a été encore plus importante avec des valeurs multipliées par près de 2,5 par rapport aux témoins. Cette variation du niveau de transcription chez ce groupe de poissons est significative non seulement par rapport aux témoins ($p = 0,029$) mais aussi par rapport au groupe traité avec 0,5 µg/l de Cd ($p = 0,050$) montrant que l'expression de *ho-1* dans ce tissu est concentration dépendante. Une telle réponse est plausible étant donné que le Cd est préférentiellement stocké dans le foie.

b) Réponse de *ho-1* au Pb

La réponse des lours à la contamination par le Pb, diffère de celle observée avec le Cd. En effet, au niveau du cerveau, nous avons noté chez les poissons intoxiqués par 100 µg/l que l'expression de *ho-1* a presque doublé par rapport au premier groupe intoxiqué par uniquement 1 µg/l ($p = 0,001$). Bien qu'il ne s'agisse pas de l'isoforme la plus abondante de l'hème oxygénase au niveau du cerveau, *ho-1* semble répondre de manière considérable au stress induit par le Pb dans ce tissu. Ceci est cohérent avec la neurotoxicité démontrée de ce métal.

Au niveau des gonades, l'expression de *ho-1* n'a pas été affectée par le Pb et ce avec les deux concentrations qui ont été utilisées dans nos expérimentations.

En revanche, au niveau hépatique, suite à l'intoxication des poissons par le Pb, *ho-1* répond de manière similaire à celle au Cd. En effet, nos résultats montrent une augmentation

de l'expression de ce gène chez les poissons contaminés. Cette expression a effectivement presque doublé chez les poissons traités avec 1 µg/l et devient statistiquement significative chez le groupe traité avec 100 µg/l de Pb avec des valeurs 2,75 fois plus élevées que celles observées chez les poissons non contaminés ($p = 0,005$). Comme pour le Cd, l'expression de *ho-1* dans ce tissu est concentration dépendante avec le Pb. Bien que le foie ne soit pas le 1^{er} lieu de stockage du Pb, la réponse de *ho-1* témoigne d'un état de stress et de changements important dans ce tissu.

L'ensemble de nos résultats montre que l'expression de *ho-1* dépend non seulement du tissu, mais aussi du métal et de la concentration de ce dernier. En effet, conformément à la littérature, en dehors de toute situation de stress, ce gène est plus exprimé dans le foie que dans le cerveau ou les gonades. Nos résultats dans le foie montrent des niveaux d'expression deux fois plus élevés que ceux retrouvés au niveau du cerveau et les gonades.

En ce qui concerne la nature du métal, *ho-1* est plus sensible au Pb qu'au Cd surtout au niveau du cerveau où nous avons constaté que la sur-expression de ce gène a été largement plus importante avec le Pb en comparant les niveaux de transcription obtenus avec Cd2 et Pb2. Cette différence dans la réponse aux deux métaux s'est révélée statistiquement significative ($p = 0,042$ pour Cd2 et Pb2).

Pour les deux métaux étudiés, l'expression de ce gène dans le foie s'est montrée concentration dépendante comme on a pu le décrire ci-dessus. La réponse de *ho-1* montre une certaine tolérance des loups au stress métallique.

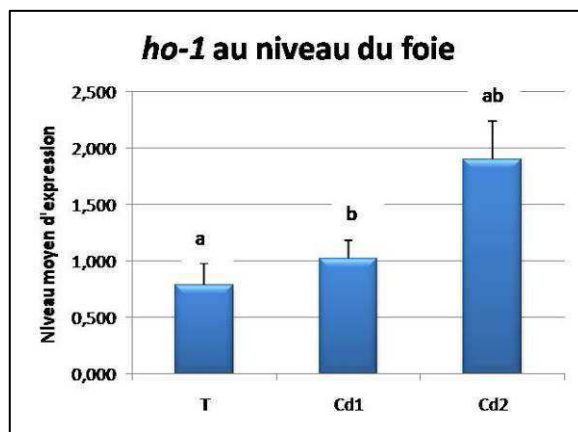
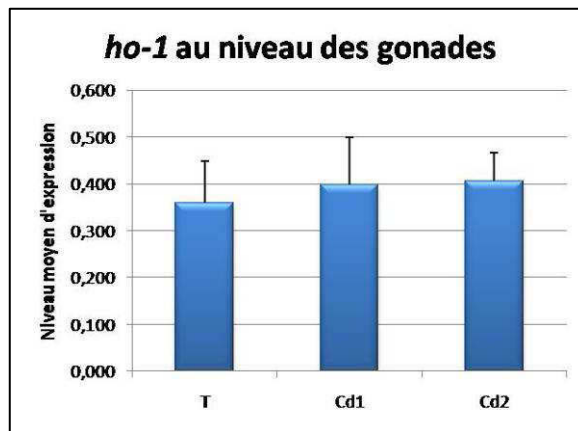
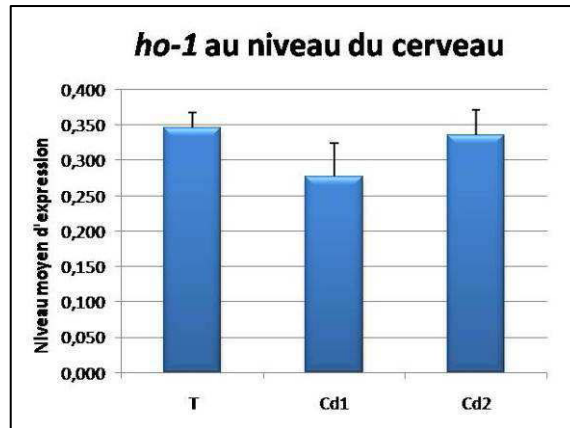


Figure 53: Variation de l'expression de *ho-1* après contamination par deux concentrations différentes de Cd (0,5 et 50 µg/l) dans le cerveau, les gonades et le foie.
 Les taux relatifs d'ARNm de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

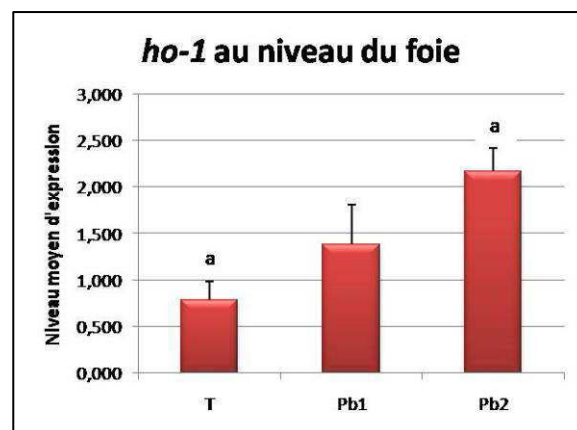
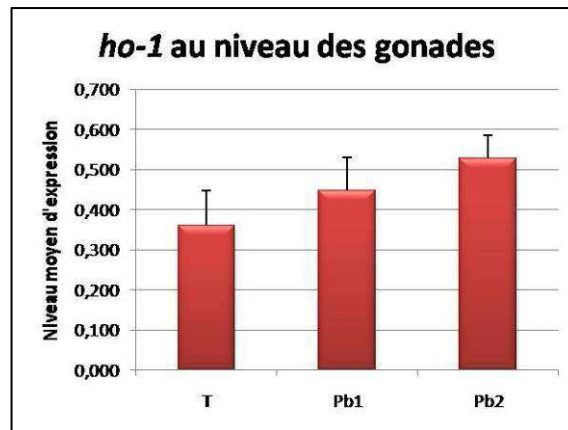
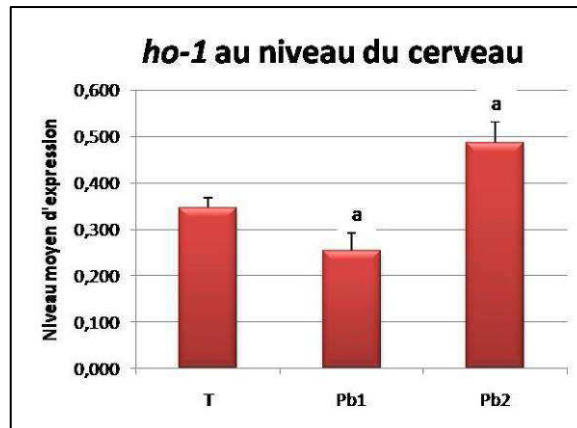


Figure 54 : Variation de l'expression de *ho-1* après contamination par deux concentrations différentes de Pb (1 et 100 µg/l) dans le cerveau, les gonades et le foie.
 Les taux relatifs d'ARNm de *ho-1* ont été déterminés par PCR semi-quantitative. Les données sont représentées en moyenne ± erreur type. Les lettres indiquent une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) (Test de Kruskal-Wallis et Dunn).

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des ratios *ho-1/rpl17* au niveau de l'axe HHGH chez *Dicentrarchus labrax* après intoxication au Cd (0,5 et 50 µg/l) et au Pb (1 et 100 µg/l).

sd : écart-type, CV% : coefficient de variation en pourcentage, n : nombre d'individus considérés.

		<i>ho-1</i>		
		Cerveau	Foie	Gonades
T	Moyenne	0,346	0,790	0,359
	sd	0,061	0,475	0,281
	CV%	18	60	78
	n	8	6	10
	Erreur type	0,022	0,194	0,089
Cd1 (0,5 µg/l)	Moyenne	0,278	1,022	0,399
	sd	0,146	0,514	0,302
	CV%	53	50	76
	n	10	10	9
	Erreur type	0,046	0,162	0,101
Cd2 (50 µg/l)	Moyenne	0,336	1,903	0,406
	sd	0,123	0,956	0,212
	CV%	37	50	52
	n	12	8	12
	Erreur type	0,036	0,338	0,061
Pb1 (1 µg/l)	Moyenne	0,254	1,383	0,448
	sd	0,118	1,151	0,251
	CV%	46	83	56
	n	10	7	9
	Erreur type	0,037	0,435	0,084
Pb2 (100 µg/l)	Moyenne	0,485	2,172	0,528
	sd	0,153	0,802	0,191
	CV%	32	37	36
	n	11	10	11
	Erreur type	0,046	0,254	0,058

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

La surveillance de la qualité du milieu marin s'est longtemps limitée à l'évaluation de paramètres physiques, chimiques et/ou écotoxicologiques dans l'eau de mer, en amont de l'impact des variations des facteurs environnementaux ou de l'effet toxique d'un polluant sur les organismes marins.

Depuis les années 90, les chercheurs s'intéressent de plus en plus à la biosurveillance du milieu marin par l'étude de l'effet des facteurs environnementaux sur les organismes marins et de la réponse biologique de ces derniers pour évaluer l'état de l'écosystème marin. L'étude de biomarqueurs, les outils biochimiques et la biologie moléculaire sont parmi les outils les plus utilisés pour l'évaluation de l'impact des facteurs environnementaux sur les écosystèmes marins.

En effet, l'étude de l'impact de l'environnement sur les organismes marins et l'étude de biomarqueurs reflètent d'une part l'état de santé des individus ou d'une population mais aussi *a fortiori* l'état du milieu dans lequel ils vivent. Ils aident ainsi à établir un diagnostic précis et à évaluer de manière globale l'état du milieu marin, un milieu complexe qui rassemble à la fois plusieurs polluants qui, non seulement, interagissent entre eux (synergie ou antagonisme) mais aussi avec les paramètres physico-chimiques du milieu.

Du fait de leurs interactions avec l'équilibre du système hormonal et de la multitude des effets qu'ils peuvent engendrer à différents niveaux du système endocrinien, les PE, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique, sont parmi les polluants les plus concernés par cette notion de biosurveillance. Parmi les PE, certains métaux lourds comme le Cd et le Pb posent un sérieux problème environnemental.

Ce travail s'inscrit dans cette problématique. Nous nous sommes proposés durant cette thèse, d'étudier chez *Dicentrarchus labrax* : sa réponse au stress thermique par l'évaluation des variations de l'expression de *ho-1* et l'impact d'une intoxication aiguë (96h) par le Cd et le Pb sur l'axe HHGH et sa réponse au stress engendré par ces métaux.

Lors des différents travaux menés au cours de ces années de thèse, plusieurs résultats se sont dégagés quant à l'impact du stress thermique et du stress lié aux métaux chez le loup juvénile. Les résultats obtenus au terme de notre étude ont également ouvert de nombreuses perspectives de recherche.

L'ensemble de nos résultats obtenus concernant la réponse de *ho-1* au stress qu'il soit thermique ou chimique, montrent que *ho-1* est très impliqué dans la réponse au stress.

Lors de la première partie de notre étude, portant sur l'effet du stress thermique sur l'expression de *ho-1*, nos résultats montrent qu'en dehors de tout stress thermique, *ho-1* est exprimé différemment au niveau des organes étudiés. En effet, il est préférentiellement exprimé dans le foie, la rate, les reins et les intestins alors qu'il ne s'exprime quasiment pas dans le cœur, le cerveau, les branchies ou le muscle.

Suite à l'exposition des poissons à une température élevée, nous pouvons confirmer que *ho-1* est impliqué dans la réponse au stress thermique. Mais cette réponse dépend fortement de l'organe étudié d'une part et d'autre part de la durée pendant laquelle les poissons sont exposés au stress thermique. En effet, une sur-expression de *ho-1* dans le foie a été observée au bout de 4 semaines d'exposition à 30°C et aucun effet, dû au changement de la température, n'a été noté avant ce délai. En revanche au niveau de la rate et des reins, le stress thermique a été suivi d'une sous-expression de *ho-1* survenue plus rapidement dans les reins (dès 1h) par rapport à la rate (4 semaines). Cependant dans les intestins, *ho-1* ne répond pas au stress induit par l'augmentation de la température.

ho-1 n'est pas exprimé à l'état physiologique normal au niveau du reste des organes étudiés (le cœur, le cerveau, le muscle et les branchies), et son expression n'a à aucun moment été induite par l'augmentation de la température quelque soit la durée de l'exposition

Le nombre d'études sur l'expression de *ho-1* en réponse au stress thermique reste relativement réduit. De plus, les modèles animaux utilisés ainsi que les températures et les durées d'expositions choisies sont très variables d'une étude à une autre, ce qui rend la comparaison entre les résultats très limitée. D'autres études plus approfondies et plus ciblées semblent être indispensables pour mieux comprendre les mécanismes d'induction de *ho-1* dans les processus d'adaptation des loups aux températures élevées.

Dans la 2^{ème} partie de notre étude portant sur la réponse de *ho-1* au stress induit par le Cd et le Pb, nos résultats montrent que la réponse de *ho-1* dans le foie est la plus importante par rapport aux autres organes.

Aucun effet des deux métaux n'a été observé au niveau des gonades quelles que soient les concentrations, alors qu'une sur-expression de *ho-1* a été constatée dans le cerveau uniquement avec 100 µg/l de Pb. Dans la littérature, le Pb est souvent impliqué dans les lésions neurologiques, ce qui rend nos résultats dans ce tissu plausible. Mais c'est au niveau du foie, que *ho-1* répond le plus aux contaminations par le Cd et par le Pb et cette réponse est d'autant plus importante que la concentration du métal est importante. Cela traduit un état de stress au niveau de ce tissu et une mise en place de mécanismes d'adaptation afin de réduire l'impact de la contamination. En effet, le foie joue un rôle principal dans les processus de détoxification ce qui explique de telles modifications dans cet organe.

En conclusion, *ho-1* semble être un bon indicateur de stress à large spectre au niveau du foie chez *Dicentrarchus labrax* qui répond aussi bien au stress physique que chimique. Plus étudié et utilisé chez l'homme, ce gène semble présenter autant d'intérêt chez les poissons et est parfaitement adaptable, dans le foie, à la mise en application dans la biosurveillance des milieux marins. Il renseigne sur l'état physiologique de l'organe et de l'organisme de façon plus générale.

ho-1 répond aussi bien au stress thermique (réponse durée dépendante) qu'au stress chimique induit par la contamination par le Cd et le Pb (réponse concentration dépendante). Il pourrait faire partie d'une batterie de gènes qui constitue une puce à ADN, spécifique au loup, qui pourrait être utilisée comme biomarqueur de stress thermique ou stress induit par les métaux chez *Dicentrarchus labrax*. La rapidité de sa réponse au stress ainsi que la longue durée de

son implication dans la réponse au stress thermique ainsi que sa capacité à répondre à différents types de métaux et de manière concentration dépendante font de lui un bon candidat pour ce genre d'études. *ho-1* devrait être associé à d'autres gènes afin d'apporter plus de renseignements sur la nature du stress subi par les poissons. On pourrait l'associer par exemple à *hsp 70* et *wap65* pour détecter un stress thermique, et à d'autres gènes comme *vtg*, *mt* et *aromb*... pour détecter un stress chimique.

Dans la deuxième partie de notre étude sur l'impact des contaminations par le Cd et le Pb sur l'axe HHGH chez le loup juvénile, nous notons l'absence d'effets physiologiques notables avec les deux métaux étudiés qu'ils soient utilisés en doses environnementales ou à des concentrations 100 fois plus élevées. En effet, ni la croissance globale des poissons, ni le GSI n'ont été impactés par ces contaminations. Nous liions cela en premier à la courte durée du traitement (intoxication aigue sur 96h) mais aussi au délai après lequel les poissons ont été sacrifiés puisque le sacrifice a eu lieu directement après la fin de la période du traitement. Ce délai étant court, il est tout à fait logique de ne pas observer d'effets physiologiques qui auraient nécessité plus de temps pour s'installer ou de différences significatives par rapport aux poissons non traités.

En ce qui concerne la bioaccumulation du Pb et du Cd dans le foie, nous concluons que les deux métaux sont bioaccumulés au niveau de cet organe. Nos résultats sont en accord avec la littérature, qui décrit le foie comme l'organe de stockage préférentiel du Cd, puisque sa teneur dans le foie était significativement plus élevée par rapport aux témoins avec seulement 0,5 µg/l de Cd. Alors que pour le Pb, il n'a été considérablement bioaccumulé dans le foie qu'avec 100 µg/l de Pb puisque les 90% de la fraction absorbée sont dirigées vers le squelette et les 10% sont répartis entre le foie et d'autres tissus comme le cerveau et la rate. Il est donc normal que la fraction parvenue au foie avec 1 µg/l ne soit à la limite de détection des appareillages (0,02 µg/g).

L'un des résultats intéressants de ce travail, est la mise en évidence d'une corrélation entre les teneurs en Cd ou en Pb dans le foie et la concentration d'autres métaux naturellement présents dans cet organe. Ainsi à la fin de notre étude nous avons démontré qu'il existe une corrélation positive entre la teneur en Cd du foie et celle en As, entre la teneur en Cd et celle en Zn et entre la teneur en Pb et celle en Zn également.

Nous pensons que de telles interactions sont directement liées aux variations des concentrations des MT dans le foie. Ces protéines jouent effectivement un rôle très important dans l'homéostasie du Zn et des métaux de façon plus générale dans l'organisme. L'induction des MT de façon massive suite à la contamination par les métaux, perturbe sans doute, l'équilibre des autres métaux.

Nos résultats sur les variations des niveaux d'expression de *mt* au niveau du foie suite à la contamination des loups par le Cd et le Pb, viennent renforcer cette hypothèse. En effet, le gène *mt* est clairement exprimé avec les deux concentrations du Cd et sa sur-expression est d'autant plus importante que la concentration en Cd est élevée. Pour le Pb, et du fait que

l'affinité des MT pour le Pb soit plus faible que pour le Cd, une légère sur-expression (non significative) a été observée avec 100 µg/l de Pb.

Nos résultats sont en accord avec la littérature où l'expression de *mt* est décrite comme l'un des biomarqueurs les plus intéressants dans la contamination métallique notamment celle par le Cd. Néanmoins, nous soulignons que, bien qu'elle soit largement utilisée dans ce contexte, l'expression de *mt* ne dépend pas uniquement de la contamination par les métaux lourds. En effet, elle dépend également d'autres facteurs environnementaux comme la densité de l'élevage en aquaculture. Donc comme l'expression de *ho-1*, celle de *mt* constitue un biomarqueur à large spectre qui indique certainement la présence d'un stress mais qui n'apporte pas une réponse catégorique quant à la nature de ce stress.

Nos résultats concernant l'impact du Cd et du Pb sur l'expression de gènes représentatifs de l'axe HHGH (*fshβ*, *lhβ*, *gpa*, l'*arom b* et l'*arom a*) montrent que « la réponse hormonale » le long de l'axe HHGH est plus sensible que les paramètres physiologiques. La contamination métallique par le Cd est accompagnée par une légère tendance à la sur-expression des GtHs qui pourrait, si elle est traduite par des taux protéiques plus élevés, stimuler la synthèse de stéroïdes. Le Pb, lui, n'affecte pas l'expression des gènes codant pour les GtHs. Les deux métaux induisent pourtant une sous-expression de l'*arom b* ce qui devrait se traduire par une diminution de la conversion des androgènes en œstrogènes. Cela correspond à un mécanisme compensatoire mis en place par l'axe HHGH afin de prévenir l'augmentation de la synthèse de stéroïdes pouvant résulter de la sur-expression des gènes GtHs. Déjà décrit comme inhibiteur de l'aromatase, nos données sur le plomb sont en accord avec la littérature par contre ce n'est pas le cas pour le Cd souvent décrit comme oestrogénique.

Autre que son rôle dans la synthèse hormonale, l'*arom b* joue un rôle dans la neurogenèse chez le loup. A l'issue de notre travail, nous pensons que le Cd et le Pb pourraient avoir un effet négatif sur la neurogenèse chez cette espèce.

L'expression de l'*arom b* dépend du sexe. Cependant le nombre réduit de femelles dans chacun de nos groupes de poissons (T, Cd1, Cd2, Pb1 et Pb2) n'était pas suffisant pour établir une analyse statistique de nos résultats dans ce sens. Il serait certainement intéressant de reproduire nos expérimentations séparément sur un groupe de mâles et un groupe de femelles avec un nombre d'individus suffisant afin de pouvoir évaluer la tendance de l'expression de l'*arom b* dans chaque groupe de sexe.

Au niveau des gonades, la contamination des poissons par le Cd, n'a pas été suivie d'une sur-expression de l'*arom a* malgré l'augmentation du niveau transcriptionnel de *lhβ* et l'effet œstrogénique du Cd souvent décrit dans la littérature. Nous expliquons cela par la diminution de l'expression de l'*arom b* dans le cerveau qui a pu prévenir de tels changements dans le niveau d'expression de l'*arom a* dans les gonades. Il s'agit d'un mécanisme compensatoire ayant eu lieu en amont des gonades. Egalement, la contamination métallique par le Pb n'a pas induit de sur-expression de l'*arom a*. On constate donc une certaine tolérance des loups aux contaminations par les métaux grâce au rôle important que joue les métallothionéines et l'accumulation des métaux dans le foie.

Pour finir, les deux métaux n'ont, à aucun moment, induit l'expression de *vtg* au niveau hépatique. On pourrait penser que l'intoxication aigüe aux Pb et au Cd n'induit pas de maturation précoce chez les loups juvéniles, ni la synthèse de *vtg* chez les loups identifiés mâles par l'examen microscopique. Mais étant donné la courte durée d'exposition, une seconde étude utilisant des durées d'exposition plus prolongées est nécessaire pour confirmer que les deux métaux n'ont pas d'effet sur l'expression de *vtg*.

D'après les résultats que nous avons obtenus, il est clair que l'une des premières réponses aux contaminations métalliques est le changement du niveau de transcription de certains gènes tels que *ho-1*, *mt*, *arom b*, *fshβ*... Cependant les mécanismes par lesquels les métaux induisent de telles modifications sont insuffisamment connus.

En effet, ils peuvent se fixer sur des MRE (Metal Response Element) situés en amont des gènes en question, comme ils peuvent interagir avec le Ca^{2+} perturbant les voies de transduction de signal. La piste de la capacité d'induire des mutations au niveau de l'ADN est également possible surtout pour le Cd qui est classé parmi les polluants mutagènes par l'union européenne (INERIS 2011).

Nos différents résultats ont donc montré que le stress thermique et le stress engendré par les métaux lourds à effet perturbateur endocrinien sont responsables de dérèglements au niveau transcriptionnel de *ho-1*, impliqué dans l'homéostasie, et de gènes clefs, impliqués dans la fonction de l'axe HHGH.

Ces impacts dépendent de l'organe, du type de stress, de la durée du traitement (quand il s'agit de stress physique), et de la concentration du polluant (quand il s'agit de stress chimique).

D'après nos résultats, les concentrations environnementales que nous avons utilisées pour les deux métaux, ont engendré des changements au niveau de l'axe HHGH. Il est donc évident que les poissons sauvages, continuellement exposés dans leur milieu naturel à de telles concentrations de contaminants, sont encore plus concernés par l'effet perturbateur endocrinien du Cd et du Pb.

Les différents résultats obtenus au cours de ces travaux de thèse, ont bien évidemment ouvert sur d'autres perspectives de recherches.

On a vu que le délai entre les intoxications et le sacrifice des poissons était court et aurait probablement empêché de laisser s'installer des changements physiologiques (GSI, croissance) qui auraient nécessité plus de temps pour être observables. Il serait donc intéressant de prolonger plus le délai entre la fin de la contamination et le sacrifice des poissons afin de vérifier si les changements observés à l'échelle transcriptionnel lors de notre étude pourront se traduire à long terme en changements au niveau gonadique ou encore au niveau de la croissance.

D'autre part, le même type d'étude devrait également être complété par les mesures des concentrations des hormones plasmatiques comme l'E2, la 11KT et la T afin d'aborder

l'impact des métaux lourds sur l'axe HHGH sous différents angles et pour pouvoir déterminer l'effet perturbateur endocrinien de ces 2 métaux.

Il serait également indispensable d'identifier d'autres gènes qu'on pourrait associer à *ho-1* pour pouvoir l'utiliser comme biomarqueur de stress et d'étudier l'expression d'autres gènes de l'axe (les gènes codant pour la GnRh ou encore les gènes impliqués dans les rétrocontrôles de l'axe comme l'inhibine ou l'activine) pour avoir une vue plus générale de la réponse de l'axe aux contaminations par les métaux chez le loup.

Nous pensons également à l'étude de l'expression de gènes des récepteurs d'hormones tels que les ER pour vérifier si comme dans l'étude de [Le Guével et al. 2000](#) sur la truite arc en ciel, le Cd puisse inhiber la transcription de ces gènes.

Il apparaît important de continuer notre étude plus en aval de la transcription par une étude protéomique qui porte sur le système de traduction des ARNm en protéines. Cela nous permettra de vérifier si les modifications au niveau transcriptionnel que nous avons observées, se traduisent ou non par des changements protéomiques.

Enfin, une étude qui porterait simultanément sur les deux types de stress physique et chimique (appelé « multi-stress ») permettrait de se rapprocher aux conditions naturelles auxquelles les écosystèmes marins sont souvent confrontés et d'appréhender la vulnérabilité des organismes marins au stress environnemental. Il serait intéressant de mener une étude sur l'impact de plusieurs sources de stress simultanées : le stress thermique et le stress métallique. De plus en plus d'études sont faites dans ce contexte. L'étude de [Lapointe, Pierron, et Couture 2011](#) montre un effet de synergie entre la température et le stress lié au cuivre. En effet, les populations de poissons sauvages exposées à des températures élevées en raison du réchauffement climatique étaient plus sensibles à la pollution par le cuivre.

Références bibliographiques

- Ahmad, A S, H Zhuang, et S Doré. 2006. « Heme oxygenase-1 protects brain from acute excitotoxicity ». *Neuroscience* 141 (4): 1703-8.
doi:10.1016/j.neuroscience.2006.05.035.
- Amiard, J C, C Amiard-triquet, S Barka, J Pellerin, et P Rainbow. 2006. « Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers ». *Aquatic Toxicology* 76 (2): 160-202.
doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015.
- Aminard, J C, et C Amiard-Triquet. 2008. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Tec & Doc Lavoisier. Paris.
- Ansari, S, et B A Ansari. 2011. « Embryo and fingerling toxicity of Dimethoate and effect on fecundity, viability hatchability and survival of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae) ». *world journal of fish and marine sciences* 3: 167-73.
[http://idosi.org/wjfm3/wjfm3\(2\)11/14.pdf](http://idosi.org/wjfm3/wjfm3(2)11/14.pdf).
- Antonopoulou, E, P Swanson, I Mayer, et B Borg. 1999. « Feedback Control of Gonadotropins in Atlantic Salmon, *Salmo salar*, Male Parr: II. Aromatase Inhibitor and Androgen Effects ». *General and comparative endocrinology* 114 (1): 142-50.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648098972483>.
- Anway, M D, A S Cupp, M Uzumcu, et M K Skinner. 2005. « Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility ». *Science (New York, N.Y.)* 308 (5727): 1466-69. doi:10.1126/science.1108190.
- Arrêté du 26 octobre 2012 déterminant la taille minimale ou le poids minimal de capture des poissons et autres organismes marins (pour une espèce donnée ou pour une zone géographique donnée) effectuée dans le cadre de la pêche maritime de loisir.*
2013. Consulté le mai 23.
- Baatrup, E, et M Junge. 2001. « Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata* ». *Environmental Health Perspectives* 109: 1063-70.
- Bahamonde, P A, K R Munkittrick, et C J Martyniuk. 2013. « Intersex in teleost fish: Are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? ». *General and Comparative Endocrinology*. Consulté le mai 30. doi:10.1016/j.ygcen.2013.04.005.
- Balch, G C, C A Mackenzie, et C D Metcalfe. 2004. « Alterations to Gonadal Development and Reproductive Success in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Exposed to 17alpha-Ethinylestradiol ». *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC* 23 (3): 782-91.
- Barnabé, G. 1976. « Contribution à la connaissance de la biologie du loup *Dicentrarchus labrax* (L.) (Poisson Serranidae) de la région de Sète ». Montpellier: Université des Sciences et Techniques du Languedoc.
- . 1990. « Rearing bass and gilthead bream ». In *Aquaculture*, 2:647-88.

Barnabé G.

Bayley, M, M Junge, et E Baatrup. 2002. « Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males ». *Aquatic Toxicology* 56: 227-39.

Benoit, D A, E N Leonard, G M Christensen, et J T Fiandt. 1976. « Toxic Effects of Cadmium on Three Generations of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) ». *Transactions of the American Fisheries Society* 105 (4): 550-60. doi:10.1577/1548-8659(1976)105<550:TEOCOT>2.0.CO;2.

Besse, J P, et J Garric. 2007. « Médicaments à usage humain : risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs. Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales ». Agence de l'Eau R M C, Lyon, 241 p.

Blázquez, M, P T Bosma, E J Fraser, K J W Van Look, et V L Trudeau. 1998. « Fish as model for the endocrine regulation of reproduction and growth ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 119C: 345-64.

Blázquez, M, A González, M Papadaki, C Mylonas, et F Piferrer. 2008. « Sex related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ». *General and Comparative Endocrinology* 158: 95-101.

Blázquez, M, et F Piferrer. 2004. « Cloning, sequence analysis, tissue distribution, and sex-specific expression of the neural form of P450 aromatase in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 219: 83-94.

Blázquez, M, S Zanuy, M Carrillo, et F Piferrer. 1998. « Structural and functional effects of early exposure to the estrogens estradiol 17- β and 17- α -ethinylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost (*Dicentrarchus labrax*) ». *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 37-47.

Bonnard, N, M Falcy, A Hesbert, D Jargot, F Pillière, O Schneider, et P Serre. 2006. *Plomb et composés minéraux. Fiche toxicologique*. 7439-92-1. INRS.

Braggins, P E, G M Trakshel, R K Kutty, et M D Maines. 1986. « Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: Comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141 (2): 528-33. doi:10.1016/S0006-291X(86)80205-4.

Bresch, H. 1982. « Investigation of the long-term action of xenobiotics on fish with special regard to reproduction ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 6 (1): 102-12. doi:10.1016/0147-6513(82)90085-9.

Bulger, W H, et D Kupfer. 1985. « Estrogenic activity of pesticides and other xenobiotics on the uterus and male reproductive tract ». *Endocrine Toxicology* 36: 31-52.

- Capdevila, M, R Bofill, Ò Palacios, et S Atrian. 2012. « State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of the 21st century ». *Coordination Chemistry Reviews* 256 (1–2): 46–62. doi:10.1016/j.ccr.2011.07.006.
- Chaube, R, S Mishra, et R K Singh. 2010. « In vitro effects of lead nitrate on steroid profiles in the post-vitellogenic ovary of the catfish *Heteropneustes fossilis* ». *Toxicology in Vitro* 24 (7): 1899–1904. doi:10.1016/j.tiv.2010.07.021.
- Cheng, S H, A W K Wai, C H So, et R S S Wu. 2000. « Cellular and Molecular Basis of Cadmium-Induced Deformities in Zebrafish Embryos ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (12): 3024–31. doi:10.1002/etc.5620191223.
- Cheshenko, K, F Pakdel, H Segner, O Kah, et R I L Eggen. 2008. « Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish ». *General and Comparative Endocrinology* 155 (1): 31–62. doi:10.1016/j.ygcen.2007.03.005.
- Commissariat général au développement durable Service de l'observation et des statistiques. 2011. « Environnement littoral et marin - Chapitre V : Pollution et qualité du milieu marin ». <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/06-8.pdf>.
- Correa, M C, M T Amano, et N O S Câmara. 2012. « Cytoprotection behind heme oxygenase-1 in renal diseases ». *WJN* 1 (1): 4–11.
- Costa, M C, P Semedo, A P F da Silva Monteiro, R L Pereira, G M Gonçalves, M A Cenedeze, A C G Faleiros, M A Dos Reis, A Pacheco-Silva, et N O S Câmara. 2009. « Cytoprotective role of heme oxygenase-1 upregulation in progressive renal disease ». *einstein* 7: 436–44.
- Courtney, A E, et A P Maxwell. 2008. « Heme Oxygenase 1: Does It Have a Role in Renal Cytoprotection? ». *American Journal of Kidney Diseases* 51 (4): 678–90. doi:10.1053/j.ajkd.2007.11.033.
- Das, R C. 1988. « Cadmium toxicity to gonads in freshwater fish, *Labeo bata* (Hamilton) ». *Archiv Fuer Hydrobiologie* 112: 467–74.
- Dave, G, K Andersson, R Berglund, et B Hasselrot. 1981. « Toxicity of eight solvent extraction chemicals and of cadmium to water fleas, *Daphnia Magna*, rainbow trout, *Salmo Gairdneri*, and Zebrafish, *Brachydanio Rerio* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 69 (1): 83–98. doi:10.1016/0306-4492(81)90105-2.
- Dave, G, et R Xiu. 1991. « Toxicity of Mercury, Copper, Nickel, Lead, and Cobalt to Embryos and Larvae of zebrafish, *Brachydanio Rerio* ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 21 (1): 126–34. doi:10.1007/BF01055567.
- Davies, P H, J P Goettl Jr., J R Sinley, et N F Smith. 1976. « Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout *salmo gairdneri*, in hard and soft water ». *Water Research* 10 (3): 199–206. doi:10.1016/0043-1354(76)90128-7.

- Della Torre, C, A Tornambè, S Cappello, M Mariottini, G Perra, S Giuliani, E Amato, et al. 2012. « Modulation of CYP1A and genotoxic effects in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to weathered oil: A mesocosm study ». *Marine Environmental Research*, Emerging and persistent impacts on Marine Organisms: Detection methods and action mechanisms, 76 (mai): 48-55. doi:10.1016/j.marenvres.2011.08.006.
- De Maio, A. 1995. « The heat shock response ». *New Horizons* 3: 198-207.
- De Smet, H, R Blust, et L Moens. 2001. « Cadmium-binding to transferrin in the plasma of the common carp *Cyprinus carpio* ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128 (1): 45-53. doi:10.1016/S1532-0456(00)00171-X.
- « *Dicentrarchus labrax* ». 2013. *FishBase*. Consulté le mai 9. <http://www.fishbase.us/summary/Dicentrarchus-labrax.html>.
- Diotel, N, J L Do Rego, I Anglade, C Vaillant, E Pellegrini, H Vaudry, et O Kah. 2011. « The Brain of Teleost Fish, a Source, and a Target of Sexual Steroids ». *Frontiers in Neuroscience* 5: 137. doi:10.3389/fnins.2011.00137.
- Eaton, J G, J M McKim, et G W Holcombe. 1978. « Metal Toxicity to Embryos and Larvae of Seven Freshwater Fish Species--I. Cadmium ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 19 (1): 95-103.
- Ebrahimi, M, et M Taherianfard. 2009. « Concentration of Four Heavy Metals (cadmium, Lead, Mercury, and Arsenic) in Organs of Two Cyprinid Fish (*Cyprinus Carpio* and *Capoeta Sp.*) from the Kor River (Iran) ». *Environmental Monitoring and Assessment* 168 (1-4): 575-85. doi:10.1007/s10661-009-1135-y.
- Edwards, T M, B C Moore, et L J Guillette. 2006. « Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view ». *International Journal of Andrology* 29: 109-21.
- El Heni, J, I Messaoudi, F Hammouda, et A Kerkeni. 2008. « Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver and kidney of the rat: Histology and Cd accumulation ». *Food and Chemical Toxicology* 46 (11): 3522-27. doi:10.1016/j.fct.2008.08.037.
- Ellis, R J, M R van den Heuvel, T R Stuthridge, L H Mc Carthy, N Ling, I D Hogg, et DR Dietrich. 2001. « Androgenic responses in two fish species following exposure to a New Zealand pulp and paper mill wastewaters ». In *Toxicological Sciences*, 60 (1):771-771. Toxicol.Sci. USA.
- Enes, P, S Panserat, S Kaushik, et A Oliva-Teles. 2006. « Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 145: 73-81.
- EU. 2012. *Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures*.

Ewing, J F, S N Haber, et M D Maines. 2012. « Normal and Heat-Induced Patterns of Expression of Heme Oxygenase-1 (HSP32) in Rat Brain : Hyperthermia Causes Rapid Induction of mRNA and Protein ». *Journal of Neurochemistry* 58 (3): 1140-49.
Consulté le mars 23. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=5199051>.

Ewing, J F, et M D Maines. 1991. « Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88: 5364-68.

Felip, A, S Zanuy, B Muriach, J M Cerdá-Reverter, et Manuel Carrillo. 2008. « Reduction of sexual maturation in male *Dicentrarchus labrax* by continuous light both before and during gametogenesis ». *Aquaculture* 275 (1-4): 347-55.
http://journals.ohiolink.edu/ejc/article.cgi?issn=00448486&issue=v275i1-4&article=347_rosimimlbbadg.

Filby, A L, K L Thorpe, G Maack, C R Tyler. 2007. « Gene expression profiles revealing the mechanisms of anti-androgen- and estrogen-induced feminization in fish ». *Aquatic Toxicology* 81: 219-231

Fossi, M C, S Casini, S Ancora, A Moscatelli, A Ausili, et G Notarbartolo-Di-Sciara. 2001. « Do endocrine disrupting chemicals threaten Mediterranean swordfish Preliminary results of vitellogenin and zona radiata proteins in *Xiphias gladius* ». *Marine Environmental Research* 52: 477-83.

Fossi, M C, S Casini, L Marsili, S Ancora, G Neri, T Romeo, A Moscatelli, A Ausili, et G Notarbartolo Di Sciara. 2002. « Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish ». *Marine environmental research* 54: 667-71.

Francis, R C. 1992. « Sexual lability in teleosts: developmental factors ». *The Quarterly Review of Biology* 67: 1-18.

Fritsch, M. 2005. « Traits biologiques et exploitation du bar commun *Dicentrarchus labrax* (L.) dans les pêcheries françaises de la Manche et du golfe de Gascogne. » Université de Bretagne Occidentale. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1088/>.

García-López, P, J Bogerd, J C Granneman, W van Dijk, J M Trant, et R W Schulz. 2009. « Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish ». *Endocrinology* 150: 357-65.

Garcia, T I, Y Shen, D Crawford, M F Oleksiak, A Whitehead, et R B Walter. 2012. « RNA-Seq Reveals Complex Genetic Response to Deepwater Horizon Oil Release in *Fundulus Grandis* ». *BMC Genomics* 13 (1): 474. doi:10.1186/1471-2164-13-474.

Gillis, H. 2011. « Changement global et dynamique de sélection d'habitat de reproduction d'un oiseau nichant au sol cas du busard cendre en milieu agricole intensif ». Université Pierre et Marie Curie-Paris VI. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00660268/>.

- Gimeno, S, H Komen, A G M Gerritsen, et T Bowmer. 1998a. « Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation ». *Aquatic Toxicology* 43: 77-92.
- Gimeno, S, H Komen, S Jobling, J Sumpter, et T Bowmer. 1998b. « Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis ». *Aquatic Toxicology* 43: 93-109.
- González-Martínez, D, T Madigou, N Zmora, I Anglade, S Zanuy, Y Zohar, A Elizur, J A Muñoz-Cueto, et O Kah. 2001. « Differential Expression of Three Different Prepro-GnRH (gonadotrophin-Releasing Hormone) Messengers in the Brain of the European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) ». *The Journal of Comparative Neurology* 429 (1): 144-55. doi:10.1002/1096-9861(20000101)429:1<144::AID-CNE11>3.0.CO;2-B.
- González-Martínez, D, N Zmora, S Zanuy, C Sarasquete, A Elizur, O Kah, et J A Muñoz-Cueto. 2002. « Developmental Expression of Three Different Prepro-GnRH (gonadotrophin-Releasing Hormone) Messengers in the Brain of the European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) ». *Journal of Chemical Neuroanatomy* 23 (4): 255-67.
- Grande, M., et S Andersen. 1983. « Lethal Effects of Hexavalent Chromium, Lead and Nickel on Young Stages of Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L.) in Soft Water ». *Vatten* v. 39(4) p. 405-416. <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=1984/SE/SE84002.xml;SE8410684>.
- Gray, M A, et C D Metcalfe. 1997. « Induction of testis-ova in Japanese medaka *Oryzias latipes* exposed to p-nonylphenol ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1082-86.
- Gronen, S, N Denslow, S Manning, S Barnes, D Barnes, et M Brouwer. 1999. « Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol ». *Environmental Health Perspectives* 107: 385-90.
- Guéguen, Y, K Mouzat, L Ferrari, E Tissandie, J M A Lobaccaro, A M Batt, F Paquet, P Voisin, J Aigueperse, et P Gourmelon. 2006. « Les cytochromes P450: métabolisme des xénobiotiques, régulation et rôle en clinique ». In *Annales de Biologie Clinique*, 64:535-48. <http://www.jle.com/fr/revues/medecine/mca/e-docs/00/04/26/7C/resume.phtml>.
- Guerrero, R D, et W L Shelton. 1974. « An aceto-carmin squash method for sexing juvenile fishes. »
- Guillette, L J, et A D Crain. 2000. *Environmental Endocrine Disruptors: an Evolutionary Perspective*. Taylor & Francis. New York 355.
- Guillette, L J, et M P Gunderson. 2001. « Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants ». *Reproduction* 122: 857-64.

Gunderson, M P, G A LeBlanc, et L J Guillette. 2001. « Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes ». *Environmental Health Perspectives* 109: 1257-64.

Hachfi, L, R Simide, S Richard, S Couvray, S Coupe, S Gaillard, S Pierre, J P Grillasca, et N Prevot-D'Alvise. 2012. « Effect of Water Temperature Increase on HO-1 Expression in European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax* L.) Tissues ». *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* Suppl.58: OL1752-56.

Harries, J E, A Janbakhsh, S Jobling, P Matthiessen, J P Sumpter, et C R Tyler. 1999. « Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the UK ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 932-37.

Harries, J E, D A Sheahan, et S Jobling. 1997. « Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 534-41.

Heise, K, S Puntarulo, M Nikinmaa, D Abele, et H O Pörtner. 2006. « Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. ». *Journal of experimental biology* 209 (2): 353-63.

Henson, M C, et P J Chedrese. 2004. « Minireview. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction ». *Experimental Biology and Medicine* 229: 383-92.

Hillewaert, H. 2005. *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Own work. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dicentrarchus_labrax_\(Belgium\).jpg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dicentrarchus_labrax_(Belgium).jpg).

Holcombe, G W, D A Benoit, E N Leonard, et J M McKim. 1976. « Long-Term Effects of Lead Exposure on Three Generations of Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33 (8): 1731-41. doi:10.1139/f76-220.

Howell, W M, D A Black, et S A Bortone. 1980. « Abnormal expression of secondary sex characteristics in a population of Mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally induced masculinization ». *Copeia* 4: 676-81.

Hwang, U G, N Kagawa, et Y Mugiya. 2000. « Aluminium and Cadmium Inhibit Vitellogenin and Its mRNA Induction by Estradiol-17 Beta in the Primary Culture of Hepatocytes in the Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss* ». *General and Comparative Endocrinology* 119 (1): 69-76. doi:10.1006/gcen.2000.7494.

Ifremer, Laboratoire Environnement Ressources de Normandie. 2012. *Qualité du Milieu Marin Littoral, Bulletin de la surveillance 2011*. http://envlit.ifremer.fr/content/download/81233/556285/version/2/file/Bull_pb_2012.pdf.

ILZSG. 2004. « International Lead and Zinc Study Group ».

<http://www.ilzsg.org/static/statistics.aspx?from=2>.

Immenshuh, S, et G Ramadori. 2000. « Gene Regulation of Heme Oxygenase-1 as Therapeutic Target ». *Biochemical Pharmacology* 60: 1121-28.

INERIS. 2003. *PLOMB ET SES DÉRIVÉS. Fiche des données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*.

———. 2011. *Cadmium et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques*.

inserm. 2011. « Effets de xénobiotiques sur la reproduction ». www.ipubli.inserm.fr.
http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Intro_Partie_3.html.

Jalabert, B, J F Baroiller, B Breton, A Fostier, F Le Gac, Y Guiguen, et G Monod. 2000. « Main neuro-endocrine, endocrine and paracrine regulations of fish reproduction, and vulnerability to xenobiotics ». *Ecotoxicology* 9: 25-40.

Jean, N, E Dumont, G Durrieu, T Balliau, J L Jamet, S Personnic, et C Garnier. 2012. « Protein Expression from Zooplankton Communities in a Metal Contaminated NW Mediterranean Coastal Ecosystem ». *Marine Environmental Research* 80 (septembre): 12-26. doi:10.1016/j.marenvres.2012.06.004.

Jensen, K M, M D Kahl, E A Makynen, J J Korte, R L Leino, B C Butterworth, G T Ankley. 2004. « Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow ». *Aquatic Toxicology* 70: 99-110.

Jewett, S C, T A Dean, B R Woodin, M K Hoberg, et J J Stegeman. 2002. « Exposure to Hydrocarbons 10 Years after the Exxon Valdez Oil Spill: Evidence from Cytochrome P4501A Expression and Biliary FACs in Nearshore Demersal Fishes ». *Marine Environmental Research* 54 (1): 21-48. doi:10.1016/S0141-1136(02)00093-4.

Jian, Z, K Li, L Liu, Y Zhang, Z Zhou, C Li, et T Gao. 2011. « Heme Oxygenase-1 Protects Human Melanocytes from H₂O₂-Induced Oxidative Stress via the Nrf2-ARE Pathway ». *The Journal of Investigative Dermatology* 131 (7): 1420-27. doi:10.1038/jid.2011.56.

Jobling, S, S Coey, J G Whitmore, D E Kime, K J W van Look, B G McAllister, N Beresford, et al. 2002b. « Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility ». *Biology of Reproduction* 67: 515-24.

Jobling, S, M Nolan, C R Tyler, G Brighty, et J P Sumpter. 1998. « Widespread sexual disruption in wild fish ». *Environmental Science & Technology* 32: 2498-2506.

Jobling, S, T Reynolds, R White, M G Parker, et J P Sumpter. 1995. « A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic ». *Environmental Health Perspectives* 103 (6): 582-87.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519124/>.

- Jobling, S, et J P Sumpter. 1993. « Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ». *Aquatic Toxicology* 27: 361-72.
- Jolly, C. 2007. « The three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a bioindicator species for the identification of (anti-)androgenic compounds ». Dissertation. University of Bergen, Norway, Bergen.
- JOCE. 2004. *Commission Directive 2004/73/EC, 29th time Council directive 67/548EEC. Official Journal of the European Communities.*
- Jolly, C, I Katsiadaki, N Le Belle, I Mayer, et S Dufour. 2006. « Development of a Stickleback Kidney Cell Culture Assay for the Screening of Androgenic and Anti-Androgenic Endocrine Disrupters ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 79 (2): 158-66. doi:10.1016/j.aquatox.2006.06.005.
- Jones, I, C Lindberg, S Jakobsson, A Hellqvist, U Hellman, B Borg, et P E Olsson. 2001. « Molecular Cloning and Characterization of Spiggin. An Androgen-Regulated Extraorganismal Adhesive with Structural Similarities to von Willebrand Factor-Related Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (21): 17857-63. doi:10.1074/jbc.M101142200.
- Joy, K P, B Senthilkumaran, et C C Sudhakumari. 1998. « Periovulatory changes in hypothalamic and pituitary monoamines following GnRH analogue treatment in the catfish *Heteropneustes fossilis*: a study correlating changes in plasma hormone profiles ». *Journal of Endocrinology* 156: 365-72.
- Katsiadaki, I, S Morris, C Squires, M R Hurst, J D James, et A P Scott. 2006. « Use of the Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus Aculeatus*) as a Sensitive in Vivo Test for Detection of Environmental Antiandrogens ». *Environmental Health Perspectives* 114 Suppl 1 (avril): 115-21.
- Kavlock, R J, G P Daston, C DeRosa, P Fenner-Crisp, L E Gray, S Kaatari, G Lucier, et al. 1996. « Research needs for the risk assessment of endocrine disruptors: a report of the US-EPA sponsored workshop ». *Environmental Health Perspectives* 102 (Suppl. 4): 715-40.
- Kenyon, E M, L M Del Razo, M F Hughes, et K T Kitchin. 2005. « An integrated pharmacokinetic and pharmacodynamic study of arsenite action: 2. Heme oxygenase induction in mice ». *Toxicology* 206 (3): 389-401. doi:10.1016/j.tox.2004.08.003.
- Khan, I A, et P Thomas. 2000. « Lead and Aroclor 1254 disrupt reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker ». *Marine Environmental Research* 50: 119-23.
- . 2001. « Disruption of neuroendocrine control of luteinizing hormone secretion by Aroclor 1254 involves inhibition of hypothalamic tryptophan hydroxylase activity ». *Biology of Reproduction* 64: 955-64.

- Khiri, H, et J Torresani. 1996. « SPOT14: clonage du gène chez la souris : étude des régulations de ce gène par RT-PCR quantitative ». [S.l.]: Uni.
- Kim, D S, H J Cho, I C Bang, G C Choi, et Y K Nam. 2001. « Effects of immersion of larvae in oestradiol-17 beta on feminization, structural changes of gonad and growth performance in the Far Eastern catfish *Silurus asotus* (Linnaeus) ». *Aquaculture Research* 32: 323-28.
- Kime, D E. 1999.« A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction ». *The Science of the Total Environment* 225: 3-11.
- Kiparissis, Y, T L Metcalfe, G C Balch, C D Metcalfe. 2003. « Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) ». *Aquatic Toxicology* 63: 391-403.
- Kirubakaran, R, B Senthilkumaran, C C Sudhakumari, et K P Joy. 2005. « Seasonal dynamics in gonadotropin secretion and E2-binding in the catfish *Heteropneustes fossilis* ». *Fish Physiology and Biochemistry* 31: 183-88.
- Kobayashi, M A, Y C H Sohn, Y A Yoshiura, et K A Aida. 2000. « Effects of Sex Steroids on the mRNA Levels of Gonadotropin Subunits in Juvenile and Ovariectomized Goldfish *Carassius Auratus* ». *Fisheries Science* 66 (2): 223-31. doi:10.1046/j.1444-2906.2000.00038.x.
- Kobayashi, T, H Kajiura-Kobayashi, et Y Nagahama. 2003. « Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia ». *Cytogenetic and Genome Research* 101: 289-94.
- Kwak, H J, M O Bae, M H Lee, Y S Lee, B J Lee, K S Kang, C H Chae, et al. 2001. « Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 787-95.
- Kwon, J Y, V Haghpanah, L M Kogson-Hurtado, B J McAndrew, et D J Penman. 2000. « Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation ». *Journal of Experimental Zoology* 287: 46-53.
- Lam, S H, S Mathavan, Y Tong, H Li, R K M Karuturi, Y Wu, V B Vega, E T Liu, et Z Gong. 2008. « Zebrafish Whole-Adult-Organism Chemogenomics for Large-Scale Predictive and Discovery Chemical Biology ». *PLoS Genet* 4 (7): e1000121. doi:10.1371/journal.pgen.1000121.
- Lapointe, D, F Pierron, et P Couture. 2011. « Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*) ». *Aquatic Toxicology* 104 (1-2): 80-85. doi:10.1016/j.aquatox.2011.02.022.
- Larkin, P, I Knoebl, et N D Denslow. 2003. « Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds ». *Comparative Biochemistry and*

- Larsson, D G J, M Adolfson-Erici, J Parkkonen, M Pettersson, A H Berg, P E Olsson, et L Förlin. 1999. « Ethinyloestradiol - an undesired fish contraceptive? ». *Aquatic Toxicology* 45: 91-97.
- Lee, K W, Z Chang, B S Oh, M Lu, et J S Park. 2010. « Estrogenic Response in Male Bullfrog (*Rana Catesbeiana*) Hepatocytes after Single or Combined Exposure to Cadmium (Cd) and 17beta-Estradiol (E2) ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 85 (5): 452-56. doi:10.1007/s00128-010-0119-5.
- Legler, J, J L M Broekhof, A Brouwer, P H Lanser, A J Murk, P T Van der Saag, F C Vethaak, P Wester, D Zivkovic, et B Van der Burg. 2000. « A novel in vivo bioassay for (xeno-) estrogens using transgenic zebrafish ». *Environmental Science & Technology* 34: 4439-44.
- Le Guével, R, F G Petit, P LeGoff, R Métivier, Valotaire Y, et Pakdel F. 2000. « Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium ». *Biology of Reproduction* 63: 259-66.
- Liu, M Y, H Y Lai, B C Yang, M L Tsai, H Y Yang, et B M Huang. 2001. « The inhibitory effects of lead on steroidogenesis in MA-10 mouse Leydig tumor cells ». *Life sciences* 68 (8): 849-59.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320500009838>.
- Looper, M L, C A Lents, et R P Wettemann. 2003a. « Body condition at parturition and postpartum weight changes do not influence the incidence of short-lived corpora lutea in postpartum beef cows ». *Journal of Animal Science* 81: 2390-94.
- Looper, M L, J A Vizcarra, R P Wettemann, J R Malayer, T D Braden, R D Geisert, et G L Morgan. 2003b. « Influence of estradiol, progesterone, and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors, and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows ». *Journal of Animal Science* 81: 269-78.
- Louis, Y, C Garnier, V Lenoble, D Omanović, S Mounier, et I Pizeta. 2009. « Characterisation and Modelling of Marine Dissolved Organic Matter Interactions with Major and Trace Cations ». *Marine Environmental Research* 67 (2): 100-107. doi:10.1016/j.marenvres.2008.12.002.
- Lowe-Jinde, L, et A J Niimi. 1984. « Short-Term and Long-Term Effects of Cadmium on Glycogen Reserves and Liver Size in Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri* Richardson) ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13 (6): 759-64. doi:10.1007/BF01055940.
- Lye, C M, C L J Frid, et M E Gill. 1998. « Seasonal reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to sewage effluent ». *Marine Ecology Progress Series* 170: 249-60.

Lye, C M, C L J Frid, M E Gill, et D McCormick. 1997. « Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works ». *Marine Pollution Bulletin* 34: 34-41.

Mager, E M. 2011.« 4 - Lead ». In *Fish Physiology*, édité par Anthony P. Farrell and Colin J. Brauner Chris M. Wood, Volume 31, Part B:185-236. Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals. Academic Press.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1546509811310266>.

Maines, M D, et P E M Gibbs. 2005. « 30 some years of heme oxygenase: Fom a “molecular wrecking ball” to a “mesmerizing” trigger of cellular events ». *Biochemical and Biophysical research Communications* 338: 568-77.

Makynen, E A, M D Kahl, K M Jensen, J E Tietge, K L Wells, et G Van Der Kraak. 2000. « Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*) ». *Aquatic Toxicology* 48: 461-75.

Manna, P R, et D M Stocco. 2005. « Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences ». *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* 5: 93-108.

Marchand, M J, G M Pieterse, et I E J Barnhoorn. 2010. « Sperm Motility and Testicular Histology as Reproductive Indicators of Fish Health of Two Feral Fish Species from a Currently DDT Sprayed Area, South Africa ». *Journal of Applied Ichthyology* 26 (5): 707-14. doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01558.x.

Martinrobichaud, D J, R H Peterson, T J Benfey, et L W Crim. 1994. « Direct feminization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L) using 17 β -estradiol-enriched artemia as food ». *Aquaculture* 123: 137-51.

Mason, A Z, et K D Jenkins. 1995. « Metal detoxification in aquatic organisms ». In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, 479-608. John Wiley and Sons Ltd. London: Tessier A, Turner D R.

Mateos, J, E Mañanos, M Carrillo, et S Zanuy. 2002. « Regulation of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) Gene Expression by Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) and Sexual Steroids in the Mediterranean Sea Bass ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 132 (1): 75-86.

Matozzo, V, F Gagné, M G Marin, F Ricciardi, et C Blaise. 2008. « Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review ». *Environment International* 34 (4): 531-45. doi:10.1016/j.envint.2007.09.008.

Matta, M B, J Linse, C Cairncross, L Francendese, et R M Kocan. 2001. « Reproductive and transgenerational effects of methylmercury or Aroclor 1268 on *Fundulus heteroclitus* ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 327-35.

- McGeer, J C, S Niyogi, et D Scott Smith. 2011. « 3 - Cadmium ». In *Fish Physiology*, édité par Anthony P. Farrell and Colin J. Brauner Chris M. Wood, Volume 31, Part B:125-84. Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1546509811310254>.
- Melamed, P, H Rosenfeld, A Elizur, et Z Yaron. 1998. « Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C 1* 119 (1998): 325-38.
- Miles-Richardson, S R, V J Kramer, S D Fitzgerald, J A Render, B Yamini, S J Barbee, et J P Giesy. 1999a. « Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*) ». *Aquatic Toxicology* 47: 129-45.
- Miles-Richardson, S R, S L Pierens, K M Nichols, V J Kramer, E M Snyder, S A Snyder, J A Render, S D Fitzgerald, et J P Giesy. 1999b. « Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*) ». *Environmental Research* 80: 122-37.
- Mills, L G, R E Gutjahr-Gobell, R A Haebler, D J B Horowitz, S Jayaraman, R J Pruell, R A McKinney, G R Gardner, et G E Zarogian. 2001. « Effects of estrogenic (o,p0-DDT; octylphenol) and antiandrogenic (p; p0-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*) ». *Aquatic Toxicology* 52: 157-76. <http://cache.univ-tln.fr:2069/science/article/pii/S0166445X00001399>.
- Milnes, M R, D S Bermudez, T A Bryan, T M Edwards, M P Gunderson, I L V Larkin, B C Moore, et J L Guillette. 2006. « Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments ». *Environmental Research* 100: 3-17.
- Ministère de l'agriculture et de la pêche. 2007. *Plan Stratégique National- Periode 2007-2013*. <http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/PSN.pdf>.
- Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, et Ministère des affaires sociales et de la santé. 2013. *Rapport du groupe de travail relatif à l'élaboration d'une stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens*. <http://www.consultations-publiques.developpement-durable.gouv.fr/rapport-du-groupe-de-travail-relatif-a-l-elaboration-d-une-strategie-nationale-sur-les-perturbateurs-endocriniens/survey/145071>.
- Ministère de l'écologie, du développement durable, des transports et du logement. 2011. Bilan de présence des micropolluants dans les eaux littorales. http://www.eaufrance.fr/IMG/pdf/rapport_micropolluants20032009_201110.pdf.
- Min, K S, H J Lee, S H Kim, S K Lee, H R Kim, H O Pae, H T Chung, H I Shin, S K Lee, et E C Kim. 2008. « Hydrogen Peroxide Induces Heme Oxygenase-1 and Dentin Sialophosphoprotein mRNA in Human Pulp Cells ». *Journal of Endodontics* 34 (8):

- Mrugesh, T, L Dipa, et G Manishika. 2011. « Effect of lead on human erythrocytes: An in vitro study ». *Acta Poloniae Pharmaceutica* 66: 653-56.
https://ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2011/5/653.pdf.
- Munakata, A, et M Kobayashi. 2010. « Endocrine control of sexual behavior in teleost fish ». *General and Comparative Endocrinology*, Fish Reproduction, 165 (3): 456-68.
doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.011.
- Murphy, C A, K A Rose, et P Thomas. 2005. « Modelling vitellogenesis in female fish exposed to environmental stressors: predicting the effects of endocrine disturbance due to exposure to a PCB mixture and cadmium ». *Reproductive Toxicology* 19: 395-409.
- Nagae, M, F Kawasaki, Y Tanaka, N Ohkubo, T Matsubara, K Soyano, A Hara, K Arizono, A P Scott, et I Katsiadaki. 2007. « Detection and Assessment of Androgenic Potency of Endocrine-Disrupting Chemicals Using Three-Spined Stickleback, *Gasterosteus Aculeatus* ». *Environmental Sciences: An International Journal of Environmental Physiology and Toxicology* 14 (5): 255-61.
- Nagahama, Y. 1994. « Endocrine regulation of gametogenesis in fish ». *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-29.
- . 2005. « Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish ». *Fish Physiology and Biochemistry* 31: 105-9.
- Nagahama, Y, et M Yamashita. 2008. « Regulation of oocyte maturation in fish ». *Development, Growth & Differentiation* 50: 195-219.
- Nash, J P, D E Kime, L T M Van der Ven, P W Wester, F Brion, G Maack, P Stahlschmidt-Allner, et C R Tyler. 2004. « Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish ». *Environmental Health Perspectives* 112 (17): 1725-33. doi:10.1289/ehp.7209.
- National Aeronautics and space administration (NASA). « Key Indicators ». *Global Climate Change*. http://climate.nasa.gov/key_indicators.
- Navarro-Martín, L, M Blázquez, et F Piferrer. 2009. « Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation ». *General and Comparative Endocrinology* 160 (1): 3-11.
doi:10.1016/j.ygcen.2008.10.012.
- Nesatyy, V J, B V Rutishauser, R I Eggen, et M J Suter. 2005. « Identification of the estrogen receptor Cd-binding sites by chemical modification ». *Analyst*. 130: 1087-97.
- Nolan, M, S Jobling, G Brighty, J P Sumpter, et C R Tyler. 2001. « A histological description of intersexuality in the roach ». *Journal of Fish Biology* 58: 160-76.

- NRC. 1999. « Hormonally Active Agents in the Environment ». In . Washington, DC: National Academy Press.
- OECD, 2006.« Report of the validation of the 21-day fish screening assay for the detection of endocrine substances (phase 1b), series on testing and assessment ».Number 61, ENV/JM/MONO 29.
- Ohta, T, H Miyake, C Miura, H Kamei, K Aida, et T Miura. 2007. « Folliclestimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica* ». *Biology of Reproduction* 77: 970-77.
- Okuzawa, K, K Gen, M Bruysters, J Bogerd, Y Gothlif, Y Zohar, et H Kagawa. 2003. « Seasonal variations of the three gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels in brain of female red seabream ». *General and Comparative Endocrinology* 130: 324-32.
- Omanović, D, ž Kwokal, A Goodwin, A Lawrence, C E Banks, R G Compton, et š Komorsky-Lovrić. 2006. « Trace metal detection in Šibenik Bay, Croatia: Cadmium, lead and copper with anodic stripping voltammetry and manganese via sonoelectrochemistry. A case study ». *Journal of the Iranian Chemical Society* 3 (2): 128-39. doi:10.1007/BF03245940.
- OMS. 1993. « WHO | Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd edition ». *WHO*. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq2v1/en/.
- . 2002. *Rapport du PISC*.
- Orlando, E F, N D Denslow, L C Folmar, et L G Guillette. 1999. « A comparison of the reproductive physiology of largemouth bass, *Micropterus salmoides*, collected from the Escambia and Blackwater Rivers in Florida ». *Environmental Health Perspectives* 107: 199-204.
- Orlando, E F, et L J Jr Guillette. 2007. « Sexual dimorphic responses in wildlife exposed to endocrine disrupting chemicals ». *Environmental Research*, Scientific Group on Methodologies for the Safety Evaluation of Chemicals: Workshop 16--- Gender Differences and Human and Ecological Risk, 104 (1): 163-73. doi:10.1016/j.envres.2006.06.002.
- Ospina-Álvarez, N, et F Piferrer. 2008. « Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change ». *PLoS ONE* 3 (7): e2837. doi:10.1371/journal.pone.0002837.
- Oursel, B, C Garnier, G Durrieu, S Mounier, D Omanović, et Y Lucas. 2013. « Dynamics and fates of trace metals chronically input in a Mediterranean coastal zone impacted by a large urban area ». *Marine Pollution Bulletin* 69 (1–2): 137-49. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.01.023.
- Pachauri, R K. 2007. *Bilan 2007 des changements climatiques-Rapport de synthèse*.

Geneve, Suisse: GIEC.

- Palace, V P, R E Evans, K Wautier, C Baron, L Vandenbyllardt, W Vandersteen, et K Kidd. 2002. « Induction of vitellogenin and histological effects in wild fathead minnows from a lake experimentally treated with the synthetic estrogen, ethynylestradiol ». *Water Quality Research Journal of Canada* 37: 637-50.
- Pandya, C, P Pillai, L P Nampoothiri, N Bhatt, et S Gupta, S. 2012. « Effect of Lead and Cadmium Co-Exposure on Testicular Steroid Metabolism and Antioxidant System of Adult Male Rats ». *Andrologia* 44: 813-22. doi:10.1111/j.1439-0272.2010.01137.x.
- Panter, G H, T H Hutchinson, R Länge, M Zerulla, C M Lye, J P Sumpter, et C R Tyler. 2002. « Utility of a juvenile Fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 319-26.
- Parks, L G, C S Lambright, E F Orlando, L J J R Guillette, G T Ankley, et J R Gray LE. 2001. « Masculinization of female Mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway river water is associated with androgen receptor agonist activity ». *Toxicological Sciences* 62: 257-67.
- Parrot, J L, J J Jardine, B R Blunt, L H McCarthy, M E McMaster, C S Wood, J Roberts, et J H Carey. 1999. « Comparing biological responses to mill process changes: a study of steroid concentrations in goldfish exposed to effluent and waste streams from a Canadian bleached sulphite mill ». *Water Science and Technology* 40: 115-21.
- Peakall, D B. 1994. « The Role of Biomarkers in Environmental Assessment (1).Introduction ». *Ecotoxicology* 3 (3): 157-60. doi:10.1007/BF00117080.
- . 1999. « The Use of Biomarkers in Hazard Assessment ». In *Biomarkers: A Pragmatic Basis for Remediation of Severe Pollution in Eastern Europe*, édité par D B Peakall, C H Walker, et P Migula, 123-33. NATO Science Series 54. Springer Netherlands. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-4550-3_9.
- Peck, L S, K E Webb, et D M Bailey. 2004. « Extreme Sensitivity of Biological Function to Temperature in Antarctic Marine Species ». *Functional Ecology* 18 (5): 625-30. doi:10.1111/j.0269-8463.2004.00903.x.
- Penman, D J, et F Piferrer. 2008. « Fish Gonadogenesis. Part I: Genetic and Environmental Mechanisms of Sex Determination ». *Reviews in Fisheries Science* 16 (sup1): 16-34. doi:10.1080/10641260802324610.
- Pereira, J J, R Mercaldo-Allen, C Kuropat, D Luedke, et G Sennefelder. 1993. « Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*) ». *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 24: 427-31.
- Person-Le Ruyet, J, K Mahe, N Le Bayon, et H Le Delliou. 2004. « Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea

- bass, *Dicentrarchus labrax* ». *Aquaculture* 237 (1): 269-80.
- Person-Le Ruyet, J, K Mahé, N Le Bayon, et H Le Delliou. 2004. « Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* ». *Aquaculture* 237 (1-4): 269-80. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.04.021.
- Persson, B, M Krook, et H Jörnvall. 1991. « Characteristics of Short-Chain Alcohol Dehydrogenases and Related Enzymes ». *European Journal of Biochemistry* 200 (2): 537-43. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16215.x.
- Petersen, C, et O Söder. 2006. « The Sertoli cell - a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size ». *Hormone Research* 66: 153-61.
- Pickering, Q H, et M H Gast. 2011. « Acute and Chronic Toxicity of Cadmium to the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29 (8): 1099-1106. doi:10.1139/f72-164.
- Pierre, S. 2009. « Contribution à la pisciculture marine de demain- De la nécessité de diversifier les espèces et de contrôler la qualité sanitaire ». La Garde: Université du Sud Toulon Var.
- Pierre, S, S Coupé, N Prévot-D’Alvise, S Gaillard, S Richard, E Gouze, J Aubert, et J. P Grillasca. 2010. « Cloning of Wap65 in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) and expression in sea bass tissues ». *Comparative Biochemistry and Physiology* 155: 396-402.
- Pierre, S, K Tarnowska, L Hachfi, S Coupé, R Simide, S Couvray, C Garnier, et al. 2011. « Effects of water temperature increase and heavy metals contamination on Wap65 gene expression in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver ». *Cellular and Molecular Biology* 57: 1614-22.
- Piferrer, Francesc, Mercedes Blázquez, Laia Navarro, et Alicia González. 2005. « Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) ». *General and Comparative Endocrinology* 142 (1-2): 102-10. doi:10.1016/j.ygcen.2005.02.011.
- Pimstone, N R, P Engel, R Tenhunen, P T Seitz, H S Marver, et R Schmid. 1971. « Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism ». *The Journal of Clinical Investigation* 50 (10): 2042-50. doi:10.1172/JCI106697.
- Porte, C, G Janer, L C Lorusso, M Ortiz-Zarragoitia, M P Cajaraville, M C Fossi, et L Canesi. 2006. « Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143 (3): 303-15. doi:10.1016/j.cbpc.2006.03.004.
- Pörtner, H O. 2002. « Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in

- animals ». *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology* 132 (4): 739-61.
- Prévoit-D'Alvise, N, S Pierre, S Gaillard, E Gouze, J E Gouze, J Aubert, S Richard, et J P Grillasca. 2008. « cDNA sequencing and expression analysis of *Dicentrarchus labrax* heme oxygenase-1. ». *Cellular and molecular biology* 54: 46-54.
- Purdom, C E, P A Hardiman, V J Bye, N C Eno, C R Tyler, et J P Sumpter. 1994. « Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works ». *Chemical Ecology* 8: 275-85.
- Raghuveer, K, et B Senthilkumaran. 2009. « Identification of multiple *Dmrt1*s in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyltestosterone treatment ». *Journal of Molecular Endocrinology* 42: 437-48.
- Raju, V S, et M D Maines. 2002. « Coordinated expression and mechanism of induction of HSP32 (heme oxygenase-1) mRNA by hyperthermia in rat organs ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Gene Structure and expression* 1217: 273-80.
- Rani, A U. 2000. « Cadmium-Induced Bioaccumulation in the Selected Tissues of a Freshwater Teleost, *Oreochromis Mossambicus* (Tilapia) ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 919 (1): 318-20. doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06895.x.
- Rasband, W S. 1997. *ImageJ*. Bethesda, Maryland, USA: National Institutes of Health.
- Reis-Henriques, M A, M M Cruz, et J O Pereira. 1997. « The Modulating Effect of Vitellogenin on the Synthesis of 17 β -Estradiol by Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Ovary ». *Fish Physiology and Biochemistry* 16 (3): 181-86. doi:10.1023/A:1007784626784.
- Rempel, M A, et D Schlenk. 2008. « Effects of Environmental Estrogens and Antiandrogens on Endocrine Function, Gene Regulation, and Health in Fish ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Kwang W. Jean, Volume 267:207-52. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1937644808006059>.
- Renaut, S. 2011. « Etude Ecotoxicologique des impacts des Contaminations Métalliques et Organiques chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.), dans l'estuaire de la Gironde ». L'UNIVERSITE BORDEAUX 1. http://ori-oai.u-bordeaux1.fr/pdf/2011/RENAULT_SOPHIE_2011.pdf.
- Rocha, A, S Zanuy, M Carrillo, et A Gómez. 2009. « Seasonal Changes in Gonadal Expression of Gonadotropin Receptors, Steroidogenic Acute Regulatory Protein and Steroidogenic Enzymes in the European Sea Bass ». *General and Comparative Endocrinology* 162 (3): 265-75. doi:10.1016/j.ygcen.2009.03.023.
- Roche, H. 2011. « Perturbateurs endocriniens et écosystèmes ». *Médecine & Longévité* 3 (2): 56-60. doi:10.1016/j.mlong.2011.05.006.

- Rodgers-Gray, T P, S Jobling, C Kelly, S Morris, G Brighty, M J Waldock, J P Sumpter, et C R Tyler. 2001. « Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development ». *Environmental Science & Technology* 35: 462-70.
- Rogalska, J, B Pilat-Marcinkiewicz, et M M Brzóška. 2011. « Protective Effect of Zinc against Cadmium Hepatotoxicity Depends on This Bioelement Intake and Level of Cadmium Exposure: A Study in a Rat Model ». *Chemico-Biological Interactions* 193 (3): 191-203. doi:10.1016/j.cbi.2011.05.008.
- Rokushima, M, K Omi, K Imura, A Arari, N Furukawa, F Itoh, M Miyazaki, et al. 2007. « Toxicogenomics of drug-induced hemolytic anemia by analyzing gene expression profiles in the spleen ». *Toxicological Sciences* 100: 290-302.
- Rombough, P J. 1996. « The effects of temperature on embryonic and larval development ». In *Society for Experimental Biology Seminar Series 61: Global Warming Implications for Freshwater and Marine Fish.*, 177-223. Cambridge University Press: Wood, C M., McDonald, D G.
- Rombough, P J, et E T Garside. 1982. « Cadmium toxicity and accumulation in eggs and alevins of Atlantic salmon *Salmo salar* ». *Canadian Journal of Zoology* 60 (8): 2006-14. doi:10.1139/z82-258.
- Rosalba, G, E Papis, S Rimoldi, G Terova, M Saroglia, et G Bernardini. 2004. « Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) ». *Gene* 341: 111-18.
- Rössner, P J, B Binková, et R J Šrám. 2003. « Heat shock proteins hsp32 and hsp70 as biomarkers of an early response? In vitro induction of heat shock proteins after exposure of cell culture to carcinogenic compounds and their real mixtures ». *Mutation Research* 542: 105-16.
- Routledge, E J, D Sheahan, C Desbrow, G Brighty, M Waldock, et J P Sumpter. 1998. « Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach ». *Environmental Science & Technology* 32: 1559-65.
- Ryter, S W, J Alam, et A M K Choi. 2006. « Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications ». *Physiological reviews* 86 (2): 583-650.
- Ryter, S W, et R M Tyrrell. 2000. « The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. ». *Free Radical Biology and Medicine* 28: 289-309.
- Safe, S. 2000. « Endocrine disruptors and human health – is there a problem: an update ». *Environ. Health.Perspect.* 108: 487-93.
- . 2003. « Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor ». *Nature Medicine* 9: 1000-1001.

- Saillant, E, B Chatain, B Menu, C Fauvel, M O Vidal, et A Fostier. 2003. « Sexual Differentiation and Juvenile Intersexuality in the European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) ». *Journal of Zoology* 260 (1): 53-63. doi:10.1017/S0952836903003467.
- Santos, E M, M Rand-Weaver, et C R Tyler. 2001. « Follicle-stimulating hormone and its α and β subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassays, and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females ». *Biology of Reproduction* 65: 288-94.
- Santos, M M, M Solé, D Lima, B Hambach, A M Ferreira, et M A Reis-Henriques. 2010. « Validating a Multi-Biomarker Approach with the Shanny Lipophrys Pholis to Monitor Oil Spills in European Marine Ecosystems ». *Chemosphere* 81 (6): 685-91. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.065.
- Sarigiannis, D A, et U Hansen. 2012. « Considering the Cumulative Risk of Mixtures of Chemicals – A Challenge for Policy Makers ». *Environmental Health* 11 (Suppl 1): S18. doi:10.1186/1476-069X-11-S1-S18.
- Sarkar, A, et B Upadhyay. 2011. « Influence of photoperiod and temperature on reproduction and gonadal maturation in goldfish: *Carassius auratus* ». *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology* 2 (4): 352-58. <http://www.ijabpt.com/pdf/96047-bhavna%20upadhyay%5B1%5D.pdf>.
- Sauter, S, K S Buxton, K J Macek, et S R Petrocelli. 1976. *Effects of exposure to heavy metals on selected freshwater fish: toxicity of copper, cadmium, chromium and lead to eggs and fry of seven fish species*. Environmental Research Laboratory (Duluth. Ecological research series ;EPA-600/3-76-105. Duluth, Minn. : Springfield, Va.: U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory ; available through National Technical Information Service. <http://catalog.hathitrust.org/Record/001828183>.
- Schoenfuss, H L, J T Levitt, G Van der Kraak, et P W Sorensen. 2002. « Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive behavior and sperm production in goldfish ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2185-90.
- Scholz, S, et I Mayer. 2008. « Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 293: 57-70.
- Schreck, C B. 1974. « Hormonal treatment and sex manipulation in fishes. Control of Sex in Fishes ». In , Schreck CB, 84-106. Virginia Polytechnic Institute and State University Sea Grant Program.
- Scott, A P, I Katsiadaki, P R Witthames, K Hylland, I M Davies, A D McIntosh, et J Thain. 2006. « Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): a sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? ». *Marine Environmental Research* 61: 149-70.
- Sellin, M K, et A S Kolok. 2006. « Cadmium exposures during early development : do

- they lead to reproductive impairment in Fathead minnows ? ». *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 25 (11): 2957-63.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2763182/>.
- Senthilkumaran, B, K Okuzawa, K Gen, et H Kagawa. 2001. « Effects of Serotonin, GABA and Neuropeptide Y on Seabream Gonadotropin Releasing Hormone Release in Vitro from Preoptic-Anterior Hypothalamus and Pituitary of Red Seabream, Pagrus Major ». *Journal of Neuroendocrinology* 13 (5): 395-400.
- Sloman, K A. 2007. « Effects of trace metals on salmonid fish: The role of social hierarchies ». *Applied Animal Behaviour Science* 104: 326-45.
- Sohoni, P, C R Tyler, K Hurd, J Caunter, M Hetheridge, T Williams, C Woods, et al. 2001. « Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol a in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) ». *Environmental Science & Technology* 35: 2917-25.
- Sole', M, D Raldua, D Barcelo, et C Porte. 2003. « Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones, and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works ». *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 373-80.
- Soverchia, L, B Ruggeri, F Palermo, G Mosconi, G Cardinaletti, G Scortichini, G Gatti, et A M Polzonetti-Magni. 2005. « Modulation of Vitellogenin Synthesis through Estrogen Receptor Beta-1 in Goldfish (*Carassius Auratus*) Juveniles Exposed to 17-Beta Estradiol and Nonylphenol ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 209 (3): 236-43. doi:10.1016/j.taap.2005.04.013.
- Spehar, R L. 1976. « Cadmium and Zinc Toxicity to flagfish, *Jordanella floridae* ». *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33 (9): 1939-45. doi:10.1139/f76-247.
- Sreenivasulu, G, P Sridevi, P K Sahoo, I Swapna, W Ge, R Kirubakaran, A Dutta-Gupta, et B Senthilkumaran. 2009. « Cloning and expression of StAR during gonadal cycle and hCG-induced oocyte maturation of air-breathing catfish, *Clarias gariepinus* ». *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B* 154: 6-11.
- Stempel, S, M Scheringer, C A Ng, et K Hungerbühler. 2012. « Screening for PBT Chemicals among the “Existing” and “New” Chemicals of the EU ». *Environmental Science & Technology* 46 (11): 5680-87. doi:10.1021/es3002713.
- Strussmann, C A, F Takashima, et K Toda. 1996. « Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis* ». *Aquaculture* 139: 31-45.
- Swales, A K E, et N Spears. 2005. « Genomic Imprinting and ». *Reproduction* 130 (4): 389-99. doi:10.1530/rep.1.00395.
- Swanson, P, J T Dickey, et B Campbell. 2003. « Biochemistry and physiology of fish gonadotropins ». *Fish Physiology and Biochemistry* 28: 53-59.
- Swapna, I, et B Senthilkumaran. 2009. « Influence of Ethynylestradiol and

- Methyltestosterone on the Hypothalamo-Hypophyseal-Gonadal Axis of Adult Air-Breathing Catfish, *Clarias Gariepinus* ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 95 (3): 222-29. doi:10.1016/j.aquatox.2009.09.008.
- Taupeau, C, J Poupon, D Treton, A Brosse, Y Richard, et V Machelon. 2003. « Lead Reduces Messenger RNA and Protein Levels of Cytochrome p450 Aromatase and Estrogen Receptor Beta in Human Ovarian Granulosa Cells ». *Biology of Reproduction* 68 (6): 1982-88. doi:10.1095/biolreprod.102.009894.
- Tessier, E, C Garnier, J U Mullot, V Lenoble, M Arnaud, M Raynaud, et S Mounier. 2011. « Study of the Spatial and Historical Distribution of Sediment Inorganic Contamination in the Toulon Bay (France) ». *Marine Pollution Bulletin* 62 (10): 2075-86. doi:10.1016/j.marpolbul.2011.07.022.
- Themmen, A P N, et I T Huhtaniemi. 2000. « Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function ». *Endocrine Reviews* 21: 551-83.
- Thibaut, R, et C Porte. 2004. « Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish ». *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 92 (5): 485-94. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.10.008.
- Thiele, D J. 1992. « Metal-Regulated Transcription in Eukaryotes ». *Nucleic Acids Research* 20 (6): 1183-91. doi:10.1093/nar/20.6.1183.
- Thomas, P. 1990. « Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function ». *Journal of Experimental Zoology*. Suppl 4: 126-28.
- . 1999. « Non-traditional sites of endocrine disruption by chemicals on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis: interactions with steroid membrane receptors, monoaminergic pathways, and signal transduction systems ». In *Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems*, Naz RK. CRC Press. Boca Raton, FL.
- Thoreux-Manlay, A, C Le Goascogne, D Segretain, B Jégou, et G Pinon-Lataillade. 1995. « Lead Affects Steroidogenesis in Rat Leydig Cells in Vivo and in Vitro ». *Toxicology* 103 (1): 53-62.
- Tilton, S C, C M Foran, et W H Benson. 2003. « Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 136 C: 265-76.
- Toft, G, T M Edwards, E Baatrup, et Jr L J Guillette. 2003. « Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disrupters ». *Environmental Health Perspectives* 1: 1.
- Tollefsen, K E. 2002. « Interaction of Estrogen Mimics, Singly and in Combination, with Plasma Sex Steroid-Binding Proteins in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 56 (3): 215-25.

- Tyler, C R, R vanAerle, T H Hutchinson, S Maddix, et Trip H. 1999. « An in vivo testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 337-47.
- Tyrrell, R M, et V E Reeve. 2006. « Potential protection of skin by acute UVA irradiation—From cellular to animal models ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92 (1): 86-91. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2006.02.002.
- United Nations. 2013. *Unep Year Book 2013: Emerging Issues in Our Global Environment*. [S.l.]: United Nations Pubns.
- USEPA. 1998. *Endocrine disruptor screening and testing advisory committee (EDSTAC) final report*. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Washington,DC: US Environmental Protection Agency.
<http://www.epa.gov/scipoly/ospendo/pubs/edspoverview/finalrpt.htm>.
- Van Cleef-Toedt, K A, L A Kaplan, et J F Crivello. 2001. « Killifish metallothionein messenger RNA expression following temperature perturbation and cadmium exposure ». *Cell stress & chaperones* 6: 351-59.
- Van den Belt, K, P W Wester, L T M Van der Ven, R Verheyen, et H Witters. 2002. « Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 767-75.
- Vašák, M. 1991. « Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins ». In *Methods in Enzymology*, édité par Bert L V James F R, Volume 205:452-58. Academic Press.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/007668799105130N>.
- Villeneuve, D L, L S Blake, J D Brodin, K J Greene, I Knoebl, A L Miracle, D Martinovic, G T Ankley. 2007. « Transcription of key genes regulating gonadal steroidogenesis in control and ketoconazole- or vinclozolin-exposed fathead minnows ». *Toxicological Sciences*, 98: 395-407.
- Vinggaard, A M, U Hass, M Dalgaard, H R Andersen, E Bonefeld-Jørgensen, S Christiansen, P Laier, et M E Poulsen. 2006. « Prochloraz: An Imidazole Fungicide with Multiple Mechanisms of Action ». *International Journal of Andrology* 29 (1): 186-92. doi:10.1111/j.1365-2605.2005.00604.x.
- Wang, D, X P Zhong, Z X Qiao, et J F Gui. 2008. « Inductive transcription and protective role of fish heme oxygenase-1 under hypoxic stress ». *Journal of Experimental Biology* 211 (16): 2700-2706.
- Wang, J, H Ma, P J Boor, V M Ramanujam, G A Ansari, et M F Khan. 2010. « Up-regulation of oxygenase-1 in rat spleen after aniline exposure ». *Free Radical Biology and Medicine* 48: 513-18.

- Watabe, S, K Kikuchi, et K Aida. 1993. « Cold and warm-temperature acclimation induces specific cytosolic protein in goldfish and carp ». *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 151-56.
- Watson, R A, et D Pauly. 2013. « The changing face of global fisheries—The 1950s vs. the 2000s ». *Marine Policy* 42 (novembre): 1-4.
doi:10.1016/j.marpol.2013.01.022.
- Wester, P W, et J H Kim. 1986. « Histopathological study of *Oryzias latipes* medaka after long-term b-hexachlorocyclohexane exposure ». *Aquatic Toxicology* 9: 21-45.
- Wheeler, D S, et H R Wong. 2007. « Heat shock response and acute lung injury ». *Free Radical Biology and Medicine* 42: 1-14.
- WHO, World Health Organization. 2002. « Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors ». In *Report WHO/PCS/EDC/02*, Damstra T, Barlow S, Bergman A, Kavlock R, Van Der Kraak G, 2:180.
- Xiong, F, D Liu, Y Le Drean, H P Elsholtz, et C L Hew. 1994. « Differential recruitment of steroid hormone response elements may dictate the expression of the pituitary gonadotropin II β subunit gene during salmon maturation ». *Mol. Endocrinol.* 8 (6): 782-93.
- Yamaguchi, S, C Miura, A Ito, T Agusa, H Iwata, S Tanabe, B C Tuyen, et T Miura. 2007. « Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and in vitro experiment ». *Aquatic Toxicology* 83 (1): 43-51. doi:10.1016/j.aquatox.2007.03.010.
- Yamazaki, F. 1983. « control and manipulation in fish ». *Aquaculture* 33: 329-54.
- Ye, L, S Y Yang, X M Zhu, M Liu, J Y Lin, et K C Wu. 2011. « Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes) ». *Acta Ecologica Sinica* 31 (5): 241-45. doi:10.1016/j.chnaes.2011.06.003.
- Yet, S F, M A Perrella, M D Layne, C M Hsieh, K Maemura, L Kobzik, P Wiesel, H Christou, S Kourembanas, et M E Lee. 1999. « Hypoxia Induces Severe Right Ventricular Dilatation and Infarction in Heme Oxygenase-1 Null Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 103 (8): R23-29. doi:10.1172/JCI6163.
- Yokota, H, Y Tsuruda, M Maeda, Y Oshima, H Tadokoro, A R Nakazono, T Honjo, et K Kobayashi. 2000. « Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 19: 1925-30.
- Zanuy, S, M Carrillo, A Felip, L Rodríguez, M Blázquez, J Ramos, et F Piferrer. 2001. « Genetic, hormonal and environmental approaches for the control of reproduction in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) ». *Aquaculture* 202 (3-4): 187-203.
doi:10.1016/S0044-8486(01)00771-2.

- Zerulla, M, R Länge, T Steger-Hartmann, G Panter, et D R Dietrich. 2002. « Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*) ». *Toxicology Letters* 131: 51-63.
- Zhang, L, I A Khan, et C M Foran. 2002. « Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 132: 203-11.
- Zhang, X, M Hecker, J W Park, A R Tompsett, J Newsted, K Nakayama, P D Jones, et al. 2008. « Real-time PCR array to study effects of chemicals on the Hypothalamic–Pituitary–Gonadal axis of the Japanese medaka ». *Aquatic Toxicology* 88: 173-82.
- Zillioux, E J, I C Johnson, Y Kiparissis, C D Metcalfe, J V Wheat, S G Ward, et H Liu. 2001. « The sheepshead minnow as an in vivo model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17 α -ethynylestradiol ». *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1968-78.
- Zohar, Y, J A Muñoz-Cueto, A Elizur, et O Kah. 2010. « Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish ». *General and Comparative Endocrinology* 165 (3): 438-55. doi:10.1016/j.ygcen.2009.04.017.

Publications



EFFECTS OF WATER TEMPERATURE INCREASE AND HEAVY METALS CONTAMINATION ON WAP65 GENE EXPRESSION IN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax*) LIVER

S. PIERRE^{1,*}, K. TARNOWSKA^{1,*}, L. HACHFI¹, S. COUPÉ¹, R. SIMIDE¹, S. COUVRAY^{1,2},
C. GARNIER³, M. GRIMALDI⁴, S. RICHARD¹, S. GAILLARD¹, N. PRÉVOT-D'ALVISE¹ AND
J. P. GRILLASCA¹✉

1 Équipe de Biologie Moléculaire Marine - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France.

2 Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez- Le Brusuc, 83140 Six Fours Les Plages, France.

3 Équipe CAPTE - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France.

4 Équipe ISO - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France.

Abstract

It has been previously demonstrated that “Warm temperature Acclimation-related 65kD Protein” (WAP65) is involved in temperature acclimation, response to intoxication and infection, as well as in development. The expression of wap65-1 was investigated in the liver of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during exposure to the increased temperature (from 12 °C to 30 °C) and during intoxication with four heavy metals: lead, cadmium, copper and zinc. Post temperature increase wap65 expression was highest after one hour at 30 °C. After 1 to 4 weeks at 30 °C wap65 transcript levels did not differ from the 12°C control group, similar to observations regarding the heat shock protein, hsp70. Upregulation of wap65 was detected after treatment (intoxication) with cadmium (0.5 µg/l). In contrast, a slight, but significant down regulation of wap65 was seen after copper (5 µg/l) intoxication. These data indicate that functional analyses of WAP65 are needed to understand the differential regulation of this gene by metals. The role of WAP65 may be similar to that of HSP70, which has generalized functions in responding to certain stressors and maintaining normal cell physiology.

Key words: *Dicentrarchus labrax*, gene expression, hsp70, RNA, wap65, Warm Temperature Acclimation-related.

Article information's

Received on September 14, 2011

Accepted on October 18, 2011

Corresponding author

Professor J. P. Grillasca
Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France Tel: +33 (0) 4 94142401
Fax: +33 (0) 4 94142045
E-mail: grillasca@univ-tln.fr

* The first two authors contributed equally to this project and should be considered co-first authors.

Abbreviations: ATP: adenosine triphosphate; Cd: cadmium; Co: cobalt; Cu: copper; DPASV: Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry; GST: glutathione S-transferase; HDPE: high-density polyethylene; Hg: mercury; HSP: heat shock protein; MT: metallothionein; Ni: nickel; PAH: polycyclic aromatic hydrocarbon; Pb: lead; PCB: polychlorobiphenyl; PCR: Polymerase Chain Reaction; TBT: tributyltin; UV: ultraviolet; WAP65: Warm temperature Acclimation-related 65kD Protein; Zn: zinc.

INTRODUCTION

Changes in marine environmental conditions include both natural events, e.g. temperature fluctuations (long-term such as global warming, and short-term seasonal variations), and anthropogenic actions such as chemical contamination. Among pollutants, metals are of a great importance. Their sources in aquatic environment are various, but significant contributions are man-made. Metals concentrations in marine environments are often relatively high, because their elimination in wastewater treatment plants is often limited (4).

Due to environmental changes, multiple dynamic equilibrium regulation mechanisms in marine organisms are aimed at maintaining efficient and optimal behavior in new environmental conditions (reestablishing homeostasis). Therefore, a variety of responses on cellular and molecular levels occurs. Natural

changes in environmental conditions such as seasonal changes in water temperature provoke acclimatory responses. In poikilothermic fish, such as the European sea bass, this response involves, among others, regulation of a set of genes that includes myosin, lactate dehydrogenase, Δ^9 -desaturase, warm temperature acclimation-related 65kDa protein gene (wap65) and ATP synthase (in cold temperature) (23 and references therein, 39). Responses and adaptations differ in case of sudden temperature perturbations, which provoke short-term adjustments, exemplified by the production of heat shock proteins (HSPs) (18). Water composition also influences the quality of commercially valuable fish, because of the accumulation of the pollutants inside the body (3,7,9). Contamination with metals has a profound effect on gene expression patterns in fish. One of the responses to metal intoxication is the upregulation of metallothioneins (MT), which can mitigate the harmful effects of various metals (19). Moreover, cytochrome P4501A, vitellogenin and heat shock proteins have been examined in several metal toxicity studies on fish (43).

On the basis of responses to environmental perturbations, different biomarkers have been proposed in order to assess exposure of aquatic organisms to pollutants and to identify certain substances with low concentrations levels (34, for fish reviewed in 44). There is a strong interest in finding novel genetic markers to monitor environmental perturbations that may affect fish. It is especially important for species with important commercial value like the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), in order to assure high fish quality. In 2009, the global sea bass capture fisheries production was ~11 933 tons with France accounting for 57% of the production (10). In the past 25 years aquaculture of this species has developed rapidly, reaching a global production amount of ~113 653 tons in 2009.

It has been shown that in fish the expression of the gene coding for WAP65, the “Warm temperature Acclimation-related 65kDa Protein” changes as a result of environmental perturbations. However, its function has yet to be fully characterized. It resembles mammalian hemopexin (in amino acid sequence and functional sites), a gene encoding a plasma glycoprotein that is synthesized in the liver and functions as a scavenger of free heme. In contrast to the single isoform of hemopexin found in mammals, there are two paralogous wap65 genes

in fish (wap65-1, wap65-2) (6 and references therein), presumably as a result of the teleost whole genome duplication event (2). These forms probably differ in function. The evolution rate of wap65-2 is much lower than the one of wap65-1 and its tissue distribution restricted (mainly liver). Therefore, it is more similar to mammalian hemopexin. WAP65 in fish is known to play a role in the warm temperature acclimatory response. The protein (or mRNA coding for it) has been found in goldfish (*Carassius auratus*) and carp (*Cyprinus carpio*) acclimated to 30°C for at least 1 month (21,23,45). It also appeared in the muscle tissues of goldfish within 5 days of high temperature exposure and was maintained at high concentrations for at least 9 days (20). Increased wap65-1 mRNA levels were also found in liver within four hours after exposure to 30°C, with maximum expression observed after 3 days. After 3 weeks wap65 transcript levels diminished, but remained 10 times higher than before the warm water exposure (22). The role of WAP65 in acclimatory processes appears to vary considerably among fish, as significant upregulation of this gene was not recorded in pufferfish (*Takifugu rubripes*) and medaka (*Oryzias latipes*) exposed to high water temperature for one month (14,15).

Moreover, it was demonstrated that wap65 expression levels change in reaction to pathogen infections (e.g. 38,39,40), during fish development (15,29,38) and in the reaction to intoxication with certain heavy metals and other pollutants (1,25,26). However, in comparison to the number of studies concerning wap65 expression after water temperature increase, knowledge concerning regulation of this gene after intoxication with pollutants remains scarce.

In the present study we investigated: (i) the delay between the temperature increase and the change in wap65 expression, and (ii) wap65 expression in reaction to heavy metal intoxication.

MATERIALS AND METHODS

Animals and aquariums

All experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care under the appropriate approved animal care protocol described in «the care and use of fish in research, teaching and testing». Fish used for our experiments were collected from a fish farm located on the Mediterranean coast at La Seyne sur Mer (south of France), where they were kept in floating cages in natural environmental conditions and fed once a day *ad libitum* with commercial fish diet (Le Gouessant, France). One year old sea bass fish (average weight of 80–

100 g) were used for the experiments. Experiments were conducted in 150 L aquariums filled with sea water. The sea water was filtered with a mechanical silica filter, sterilized with ultraviolet (UV), filtered with biological filter with nitrifying bacteria and with the microfiltration system with different mesh sizes. Before the experiments, aquariums were decontaminated with hydrochloric acid (0.1%) and rinsed three times with sea water.

Experiment: increased water temperature

Fish were held in aquariums at 12°C for 4 weeks and fed *ad libitum*. In the first experiment, the aquarium water temperature was increased by 1°C every hour from 12°C to 30°C, and maintained at 30°C for 4 weeks. There were three fish for each experimental condition (12°C control group and 30°C groups acclimated for 1 h, and from 1 to 4 weeks). Temperature was regulated using a series of resistors (Shego, 300 W) connected with the thermostat (Thermostab, Aqual) which resulted in an accuracy of the water temperature between ± 0.5 °C.

Experiment: intoxication with heavy metals

Fish intoxication experiments were performed in water containing four heavy metals: lead (Pb), cadmium (Cd), copper (Cu) and zinc (Zn). Experimental conditions were defined accordingly to the metals levels measured in water pumped from the Bay of Toulon (south of France) used to fill the aquariums (32) and directly in the aquariums (to check the cleaning) and compared to concentrations recorded along transects in the Bay of Toulon (Jean, Université du Sud Toulon-Var, France- personal communication). Sample treatment and analysis was adapted from Louis *et al.* (27). Water samples were filtered through 0.45 µm pre-cleaned cellulose nitrate filters (Sartorius), and stored at 4 °C in the dark until analysis in pre-cleaned 60 mL HDPE (Nalgene) for trace - metal measurements (preservation by acidification at pH < 2 using suprapur HNO₃). Total dissolved metal concentrations were determined in acidified samples by Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV). Measurements were carried out with a voltammetric analyser µAutolabI (EcoChemie) controlled by GPES 4.9 software (EcoChemie) coupled with a three - electrode cell of 663 VA Stand (Metrohm). The analytical procedure, fully automated, was based on 3 successive steps : (a) simultaneous measurement of Cd, Cu and Pb by DPASV with standard additions (using Cavo XL 3000 Syringe Pump) of standard solution containing the 3 metals, (b) addition of a 4 M sodium acetate solution (from sodium acetate suprapur, Merck) to increase the pH to 4, (c) measurement of Zn by DPASV with standard additions of Zn standard solution. Deposition time of the DPASV procedures was adapted accordingly to metal levels in samples. Metal levels measured in water sampled in pre-cleaned aquarium were on the level of those obtained on water pumped from the Bay of Toulon used to fill the aquariums, proving the efficiency of aquarium cleaning procedure. In comparison to metal concentrations recorded in various zones of the Bay of Toulon (Jean, Université du Sud Toulon-Var, France- personal communication), these values correspond to the levels obtained in the north of the small Bay of Toulon, largely higher than open-sea values reported for the western Mediterranean Sea (28), reflecting the significant contamination of the Bay due to numerous anthropogenic activities and low sea water renewal.

Accordingly to the measured levels, two concentrations of each metal were used: the first (M1), slightly higher than the one found in the natural environment and the second (M2), 100 higher than M1 (Table 1). Metals

concentrations measurement in the control systems (*i.e.* in the absence of fish) showed that concentrations remained stable (*i.e.* they do not adsorb significantly neither on aquariums' walls nor on filters) either on non-spiked aquariums or with M1 and M2 concentrations. Before the experiment, fish were kept in aquariums at 20 °C for 4 weeks and fed *ad libitum*. There were 12 fish for each experimental condition (6 fish per aquarium). Four metals were tested, each of them at two concentrations (Table 1). Control without contaminants contained 14 fish. The intoxication experiment lasted for 96 h (acute intoxication).

Table 1. Concentrations of metals in the aquariums during metals exposure experiment.

Metal	Pb	Cd	Cu	Zn
M1, µg/l	1	0.5	5	10
M2, µg/l	100	50	500	500

Tissue collection, RNA extraction, reverse transcription and polymerase chain reaction

Samples of 100 mg tissue were immediately harvested from the liver of freshly scarified fish. They were stored in 1 mL of RNAlater (Ambion, the RNA Company) at 4 °C overnight for complete infiltration in the tissue and then kept at -80 °C until the analysis. Total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. A DNase treatment (DNase I Amp Grade, Invitrogen) was performed after the extraction. RNA quality was assessed by electrophoresis on an agarose gel, showing clear individual 28S and 18S rRNA bands and no smears, confirming integrities of all prepared RNA. The cDNAs were generated following the standard protocol of the SuperScript II RNase H Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) using random Hexa-primers and 1 µg of RNA. The polymerase chain reactions (PCR) were performed using a Mastercycler ep gradient thermocycler (Eppendorf). For the temperature increase experiment PCR started with initial denaturation step of 94 °C for 2 min, followed by 24 cycles of denaturation step at 94 °C for 1 min, primer hybridization step at 54 °C for 1 min and elongation step at 72 °C for 2 min. The final elongation step was performed at 72 °C for 5 min. For the metal intoxication experiment it started with 2 min at 94 °C followed by 26 cycles at 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 65 °C for 1 min. A 15 min step at 65 °C ended the reaction.

In temperature increase experiments PCR reactions were performed to simultaneously amplify fragments of three genes : β -actin, wap65-1 and hsp70. β -actin was used to standardize the results of DNA amplification, as its expression is not supposed to differ among individuals and experimental conditions. Expression of heat shock protein (hsp70) was investigated for comparative purposes.

The primers used to amplify β -actin and wap65 genes were identical to those previously used by Pierre *et al.* (33). The primers for hsp70 amplification were designed with Primer3 software (37) using the published sequence of this gene of *D. labrax* (Genebank accession no. : AY423555). The following primers were chosen: HSPdir (5'-GAGAACAAGATCACAAATCAC-3') and HSPrev (5'-

CTTCTGTTGATGTTTCATACTC-3'). Each PCR mixture contained 1 μ L of first strand cDNA, 2 μ L of each primer (3 primer pairs) (10 pmol/ μ L), 0.3 μ L of 5U/ μ L HotMaster Taq DNA Polymerase (5 PRIME), 5 μ L of 10 \times HotMaster Taq buffer (with 25 mM of Mg²⁺) and 2 μ L dNTPs at 5 mM. The volume was brought to 50 μ L with RNase DNase free H₂O. For samples derived from the metal intoxication experiments the PCR mixture contained the same proportions of reagents, however only the β -actin and wap65 genes were examined.

Gene expression quantification and statistical analysis

The visualization of amplified cDNA was performed by a 2% TAE agarose gel electrophoresis (UV, coloration with ethidium bromide). The 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) was used to check the size of amplified bands. Gene expression levels were quantified with ImageJ software (36) and standardized with β -actin. The ratios of wap65/ β -actin and hsp70/ β -actin (in case of temperature increase experiment) were calculated and compared among individuals.

In order to test the significance of differences in gene expression levels among groups of fish subject to different

metal concentrations the Mann–Whitney test was performed in R environment (35).

RESULTS

Wap65 expression after water temperature increase

The wap65 and hsp70 genes expression levels differed among individuals and among experimental conditions. Both genes were expressed in the controls at 12°C. The highest expression levels for these two genes were recorded after 1 h of exposure to 30°C (Fig. 1). These data indicated a 2-2.5-fold increase in either wap65 or hsp70 transcript levels following the temperature increase. The patterns of expression of both genes from 1 to 4 weeks of exposure to 30°C were similar and these levels were close to the ones recorded at 12°C (control group) (Fig. 2).

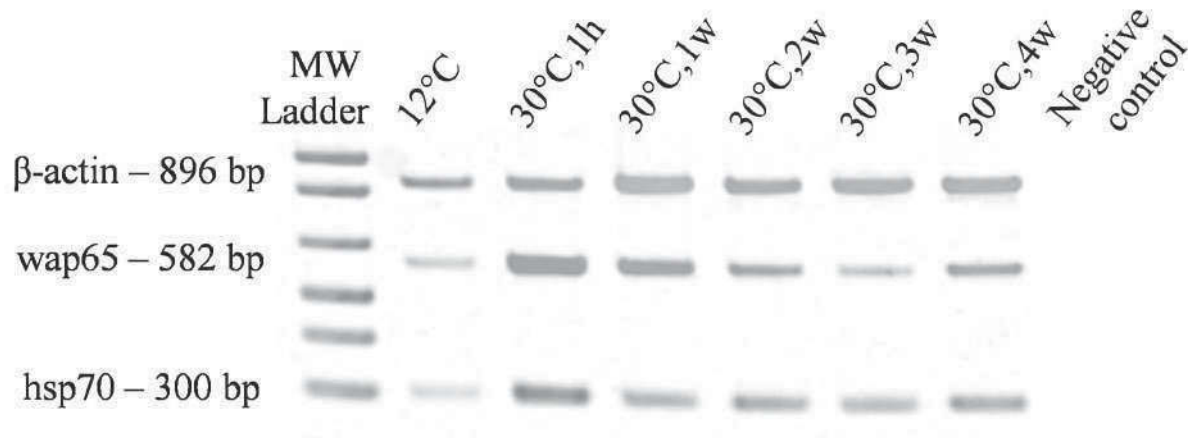


Figure 1. Examples of wap65 and hsp70 genes expression patterns in sea bass liver tissue after the exposition to increased water temperature (MW- molecular weight, h- hour, w- week).

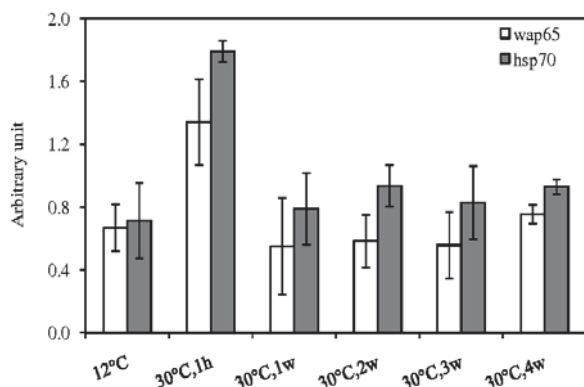


Figure 2. Average levels of wap65 and hsp70 genes expression in sea bass liver tissue after the exposition to increased water temperature. Wap65 and hsp70 expression levels were standardized with β -actin expression level (h-hour, w- week).

Wap65 expression after intoxication with heavy metals

After treatment with Pb at the M1 concentration (Table 1), which was slightly higher than the concentrations found in the natural environment, the level of wap65 expression did not significantly change. However, after intoxication with Pb at the concentration M2, which was 100 times higher than M1, wap65 expression fluctuated greatly (either down or up). Wap65 was upregulated after intoxication with Cd ($p < 0.05$) at M1, but not at M2. After the intoxication with Cd at M1, 70% of individuals demonstrated wap65 expression levels twice as high as the control. Treatment with Cu at M1 provoked a slight downregulation of wap65 ($p < 0.05$), which was not observed at M2.

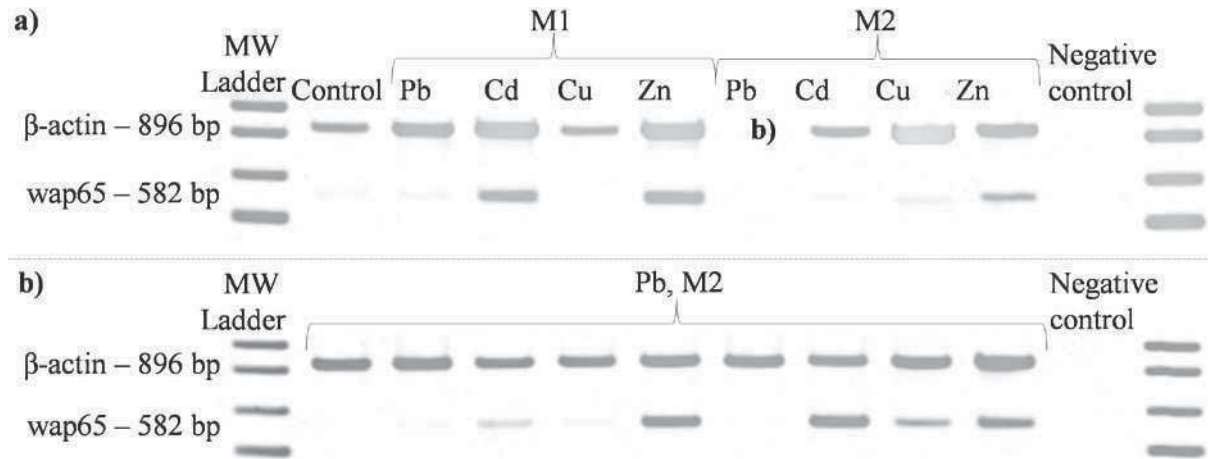


Figure 3. a) Examples of wap65 gene expression patterns after intoxication with heavy metals at the concentrations M1 and M2 (see Table 1), b) Wap65 expression after intoxication with lead (Pb) at M2 concentration (perturbing effect; either upregulation or downregulation) (MW- molecular weight).

The exposure to zinc resulted in an upregulation of wap65 at both concentrations, but there was a high level of variability among individuals. For only two metals, Cu (downregulation) and Zn (upregulation), the tendency in expression pattern was similar between M1 and M2 concentrations (Fig. 3, Fig. 4).

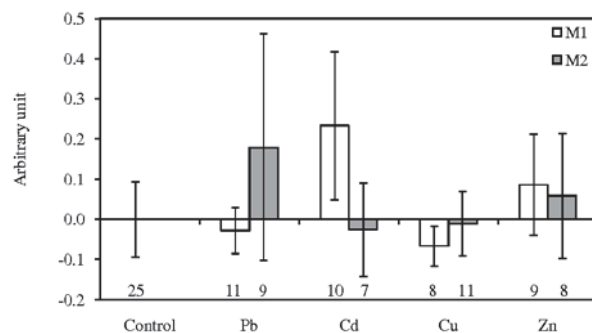


Figure 4. Average level of wap65 expression in sea bass liver tissue after intoxication with heavy metals at the concentrations M1 and M2 (see Table 1) in respect to the control sample. Wap65 expression level was standardized with β -actin expression level. The numbers correspond to the numbers of individuals from each experimental condition included in the data analysis.

DISCUSSION

Expression of wap65 after water temperature increase

In the European sea bass wap65-1 upregulation was recorded as soon as one hour after exposure to 30 °C and its expression returning to baseline after ~1 week. The wap65 expression pattern was similar to that of the heat

shock protein, hsp70. Based upon these results, we speculate that in *D. labrax*, WAP65 is involved in a “shock” response to rapid perturbation, rather than in a more long term acclimatory process. However, there are only a few studies on the expression of wap65 after a heat shock (6,22). As for the European sea bass, detailed study of the expression patterns between one hour and one week of warm temperature exposition would help to estimate more exactly the time after warm water exposition, when wap65 is not upregulated anymore.

Our study suggests that WAP65-1 in European sea bass probably has little function in the acclimatory response. However, such function was found for WAP65-1 in goldfish and carp (21,23,45). It has been suggested that WAP65-1 underwent neofunctionalization, and the form which maintained function resembles the ancestral one, functioning in acclimation to warm temperature or in mediating an immune response. For sea bass, this would correspond to WAP65-2 (14,15,38). In support for this idea it has been shown that in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) the transcriptional response of wap65-2 was quite slow, occurring days after warm temperature treatment (acclimatory response) or bacterial infection (39). However this may not be generalizable since in the Antarctic plunderfish (*Harpagifer antarcticus*) after the increase of water temperature (from 0 °C to 6 °C), a strong downregulation of wap65-2 was recorded within 2-8 hours. Recovery to near control levels took place within 48 hours (6).

A clear phylogenetic distinction between ancestral (e.g. Cypriniformes, like goldfish and carp) and modern (e.g. Perciformes, like sea bass) teleosts was found for both wap65-1 and wap65-2 sequences (38). It is therefore probable that different taxa acclimate to temperature increase in different ways. However, the number of studied species remains too low for detailed conclusions and, for example, in goldfish, both acclimatory reaction and rapid response to increased temperature (after 4 hours) was demonstrated (21,22).

Expression of WAP65 after intoxication with heavy metals

There are only a few studies on the expression of wap65 after intoxication with heavy metals. Exposure to Hg contaminated sediment provoked its upregulation in cod (*Gadus morhua*) (30). Wap65 upregulation was also seen in swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) after contamination with Cu for 24 h (upregulation was detected at 50 µg/l and was highest at 1000 µg/l after 24 h) (1). We did not observe upregulation of the sea bass wap65 after the intoxication with copper for 96 h (slight downregulation was found at M1), although the concentrations tested (5 µg/l and 500 µg/l) were within the range previously tested (1). If metals intoxication provokes a rapid response, in our experiments, the expression levels could have returned to baseline before our measurements were taken. Therefore, our and the previous results are not necessarily contradictory. The M1 concentrations used were slightly higher than the ones found in the natural environment. The M2 concentrations were 100 times higher than M1 and may mimic spills or other concentrated events. The latter concentrations were used to test the reaction to acute pollution. This acute intoxication did not provoke any mortality, proving some resistance of fish at least to the short-term exposure to these metals at the concentrations examined. As for the concentrations that could be encountered in the natural environment (M1), wap65 is regulated after the contamination with cadmium (upregulation) and probably with copper (slight downregulation) and zinc (high level of variability among individuals with a global tendency of upregulation). In case of copper and zinc the study should be repeated using a higher number of individuals and a range of different concentrations to confirm the recorder patterns.

Although, the response of wap65 to metals intoxication has not been much studied before,

there are some available results concerning other pollutants. Wap65 upregulation was demonstrated in cod experimentally exposed to alkylphenols (26). Its downregulation was also found in this species from Store Lungegårdsvann, in Bergen, Norway, which is polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), tributyltin (TBT), polychlorobiphenyls (PCBs), Cd, and Hg (25).

Intoxication with metals influences numerous metabolic pathways and physiological processes in fish. In response to a toxic insult, fish may increase their metabolic activity in order to mobilize protective measures against the pollutant involved. Therefore, enzymes involved in energy production, such as 6-phosphofructo-2-kinase (key regulatory enzyme in glycolysis) might be upregulated (16). The reaction to heavy metals intoxication may also provoke a general inflammatory reaction, potentially resulting in the expression of glutathione S-transferases (GSTs) (17). WAP65 has been demonstrated to play a role in the inflammatory processes (e.g. 38), so the inflammation provoked by intoxication with some metals could lead to its upregulation. Moreover, some metals, like cadmium (upregulated wap65 in sea bass) bind to fish gills provoking their damage (17) and leading to tissue hypoxia. Upregulation of wap65 was detected during hypoxia conditions in goby *Gillichthys mirabilis* (13). Therefore, the increased wap65 expression in sea bass that we observed may be due to hypoxic stress induced by binding of cadmium to the gills. On the other hand, our data did not reveal an increase in wap65 expression levels after intoxication with copper. This metal can also induce gill damage and it has been proposed as one of the possible explanations for wap65 upregulation after the copper intoxication in the previous studies (1).

Various metals like Cd, Cu, nickel (Ni) and cobalt (Co) can affect heme homeostasis (e.g. 41 and references therein). Free iron can promote free radical formation resulting in oxidative stress (30). It has been demonstrated that the intoxication of fish with cadmium induces the expression of genes responsive to oxidative stress (46,47). Oxidative stress in fish might be also provoked by copper (12), lead (41 and references therein) or zinc (11). The oxidative stress induced by exposure to mercury (Hg) increased transcription of wap65, but also of transferrin and heme oxygenase, genes involved in iron metabolism, suggesting that WAP65 might play a role in these mechanisms (30).

The mammalian homologue of WAP65, hemopexin, participates in transporting heme from the plasma to the liver and preventing oxidative stress (8,31,42). Induction in hemopexin expression has been shown to increase the rate of the protein binding to heme. The binding of heme-hemopexin-like complexes with the hemopexin receptor located on the cell surface of the liver provokes among others, the induction of metallothionein gene expression (1 and references therein). Increased synthesis of metallothioneins and their binding to heavy metals reduces the amount of freely available metals (in the host) thus decreasing their potential toxicity (7,24). Therefore, a crucial question in uncovering the function of WAP65 after exposure to heavy metals is whether WAP65 has an activity similar to hemopexin. There are many hypotheses based on the structure of the putative protein concerning the ability of WAP65 (either of the two isoforms) to have a hemopexin-like activity (5,15,33,38). Although functional analyses of proteins are still scarce, it has been demonstrated that shark hemopexin binds heme (8).

It is possible that WAP65 is involved in maintaining homeostasis, likely by preventing high concentration of free heme and free metals within the body, thereby reducing toxicity (15). However, functional studies of WAP65 proteins are needed to confirm these hypotheses. Moreover, cadmium, which is the only metal inducing wap65 upregulation, is not the only one influencing heme homeostasis and causing oxidative stress in fish. The lack of significant wap65 upregulation after intoxication with other metals should be confirmed by additional experiments.

WAP65- not only “warm temperature acclimation-related protein”

Numerous studies suggest that WAP65 is not only involved in temperature acclimation, but also acts as a multifunctional agent in several biological protection processes. Taking into account the multitude of functions and the rapidity of reaction to stress, there is some similarity between WAP65 and heat-shock proteins (HSP), which has a general role in cell physiology. Initially heat shock proteins were thought to be linked only with environmental temperature increases, but it is now widely known that these proteins are upregulated in cells that are exposed to a broad range of stressors (18). Similarly, the term “warm-temperature protein” was assigned to a 65-kDa protein due to

its high abundance in various tissues after warm temperature acclimation, however, WAP65 is involved in many other host processes including in development, immune response, as well as mediating certain chemical stress responses (e.g. 15,38,39).

In the Mediterranean Sea, from where the European sea bass was sampled, the water temperature changes from 12°C in the winter to over 30°C in the summer. Therefore, the experimental temperature range reflects the one encountered by this poikilothermic species in its natural environment. The fact that there is no increased wap65 expression after more than a week of exposure to 30°C (for example during acclimatory reaction to the seasonal change of water temperature), makes wap65 a potential marker for a rapid detection of heat shock. This is particularly important in aquaculture, where fish in cages do not have a possibility to move to deeper, colder water when the surface water temperatures increase.

Due to the reaction to different physical and chemical stimuli wap65 could also be a potential marker to detect stress in fish. However, variability among individuals in expression patterns after exposure to heavy metals was considerable. Therefore, further studies with additional chemical substances and wider concentrations range are needed in order to verify the utility of wap65 in ecotoxicological studies as a possible biomarker of exposure. Some attempts to include wap65 in DNA microarrays, where its expression is analyzed in parallel with many other genes, has already been undertaken (25,26,30). Understanding the physiological pathways involved in wap65 regulation will lead to a better understand of the function of this protein and the reasons behind the differences in expression patterns seen in response to different pollutants.

Acknowledgements - We are very grateful to the Conseil Régional Provence-Alpes Côte d’Azur (France) and Serge Carle from Aqualog for the PhD scholarship and the financing of research of Stéphanie Pierre. We acknowledge the marine farm Dentech for their generous gifts. We also thank Conseil Général du Var (France) and Toulon Var Technologie (France) for their partnerships.

REFERENCES

1. Aliza, D., Ismail, I.S., Kuah, M.K., Shu-Chien, A.C. and Muhammad, T.S.T., Identification of Wap65, a human homologue of hemopexin as a copper-inducible gene in swordtail fish, *Xiphophorus helleri*. *Fish. Physiol. Biochem.* 2008, **34**: 129-138.

2. Amores, A., Force, A., Yan, Y.L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R.K., Langeland, J., Prince, V., Wang, Y.-L., Westerfield, M., Ekker, M. and Postlethwait, J.H., Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 1998, **282**: 1711-1714.
3. Canli, M. and Atli, G., The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.* 2003, **121**: 129-136.
4. Choubert, J.M., Pomiès, M., Martin, S., Coquery, M., Influent concentrations and removal performances of metals through various conventional and advanced wastewater treatment processes. *Water Sci. Technol.* 2011, **63**: 1967-1973.
5. Choi, C.Y., An, K.W., Choi, Y.K., Jo, P.G., Min, B.H., Expression of Wap65 mRNA and physiological changes with increasing temperature in black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*. *J. Exp. Zool.* 2008, **309A**: 206-214.
6. Clark, M.S. and Burns, G., Characterisation of the warm acclimated protein gene (wap65) in the Antarctic plunderfish (*Harpagifer antarcticus*). *DNA Seq.* 2008, **19**: 50-55.
7. Dallinger, R., Egg, M., Kock, G. and Hofer, R., The role of metallothionein in cadmium accumulation of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from high alpine lakes. *Aquat. Toxicol.* 1997, **38**: 47-66.
8. Dooley, H., Buckingham, E.B., Criscitiello, M.F. and Flajnik, M., Emergence of the acute-phase protein hemopexin in jawed vertebrates. *Mol. Immunol.* 2010, **48**: 147-152.
9. Dugo, G., La Pera, L., Bruzzese, A., Pellicanò, T.M. and Lo Turco, V., Concentration of Cd (II), Cu (II), Pb (II), Se (IV) and Zn (II) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) tissues from Tyrrhenian Sea and Sicilian Sea by derivative stripping potentiometry. *Food Control* 2006, **17**: 146-152.
10. FAO, FishStat. <http://www.fao.org>, 2011, accessed on 20 May 2011.
11. Franco, J.L., Posser, T., Mattos, J.J., Sanchez-Chardi, A., Trevisan, R., Oliveira, C.S., Carvalho, P.S., Leal, R.B., Marques, M.R., Bainsy, A.C. and Dafre, A.L., Biochemical alterations in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: glutathione reductase as a target. *Mar. Environ. Res.* 2008, **66**: 88-89.
12. Gabbianelli, R., Lupidi, G., Villarini, M. and Falcioni, G., DNA damage induced by copper on erythrocytes of gilthead sea bream *Sparus aurata* and mollusk *Scapharca inaequivalvis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2003, **45**: 350-356.
13. Gracey, A.Y., Troll, J.V. and Somero, G.N., Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *PNAS USA* 2001, **98**: 1993-1998.
14. Hirayama, M., Nakaniwa, M., Ikeda, D., Hirazawa, N., Otaka, T., Mitsuboshi, T., Shirasu, K. and Watabe, S., Primary structures and gene organizations of two types of Wap65 from the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Fish Physiol. Biochem.* 2003, **29**: 211-224.
15. Hirayama, M., Kobiyama, A., Kinoshita, S. and Watabe, S., The occurrence of two types of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme. *J. Exp. Biol.* 2004, **207**: 1387-1398.
16. Hogstrand, C., Balesaria, S. and Glover, C.N., Application of genomics and proteomics for study of the integrated response to zinc exposure in a non-model fish species, the rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2002, **133**: 523-535.
17. Hollis, L., Mc Geer, J.C., Mc Donald, D.C. and Wood, G.M., Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimatation and physiological effects during long term sub-lethal Cd exposure in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 1999, **46**: 101-119.
18. Iwama, G.K., Thomas, P.T., Forsyth, R.B. and Vijayan, M.M., Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 1999, **8**: 35-56.
19. Kagi, J.H.R. and Schaffer, A., Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 1988, **27**: 8509-8515.
20. Kikuchi, K., Watabe, S., Suzuki, Y., Aida, K. and Nakajima, H., The 65-kDa cytosolic protein associated with warm temperature acclimation in goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Physiol. B* 1993, **163**: 349-354.
21. Kikuchi, K., Yamashita, M., Watabe, S. and Aida, K., The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression. *J. Biol. Chem.* 1995, **270**: 17087-17092.
22. Kikuchi, K., Watabe, S., Aida, K., The Wap65 gene expression of goldfish (*Carassius auratus*) in association with warm water temperature as well as bacterial lipopolysaccharide (LPS). *Fish Physiol. Biochem.* 1997, **17**: 423-432.
23. Kinoshita, S., Itoi, S. and Watabe, S., cDNA cloning characterization of the warm-temperature-acclimation-associated protein Wap65 from carp, *Cyprinus carpio*. *Fish Physiol. Biochem.* 2001, **24**: 125-134.
24. Klaassen, C.D., Liu, J. and Choudhuri, S., Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999, **39**: 267-294.
25. Lie, K.K., Lanzen, A., Breilid, H. and Olsvik, P.A., Gene expression profiling in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from two contaminated sites using a custom-made cDNA microarray. *Environ. Toxicol. Chem.* 2009, **28**: 1711-1721.
26. Lie, K.K., Meier, S. and Olsvik, P.A., Effects of environmental relevant doses of pollutants from offshore oil production on Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 2009, **150**: 141-149.
27. Louis, Y., Garnier, C., Lenoble, V., Mounier, S., Cukrov, N., Omanović, D. and Pižeta, I., Kinetic and equilibrium studies of copper-dissolved organic matter complexation in water column of the stratified Krka River estuary (Croatia). *Mar. Chem.* 2009, **114**: 110-119.
28. Morley, N.H., Burton, J.D., Tankere, S.P.C. and Martin, J.M., Distribution and behaviour of some dissolved trace metals in the western Mediterranean Sea. *Deep Sea Res. II* 1997, **44**: 675-691.
29. Nakaniwa, M., Hirayama, M., Shimizu, A., Sasaki, T., Asakawa, S., Shimizu, N. and Watabe, S., Genomic sequences encoding two types of medaka hemopexin-like protein Wap65, and their gene expression profiles in embryos. *J. Exp. Biol.* 2005, **208**: 1915-1925.
30. Olsvik, P.A., Brattås, M., Lie, K.K. and Goksøyr, A., Transcriptional responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to mercury-contaminated sediments obtained near the wreck of the German WW2 submarine U-864, and from Bergen Harbor, Western Norway. *Chemosphere* 2011, **83**: 552-563.
31. Paoli, M., Anderson, B.F., Baker, H.M., Morgan, W.T., Smith, A. and Baker, E.N., Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. *Nat. Struct. Biol.* 1999, **6**: 926-931.
32. Pierre, S., Contribution à la pisciculture marine. De la nécessité de diversifier et de contrôler la qualité sanitaire. Dissertation, Université du Sud Toulon-Var, France, 2009.
33. Pierre, S., Coupé, S., Prévot-D'Alvise, N., Gaillard, S., Richard, S., Gouze, E., Aubert, J. and Grillasca, J.-P., Cloning of Wap65 sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) and expression in sea bass tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2010, **155**: 396-402.

34. Prévot-D'Alvise, N., Pierre, S., Gaillard, S., Gouze, E., Gouze, J.N., Aubert, J., Richard, S. and Grillasca, J.-P., cDNA sequencing and expression analysis of *Dicentrarchus labrax* heme oxygenase-1. *Cell. Mol. Biol.* 2008, **54**: OL1046-OL1054.
35. R Development Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2008, ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
36. Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 2011, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2011, accessed on 20 March 2011.
37. Rozen, S. and Skaletsky, H., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 2000, **132**: 365-386.
38. Sarropoulou, E., Fernandes, J.M., Mitter, K., Magoulas, A., Mulero, V., Sepulcre, M.P., Figueras, A., Novoa, B. and Kotoulas, G., Evolution of a multifunctional gene: the warm temperature acclimation protein Wap65 in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010, **55**: 640-649.
39. Sha, Z., Yu, P., Takano, T., Liu, H., Terhune, J. and Liu, Z., The warm temperature acclimation protein Wap65 as an immune response gene: its duplicates are differentially regulated by temperature and bacterial infections. *Mol. Immunol.* 2008, **45**: 1458-1469.
40. Shi, Y.H., Chen, J., Li, C.H. and Li, M.Y., Molecular cloning of liver Wap65 cDNA in ayu (*Plecoglossus altivelis*) and mRNA expression changes following *Listonella anguillarum* infection. *Mol. Biol. Rep.* 2009, **37**: 1523-1529.
41. Schmitt, C.J., Whyte, J.J., Roberts, A.P., Annis, M.L., May, T.W. and Tillitt, D.E., Biomarkers of metals exposure in fish from lead-zinc mining areas of Southeastern Missouri, USA. *Ecotox. Environ. Safe.* 2007, **67**: 31-47.
42. Tolosano, E. and Altruda, F., Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA Cell Biol.* 2002, **21**: 297-306.
43. Tom, M. and Auslander, M., Transcript and protein environmental biomarkers in fish. A review. *Chemosphere* 2005, **59**: 155-162.
44. Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N.P.E., Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.* 2003, **13**: 57-149.
45. Watabe, S., Kikuchi, K. and Aida K., Cold and warm-temperature acclimation induces specific cytosolic protein in goldfish and carp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 1993, **59**: 151-156.
46. Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Godfrey, R.E., Sabine, V., Conesa, A., Minchin, S.D., Watts, P.C. and Chipman, J.K., Development of the GENIPOL European flounder (*Platichthys flesus*) microarray and determination of temporal transcriptional responses to cadmium at low dose. *Environ. Sci. Technol.* 2006, **40**: 6479-6488.
47. Williams, T.D., Diab, A., Ortega, F., Sabine, V.S., Godfrey, R.E., Falciani, F.J., Chipman, J.K. and George, S.G., Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to model toxicants. *Aquat. Toxicol.* 2008, **90**: 83-91.

Impact of Endocrine Disrupting Chemicals [EDCs] on Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver [HPGL] Axis in Fish

¹Lamia Hachfi, ^{1,2}Sylvain Couvray, ¹Rémy Simide, ¹Katarzyna Tarnowska,
^{1,3}Stéphanie Pierre, ¹Sandrine Gaillard, ¹Simone Richard, ¹Stéphane Coupé,
^{1,3}Joël-Paul Grillasca and ¹Nathalie Prévot-D'Alvise

¹Équipe de Biologie Moléculaire Marine-PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132,
Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France

²Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez-Le Brusq, 83140 Six Fours Les Plages, France

³AquaBioMass-1025 Chemin du Naï, 83136 Méounes Les Montrieux, France

Abstract: The aquatic ecosystem is one of the most exposed environments to pollutants. A lot of xenobiotics are known to disrupt the reproductive endocrine system. Fish are one of the primary risk organisms for Endocrine Disrupting Chemicals [EDCs]. In common with all vertebrates, reproduction in fish is controlled by the Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver [HPGL] axis. The multitude of hormones controlling this axis and the complexity of hormones regulation, make from the HPGL axis a major target of EDCs. Variation of hormones synthesis levels, disturbance of genes expression, alteration of gonads structure and disruption of liver functions were noted. HPGL axis represents so one of the most important endpoints in the risk assessment of EDCs. In this review, we seek to extract from recent literature concepts regarding the effects of EDCs on the endocrine reproductive system in fish that might be of interest to explain some alterations in the wide populations of fish.

Key words: Endocrine Disrupting Chemicals • Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver axis • Fish • Reproductive system • Gene expression

INTRODUCTION

The aquatic ecosystem is one of the most exposed environments to pollutants since it represents the ultimate destination for most anthropogenic contaminants. In fact all chemicals, whether initially released on land, in the atmosphere or directly in rivers will eventually find themselves in the rivers and oceans at the end. Therefore, aquatic systems contain a wide range of pollutants from sewage effluents, factory wastes, agrochemicals, pesticides, etc. Many of these chemicals are suspected or known to interfere with the endocrine system of model organisms such as mammals, fishes etc. and can lead to a disturbance of hormone metabolism, hormone-regulated cellular or physiological processes [1,2]. A disruption of the normal hormonal function modifies the organization and the functioning of the reproductive system. In fact, wild fish may be affected by drugs and hormones used in the manipulation of growth and reproductive cycles in

human and hormonal treatments. Similar effects might be expected in fish exposed to effluents from pharmaceutical industries, or to sewage effluents which can contain high levels of human estrogens or androgens [3] or industrial chemicals [4]. Such xenobiotics are known to disrupt the reproductive endocrine system and to affect gamete development and viability either by their cytotoxicity or by altering the hormonal environment during gamete development. They also may affect sexual differentiation of the gonad, timing of sexual maturation, gonadosomatic index, reproductive tract and gonad morphology [5].

Fish are considered as one of the primary risk organisms for Endocrine Disrupting Chemicals [EDCs] [6]. Not only they are directly exposed to a wide variety of EDCs, but also sex determination in fish is known to be very labile and can be disturbed or even reversed by exogenous hormone exposure at critical developmental stages [7].

Corresponding Author: Nathalie Prévot-D'Alvise, Équipe de Biologie Moléculaire Marine-PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France.
Tel: +33(0)494142670, Fax: +33(0)494142961, E-mail: prevot@univ-tln.fr.

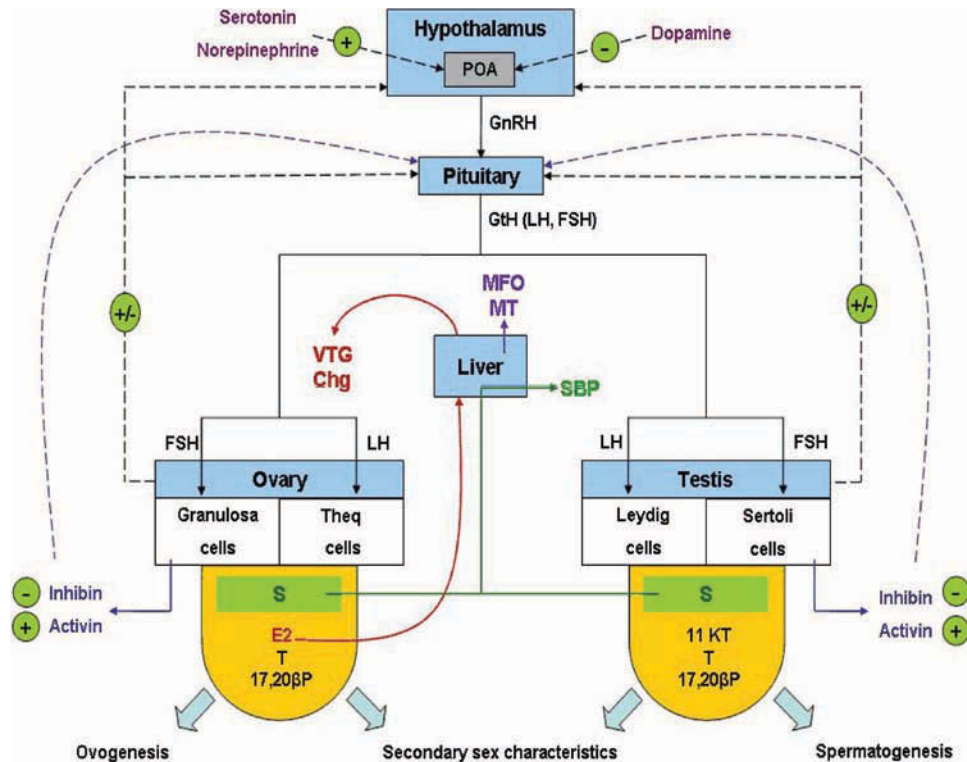


Fig. 1: Schematic presentation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver axis in fish.

Abbreviations: Chg = Choriogenin, E₂ = 17 α -Estradiol, FSH = Follicle Stimulating Hormone, LH = Luteinizing Hormone, MFO = Mixed Function Oxydase, MT = Metallothionein, S = Steroides, SBP = Steroid Binding Proteins, T = Testosterone, VTG = Vitellogenin, 11KT = 11-Ketotestosterone, 17,20 β P = 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one

Even if the binding affinity of most EDCs to the estrogen or androgen receptors [ER/AR] is low compared to endogenous steroid hormones, exposure to even low concentrations of xenoestrogens/xenoandrogens can disrupt normal developmental and reproductive processes. This is evident for exposure to anthropogenic chemicals continuously detected at low concentrations in the environment. A well-known example is ethinylestradiol [EE₂] used in contraceptive pills and finally discharged into the aquatic environment. EE₂ is found in the lower ng/L range in aquatic water, but it is enough to cause sustainable impacts on reproduction and population evolution in fish [8].

There is no doubt now that EDCs can have long-term effects on reproduction and subsequent population development in natural fish populations [9-12]. An ecotoxicological approach is suitable to evaluate the impact of EDCs on fish. In addition, investigations based on the evaluation of reproductive assessments are still costly, time-consuming and laborious, what can explain why these endpoints are not routinely integrated into most chemical safety assessments. However, since

endocrine disruption can be linked to molecular interactions, the variation of gene expression of appropriate biomarkers could be used as predictor for reproductive disruption [13] and would be a pertinent tool for the evaluation of reproductive assessments.

Metals (copper, mercury, lead, cadmium), polycyclic aromatic hydrocarbons polyhalogenated compounds and chemical mixtures induced different alterations such as antioxydant defense mechanisms, lysosomal system and metallothionein secretion. A large number of bioindicators was even identified such as *Trematomus bernacchii* [14-17]. However, the potential endocrine effects are still not enough investigated, although similar properties have been demonstrated for several chemicals. That makes it pertinent to look over previous work in order to determine perspectives for future research. In this review, we seek to extract from recent literature concepts regarding the effects of EDCs on the endocrine reproductive system in fish that might be of interest to explain some alterations in the wide populations of fish. For this, we will review the

basics of reproductive system in fish, then we will define EDCs and their different modes of action. Then we will explore the effects of EDCs along the Hypothalamic-Pituitary-Gonad-Liver [HPGL] axis in fish at different levels which will constitute a true mirror of the reproduction processes. Finally we will summarize some effects of pollutants on the reproductive systems in fish and conclude with a few considerations of future research directions.

Basics of Reproductive System in Fish: In common with all vertebrates, reproduction in fish is controlled by the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal [HPG] axis. Signals from the brain control the hypothalamic secretion of gonadotropin-releasing hormone [GnRH] which stimulates the adenohypophysis to release gonadotropins: luteinizing hormone [LH] and follicle stimulating hormone [FSH] (Fig 1).

In the ovary, granulosa contains specific receptors to FSH [FSHR]. The role of this hormone consists on stimulating follicular maturation and androgen conversion to estrogen by aromatization. In the theca cells, LH binds to its receptor [LHR] and induces androgen production and ovulation.

In the testis, FSHR are localized to Sertoli cells. FSH would stimulate Sertoli cell proliferation and spermatogenesis but their exact role remains unclear. LHR are located on Leydig cells. The LH-receptor complex triggers androgen synthesis. Then these pituitary hormones induce and regulate steroidogenic enzymes [18].

Gonadotropins stimulate gonadal development and production of steroid hormones: 17β -estradiol [E_2] in females, testosterone [T] and predominantly 11-ketotestosterone [11KT] in males, as well as maturation-inducing hormones [MIHs] mainly $17\beta,20\beta$ -dihydroxyprogesterone [$17,20\beta$ P] in both sexes. The main difference between fishes and mammals is that in fish the major testicular androgen is 11KT [19] and the principal ovarian estrogen is the estradiol which acts differently than in mammals. It stimulates the liver, its target tissue, to produce the yolk protein vitellogenin [VTG] which is incorporated into the oocyte under the influence of the gonadotropin FSH [20].

Although studied in mammals, very little information is available in fish on the specific roles of FSH and LH in regulating androgen production by the testis and the precise function of each gonadotropin in teleosts is scarce [21].

In fish, FSHR is expressed in Sertoli cells as it was shown in mammals [22,23], but further studies on Japanese

eel (*Anguilla japonica*, Temminck and Schlegel, 1846) and African catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) have demonstrated FSHR presence in Leydig cells in [24,25].

Gonadotropin functions were more explored in the salmonid model. Their transcripts and plasmatic concentrations showed that FSH is linked to the initiation of gametogenesis through the production of E_2 and 11KT. LH stimulates the production of MIHs, progesterins $17,20\beta$ P and $17\beta,20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregnen-3-one [20β S]. It plays so a crucial role in final steps of oocyte and sperm maturation [e.g., 26 and references therein].

Steroids initiate changes in secondary sex characteristics, behaviour as well as development and maturation of gametes [27,28]. Their biosynthesis has an acute (on the order of minutes) and a chronic (on the order of hours) hormonal regulation. Chronic regulation implies the transcription/translation of the genes encoding steroidogenic enzymes involved in the long term steroid synthesis, while the acute regulation of steroidogenesis depends on the mobilization of precursor cholesterol in the mitochondria [29]. In mammals, it was shown that this transport is mediated by the steroidogenic acute regulatory [StAR] protein [29]. Complementary DNA-encoding proteins with high homology to StAR of mammals were cloned from zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), cod (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758) and stingray (*Potamotrygon hystrix*, Müller and Henle, 1841) [e.g., 30 and references therein].

In fact, synthesis of steroids needs the contribution of several oxidative enzymes responsible of cholesterol conversion into steroids. For example, the cytochrome P450 11β -hydroxylase and the cytochrome P450 aromatase are involved in the final steps of the synthesis of 11KT and the conversion of T to E_2 , respectively [30]. Final plasma concentration of steroids depends on their level of synthesis and on the rate of deactivation by the liver. For example, estradiol acts on the liver which induces VTG synthesis, whereas it is catabolised in the liver [6].

Gametogenesis is controlled by the interference of systemic and intragonadal systems. Each system is less or more solicited depending on the stage of gametogenesis.

Gonadal recrudescence in both sexes requires several months, until viable gametes can be produced. E_2 and 11KT secretions then stop and the biosynthetic pathway turns to progesterone secretion which induces the final maturation of oocytes or testis. In most fish this progesterone is $17,20\beta$ P, while in others 11-deoxycortisol or other progesterones may be involved [19].

The HPG axis plays a major role in maintaining normal reproduction and synchronization of the seasonal reproductive cycles [31-33]. In fact like most vertebrates, teleosts also exhibit distinct cyclic reproductive patterns during which, levels of GnRH, GtH and sex steroids vary according to the reproductive phase [32,34-36]. In mammals, peak levels of plasmatic E₂ and low progesterone levels precede preovulatory LH surge [37,38]. In fishes, decreased plasma E₂ levels and increased 17,20•P levels precede spawning [39,40].

In addition to hormonal factors, external factors, such as light and water temperature, act on brain to control the timing of gonad development and maturation in fishes. Any irregularity in the GnRH, GtH or sex steroid levels in a particular phase could lead to a reproductive functions disturbance and to reduced fertility or even sterility [41]. Another system which modulates the functioning of the HPG axis is the monoaminergic system. Its neuromediators like dopamine could inhibit the release of LH while others like norepinephrine and serotonin stimulate LH release not only directly but also via the GnRH axis. Other factors such as seasonal changes are also able to induce variations in hypothalamic and pituitary monoamines [e.g., 42 and references therein].

Depending on the physiological stage, sex steroids exert negative and positive feedback effects at the pituitary and hypothalamus levels to modulate the synthesis and release of GnRH and GtH [43,44]. The gonads can also signal back their status to the pituitary and hypothalamus by other messengers than steroids, such as inhibins secreted by Sertoli cells [6].

The multitude of hormones controlling HPGL axis and the complexity of their regulation by control and feedback control signals make from the HPGL axis a major target of EDCs.

EDCs: There is an increasing public concern over the adverse effects of anthropogenic contaminants on the health and well-being of both humans and aquatic wildlife [45]. In fact it is crucial to preserve fish populations not only because they provide to humans an essential food source, but also because they are an important component of ecosystems and they provides their balanced functioning. To date, a wide variety of both developmental and reproductive disorders observed in wildlife species have clearly been linked to the exposure to environmental contaminants which act as EDCs [45-47]. EDCs are “exogenous agents that interfere with the production, release, transport, metabolism, binding, action or elimination of natural hormones in the body

responsible for the maintenance of homeostasis and the regulation of developmental processes” [2]. The most frequently EDCs are described as agents that could alter the hypothalamic-pituitary-thyroidal or gonadal axis functioning inducing disturbances in reproduction or development [48].

EDCs can have severe impact on the environment, since hormones control many essential physiological processes such as growth and development, stress response and reproduction.

EDCs were shown to affect an organism through receptor mediated actions, but also receptor independent pathways (involving estrogens androgens and thyroid hormones) [49], altered hormone synthesis or degradation and binding to plasma proteins [50,51]. For example, it is known that exposure to E₂ induces the synthesis of specific proteins required for reproduction. Corresponding genes encode for ER, VTG and choriogenins necessary for the development of the egg membrane [49]. Other mechanisms including circulating steroid concentrations, steroidogenesis and hepatic steroid metabolism are susceptible to induce alterations and these effects are species and dose dependent [5].

The chemicals present in the environment that can disrupt reproductive system in fish are classified into four categories: estrogenic, anti-estrogenic androgenic and anti-androgenic compounds. However, other chemicals, able to interfere with the synthesis and binding of releasing and trophic hormones or the control of final MIH, could have similar effects and are also considered as EDCs [13]. Among the long list of EDCs we can mention: non ionic surfactants, such as nonylphenol and octylphenol [52-54], the fungicide vinclozolin [55-57], the metabolite 1,1-dichloro-2, 2-bis (*p*chlorophenyl) ethylene (*p,p*9-DDE) of the insecticide DDT [56-58], the industrial compound bisphenol A [59-61], effluent from sewage treatment plants [62,63], EE2 used in oral contraceptives [64] and run-off from animal farms [65]. Arcand-Hoy and Benson [66] provide a review of additional contaminants.

In recent years, trace metals such as mercury, cadmium, lead and copper have also been identified as EDCs able to interfere with the synthesis, transport and/or degradation of endogenous hormones. There is a wealth of literature available on the effects of trace metals on many different hormones and hormone functions [67]. For example cadmium [Cd], was indicated to have estrogenic effects through different molecular and cellular mechanisms [68,69]. Several studies in mammals and fish suggest that Cd has a high affinity to ER [68-69]. Estrogen receptor cadmium-binding sites have even been identified

[70]. Cd can also induce other endocrine disturbances such as development reproductive alterations [21,71]. Cadmium has the potential to bioaccumulate in the liver and is sequestered in eggs after waterborne exposures [72,73].

Besides the variety and the large presence of EDCs on the environment, it seems to be judicious to focus on the interactions they could have with the endocrine system of organisms and on the repercussion they could induce on their reproductive life.

IMPACT OF EDCs ON HPGL AXIS: Different kinds of hormones could be targets of environmental chemicals: reproductive hormones such as estrogens and androgens, thyroidal hormones, corticosteroids, growth hormone. As we have seen above, HPGL axis controls many important processes which are crucial for population viability. Therefore several research projects have focused on the interference of EDCs with the reproductive hormones, especially as they are of vital importance during the early critical stages of embryonic development and sex differentiation. In fact, HPGL axis represents one of the most important endpoints in the risk assessment of EDCs since it includes all aspects of reproductive development from sex differentiation to puberty.

Endocrinology: Gametogenesis, secondary sexual characters and reproductive cycles are controlled by signals emitted by the neuroendocrine system. In fact, the neuroendocrine system changes endogenous and exogenous signals on internal signals controlling different reproductive pathways. Changes in steroid levels can disturb the normal functioning of the neuroendocrine system in two manners, directly through agonist and antagonist effects or indirectly involving feedback signals [5,74].

The steroidogenic pathway appears to be affected by numerous pharmaceutical, agricultural and industrial contaminants. Exposure to various EDCs can result in decreased androgen production (demasculinization) or increased estrogen production (feminization) in males. Depressed plasma androgens and/or elevated E_2 are often characteristic of antiandrogenic or estrogenic xenobiotics exposition. Summer flounder (*Paralichthys dentatus*, Linnaeus, 1766) experimentally exposed to E_2 showed reduced plasma T and elevated plasma E_2 [96]. Similarly, flounder treated with o, p'-DDT and octylphenol showed a decreased plasma T concentration. The octylphenol treated flounders also had an initial increase in plasma E_2 concentration [75].

In white sturgeon (*Acipenser transmontanus*, Richardson, 1836) from the Columbia River, plasma T and 11KT concentrations were negatively correlated with p,p0-DDE levels found in the liver [76]. Male largemouth bass (*Micropterus salmoides*, Lacépède, 1802) taken from a contaminated site (Escambia River, exposed to two identified sources of pollution) had a plasma testosterone concentration lower than in males from a reference site [77].

Exposure to the phytoestrogen genistein induces decreased testicular T production and a reduced plasma T concentration in medaka (*Oryzias latipes*, Temminck and Schlegel, 1846) [78]. Similarly, goldfish (*Carassius auratus auratus*, Linnaeus, 1758) exposed to bleached sulfite mill effluent showed a reduction in testicular T and 11KT synthesis [79].

In order to evaluate the effect of PCBs on the neuroendocrine system, male Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*, Linnaeus, 1766) was exposed through diet to Aroclor 1254 for 30 days during gonadal recrudescence. It was noted a decrease in serotonin and dopamine levels and an increase in their metabolites, the response to stimulation by a luteinizing hormone-releasing hormone analogue was also altered. Later it was demonstrated that Aroclor 1254 inhibits hypothalamic *tryptophan hydroxylase* [TPH] activity but not the one of monoamine oxidase [MAO] and that the gonadal growth disturbance that was noted is related to the disruption of the GnRH synthesis through the decline of serotonin levels [80]. This study was followed by further experiments to ensure that these results were related to the decrease of GnRH release. When animals were treated by P-chlorophenylalanine (an irreversible TPH inhibitor) then an exogenous 5-hydroxytryptophan, serotonin has regained normal levels and none deleterious effects were observed. In addition, GnRH implants prevented the PCB-induced decline in GnRH receptors and restored the LH response to a GnRH analog. Then the decline of serotonin concentrations is really related to the PCB induced alteration of the stimulating effects of serotonin-GnRH controlling LH levels [81].

LH secretion is typically higher in sexually mature croaker compared to early recrudescing fish. Khan *et al.* [82] reported that during testicular maturation, GnRH content of the POA, pituitary GnRH receptor density and LH secretion were similar to those of recrudescing male croaker after Aroclor 1254 exposure. PCB seems to disrupt the GnRH-LH system through the decrease of GnRH and its receptors as well as neurotransmitters that control its synthesis like serotonin.

Concerning heavy metals, cadmium for example is known to act centrally to disrupt steroidogenesis at the pituitary level, but it can also act directly on the gonad or liver [83]. Cd activated ER• in estrogen responsive breast cancer cells with similar binding affinity as E₂ and inhibited human and rainbow trout ER transcriptional activity in a recombinant yeast system by affecting DNA binding [84,85]. Cd also alters calcium homeostasis and disrupts signal transduction processes responsible to gonadal and pituitary hormone secretions [86-88]. Other studies have showed that Cd directly inhibits enzymes involved in gonadal steroidogenesis and hepatic steroid metabolism [89]. Cd was found to disrupt the HPGL axis in both males and females at multiple levels. Those parameters were even more sensitive to Cd than the reproductive or development alterations observed in some studies suggesting that they can be adequate indicators for EDCs exposure assessment. Changes in circulating steroid levels were not accompanied with significant effects on plasma VTG or hepatic ER. These results are consistent with a 2-week exposure of medaka hatchlings to the same Cd concentrations in which there were no changes in reproductive output or VTG and ER production [90]. Cd interacts directly with ER but also indirectly by affecting ER mediated processes, which could result in its cumulative effect on ER mediated proteins levels [91]. However, other studies have found Cd inhibits transcriptional activity of rainbow trout ER and to a lesser extent, human ER by affecting DNA binding activity [84]. It was also reported that Cd alters signal transduction and ER-mediated processes involving divalent cations, such as Ca²⁺ and Zn²⁺ which could affect signals along the HPGL axis and alter ER-mediated proteins such as VTG and ER [86].

Gonads Development and Gametogenesis: The measure of the GSI (gonad weight divided by the body weight) is a simple way to evaluate the gonadal dysfunction. Decreased GSI is indicative of decreased hypothalamic, pituitary or gonadal activity. To determine if a particular maturation stage is inhibited and to explore where the pollutant is precisely acting, it is interesting to complete this measure with gonadal histological examination. That can show a block in inducing vitellogenesis, development of spermatogonia, or growth and maturation of oocytes [6,92].

Typically, GSI is reduced after exposure to estrogenic or antiandrogenic contaminants. The decline of GSI could be linked to inhibited testicular development. Suppression of testicular development was shown in fathead minnows

(*Pimephales promelas*, Rafinesque, 1820) collected from a lake then treated with EE₂ [87], in adult fathead minnows exposed to bisphenol A [61] and European sea bass exposed to estrogens during gonadal differentiation [88].

Concerning gonadal histological alterations induced by EDCs, it was noted that mature fathead minnows exposed to environmentally relevant doses of E₂, 4-nonylphenol, or nonylphenol ethoxylate induced many histological lesions such as disturbances in the size and the number of Sertoli cells and germ cell syncytia, degenerative changes in Sertoli cells, necrotic aggregates of various stages of germ cells on males, presence of phagocytic cells in the lumina of seminiferous tubules. In females, in the ovaries follicles seems to be blocked in the primary stage of development and a decline in the secondary and graafian follicles were noted [93,94].

No significant effects on the stages of follicular development were observed in females exposed to NP. In swordtails (*Xiphophorus helleri*, Heckel, 1848) treated with nonylphenol, bisphenol A and their mixture, an increase in apoptotic/necrotic cells in the testicular interstitial tissues and seminiferous tubules was observed [95].

Disruption of spermatogenesis may result in changes in proportions of sex cell types in the testis, blocked spermatogenesis in earlier stage, a decline of the number and the quality of sperm cells and decrease of the germinal cells number [5].

General decreases in spermatogenesis and ejaculated sperm counts have been observed in several species, including goldfish treated with E₂ [96], adult zebrafish after 24 days of laboratory exposure to 17-β-EE₂ [97], adult Japanese medaka exposed to 4-tert-octylphenol [98], swordtails exposed to nonylphenol [95] and adult and sexually developing juvenile guppies (*Poecilia reticulata*, Peters, 1859) exposed to vinclozolin and p,p0-DDE [56,57]. Van den Belt *et al.* [97] noted that those effects were reversible once fish were placed in clean water. In flounder (*Platichthys flesus*, Linnaeus, 1758) captured from contaminated waterways and in wild roach (*Rutilus rutilus*, Linnaeus, 1758) from rivers exposed to sewage effluent, it was observed a sharply reduction in spermatogenesis and an absence of running milt but that can be extracted by stripping [11,78,99,100]. Then an occlusion or a dysfunction of the spermatic ducts could be involved in this disturbance. Toft *et al.* [101] reported that male mosquitofish (*Gambusia affinis*, Baird and Girard, 1853) collected from Lake Apopka, FL (USA) had fewer sperm cells when compared to fish from less contaminated lakes nearby.

In adult fathead minnows exposed to bisphenol A, Sohoni *et al.* [61] observed changes in the proportions of sex cell types in the testis, suggesting an inhibition of spermatogenesis.

Four ppm of Cd significantly decrease ovarian and testicular GSI in the freshwater fish Bata (*Labeo bata*, Hamilton, 1822) whereas 25 ppb of Cd decrease GSI in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum, 1792) [102,103]. While histopathological data is not available for these samples, histological analysis of testis from other chronic Cd exposures in fish exhibit degeneration of mature spermatocyte cells, absence of spermatids and spermatozoa and severe necrosis of Leydig cells [102].

Liver: The liver plays a key role in steroid, drug and xenobiotic biotransformation in all vertebrates that can explain why we can not exclude it from the HPG axis hence the relevance of the HPGL axis analysis (Fig 1). Hepatic biotransformation of steroids could be a relevant tool for the assessment of EDCs. Hepatic enzymes are known to have a large substrate specificity increasing then the number of xenobiotics which they can inactivate [5]. The liver also inactivates endogenous hormones, such as androgens and estrogens. Whereas hepatic biotransformation of steroids is regulated by endogenous sex steroid levels. It can be disrupted by EDCs. EDCs not only can disrupt the gonad development but also they can be involved in the biotransformation of steroids [104,105].

That results in changes in T, E₂ plasmatic concentrations inducing in turn disturbances in the normal functioning of reproductive system.

The enzyme complex cytochrome P450 enzymes is largely involved in the hepatic biotransformation of xenobiotics. It is divided in two families CYP 1 and CYP 2 and it induces oxygen atom to hydrophobic structures by transforming them into water-soluble metabolites (phase I). Then they will be conjugated (phase II) and excreted (phase III) [106].

Some of EDCs like phenobarbitol, 3-methylcolanthrine and •-naphtholflavone induce the cytochrome P450 complex but the families of enzymes involved differ depending on the model studied [e.g., 5 and references therein].

The HPGL axis reveals several potential modes of interaction for EDCs ranging from interference with hormone synthesis and secretion, binding to hormone receptors, or altering the availability of endogenous hormones. Eventually, endocrine disrupting effects are mediated via the available level of steroid hormones or its analogs.

Thus, biomarkers directly responsive to steroid hormone levels are the most widely used as molecular indicators of endocrine disruption. The synthesis of VTG for example is a widely parameter used for the detection of exposure to xenoestrogens *in vivo* and *in vitro* [107,108].

Apart from xenoestrogens, the effect of EDCs acting like androgens or anti-estrogens on VTG levels are not enough explored [109]. Methyltestosterone [MT] (an androgen) and fadrozole [F] (an aromatase inhibitor) were selected to study whether a VTG response can be measured also after exposure to compounds other than estrogens [110]. For this, juvenile fathead minnows were exposed to MT, to F and to a combination of both. The MT exposed fish showed *de novo* synthesis of VTG mRNA, but not the F exposed fish or the fish of the combination group. This result suggests that an endogenous aromatase converts MT to estrogen (methyleneestradiol). Accordingly, exposure to MT leads to a partial feminization of the exposed fathead minnows, while in combination with the aromatase-inhibitor, MT was able to exert its full androgenic potential [109]. In fact it was noted that all fishes showed premature secondary male sex characteristics (pigmented dorsal fin, tubercles, aggressive territory defence). The exposure to the combination of both MT and F was not followed by any increase in VTG levels, which proves even more that MT was aromatized to an estrogen.

The liver plays also a key role in the exposure to heavy metals by the production of metallothioneins [MTs] which are cysteine-rich metal binding proteins that play an essential role in the regulation of intracellular metal concentration [111].

MTs maintain the balance of the zinc which is indispensable for the gametes development. Heavy metals affect the metallothionein synthesis and produce serious damages in zinc homeostasis and *in fine* in gametogenesis [6,112].

The MTs levels are controlled by steroids [113]. MTs and another hepatic enzyme involved in steroids catabolism, the mixed function oxydase [MFO], are considered as good indicators of exposure to heavy metals and of alteration of reproduction [6]. But other stressors such as temperature changes or high rearing density are also able to increase the expression of gene encoding for MTs indicating that MTs are not a specific biomarker and that they can be a good tool to monitor fish stress conditions [114,115].

Sexual Differentiation: Sex steroids, especially androgens and estrogens play a main role in the regulation of the sexual differentiation process.

In fish, it is possible to induce sex reversal by treating fishes with estradiol or testosterone [116]. That has been demonstrated since the late of 1930s and with the expansion of fish culture in the past 25 years, it has been largely used in aquaculture for skewing natural mixed sex population [117,118]. Estrogen and its analogs have been used for generating females while T and androgen analogs, aromatase blockers have been used for generating males [119-122]. In fact, in fish one of the most important factors in sex differentiation is the steroidogenic enzyme cytochrome P450 aromatase, product of the *CYP19a* gene. The role of aromatase consists on converting androgens to estrogens in an irreversible manner and then it plays a main role in determining the final sex in fish. The expression level of *CYP19a* influences sex differentiation: when it is highly expressed, the sex seems directed to female differentiation, while it is directed to male differentiation when it is low expressed [123]. It was demonstrated that sex differentiation was influenced in a large number of teleost species exposed to EDCs that have an estrogenic effect [124]. Exposure of eggs or larvae to environmental xenohormones may lead to similar effects and thus, it has become relevant that reproduction and population dynamics in wildlife, can be influenced by EDCs. Therefore more and more studies focused on dysregulation of sexual development and reproduction and reported a widely deleterious effects such as intersex in medaka caused by the organochlorine •-BHC and nonylphenol [125,126] and in roach below sewage outfalls contaminated with estradiol [3,9], feminization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) exposed to sewage treatment plants [10,127,128], masculinizing effects of pulp and paper mill effluents in female mosquito fish from North-America and New Zealand [129-133]. Intersex or imposex result from disrupted gonadal differentiation and typically consist in the simultaneous presence of ovarian and testicular tissue in the same gonad. In roach intersex, a number of duct malformations associating a female-like reproductive duct and sperm ducts in the same gonad have been reported [11,134,135].

Dramatic induction of VTG and zona radiata proteins [ZRP] in the same or even higher average than those of reproductive females, were detected in males of Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*, Linnaeus, 1758) suggesting that this species may be exposed to xenoestrogens [136,137]. That was approved by De Metrio *et al.* [138] who revealed a high percentage of intersex in this species.

In fish populations exposed to environmental estrogens or antiandrogens, the sex ratio is typically modified in favor of females. This disturbance can either lead to the exposure of developing embryos to the EDC or to the parents exposure or even more to the juvenile fish exposure during the period of sex determination. In fact, it is clear now that the time of exposure to the xenobiotic plays a key role in the sex differentiation. Transgenic zebrafish assays in which the estrogen receptor was transactivated, have shown that ER activity is very high during sexual development and could explain why the period of gonadal differentiation may be especially susceptible to disruption by estrogenic compounds [139]. For example, exposure to E₂ during sexual differentiation increased the frequency of female differentiation in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*, Linnaeus, 1758) [140], Argentinian silverside (*Odontesthes bonariensis*, Valenciennes, 1835) [141], Amur catfish (*Silurus asotus*, Linnaeus, 1758) [142], carp (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758) [143,144] and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*, Lacépède, 1803) [64]. Japanese medaka exposed during development to octylphenol [52] and bisphenol A [145] showed also a sex ratio in favor of females. Similar effects were noted in juvenile guppies following their exposure to xenobiotics that having an antiandrogenic action [57]. It has also been demonstrated that some xenoestrogens like 4-tert-pentylphenol induce intersex in carp gonads [143,144].

Furthermore, it was reported that EDCs could induce other types of disturbances, such as altering the time of sexual maturation by speeding up or even delaying the timing of sexual maturation, what can severely affect reproductive processes, especially if maturation is completely delayed. In this context, Blazquez *et al.* [88] concluded that estrogens were able to delay sexual maturation in the European sea bass even if estrogen exposure happens after sex determination.

As we have seen the effects of EDCs are not limited to gonads, but it can affect different HPGL axis levels. During the critical period of sex reversal induced by exogenous steroid influence, POA-H and GnRH levels vary indicating an impact of sex steroids on GnRH-GtH synthesis [146]. That was approved by Smith and Jennes [147] who have demonstrated that E₂ influenced the central monoaminergic system in POA-H regulating pulsatile secretion of GnRH in mammals. It was also shown that blockage of 5-HT by parachlorophenylalanine mimics estrogenic effect [148]. Heavy metals have also been described as affecting populations sex ratio. Matta *et al.* [149] have demonstrated in fact that mercury was able to induce feminization of the gonads in fish.

Gene Expressions Through the HPGL Axis: Studies concerning EDCs often focus on the involvement of steroid hormone receptors in the disturbances observed. Then other pathways such as disturbed steroidogenesis that can affect gene expression begin to be explored [e.g., 150 and references therein].

EDCs can alter normal patterns of gene expression either by direct (steroid hormone receptor-mediated pathways) or compensatory effects [151].

One mechanism for disrupting the steroidogenic pathway is to alter activity or expression of genes encoding for specific enzymes as the gene encoding for aromatase (*Cyp19* or *P450arom*). In male medaka, brain aromatase activity increased in a dose-dependent manner following E_2 exposure [152].

Another gene which expression could be severely be affected by EDCs is vtg. VTG is a female protein released by the liver and that's serves as a food reserve for embryos and larvae. The synthesis of VTG is hormone-dependent, mediated by the interaction between estradiol and ER, leading to induction of gene expression and transcription. In males activation of estrogen responsive genes is caused by many EDCs which can interfere with gonadotropin release, steroidogenesis and binding to nuclear ER [153-156]. VTG is normally present at high level only in females undergoing oogenesis. In males the vtg gene is normally suppressed. However, the expression of vtg can be induced in males by exposure to E_2 or estrogen mimics. In general the vtg gene is present, but only marginally expressed in males or juveniles [157]. In males and juveniles, abnormal changes in the VTG synthesis represent an indicator of an estrogenic contamination [158-161].

In addition to affecting the expression of vtg and ER, E_2 induces an array of genes, some by direct interaction with the ER and others by alternative pathways. The cascade of genes that are induced is tissue specific. For example, VTG is only produced in the liver, yet we know that E_2 targets other tissues besides the liver, such as the gonads and the brain. While the vtg gene is present in these other tissues, it is not induced by E_2 . Other hormones, such as androgens and thyroid hormones activate their own tissue specific cascades of genes. The identity of many of those genes is limited [49].

Along the HPGL axis many other genes could be affected by EDCs. The same chemical could generate over expression of some genes and under expression of others. Zhang *et al.* [150] have realized a striped view of concentration dependent response profile in EE_2 exposure of male Japanese medaka along the HPGL axis. The resulting map provides a lot of information concerning the genes affected on each level of the HPGL axis and their way to respond to EDCs.

CONCLUSION

Many EDCs were shown to disturb the reproductive system in fish by affecting the HPGL axis at different levels: pituitary, gonads, hormones, the liver catabolism of steroids, gametes quality... These disturbances are often considered as indicators of exposure to pollution, but they are far from specifying neither the corresponding physiological processes of pollutant nor its target components (tissues, genes, proteins). It seems important to determine which component is affected at first in order to know, if the EDC acts directly on the gametes or on a higher level on the HPGL axis (hypothalamus, pituitary, GnRH, GtH and steroid synthesis, the liver catabolism of steroids...) and to determine adequate molecular biomarkers.

It will be interesting for future research to focus on the development of molecular, physiological, or behavioural tools that will allow more extensive testing and analysis of fish response to EDCs [5]. The potential of molecular screening approaches has been recognized as a valuable tool in several applications and has contributed to the development of fish screening assays for EDCs [162-164].

The molecular screening assay, such as DNA and PCR-arrays allow studying the expression profiles of a considerable number of genes after exposure of organisms to xenobiotics. Specific expression profiles for each xenobiotic may be often described, which makes the screening assays important tools for monitoring the aquatic environment. Such tool will enable to the regulatory authorities to evaluate the real risk relied to the EDCs exposure of the aquatic ecosystems with easier and less expensive way [165].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to the Conseil Régional Provence-Alpes Côte d'Azur for the scholarship of Mr Rémy Simide and the Conseil Général de Var for supporting us the long of this work. We also thank Toulon Var Technologie, France (TVT) and Toulon Provence Méditerranée, France (TPM) for their partnerships. We also want to thank Sonia Bernage for her help.

REFERENCES

1. Colborn, T. and C. Clement, 1992. Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection Princeton Scientific Publishing, Princeton, N.J.

2. Kavlock, R.J., G.P. Daston, C. DeRosa, P. Fenner-Crisp, L.E. Gray, S. Kaatari, G. Lucier, M. Hecker, M.J. Mac, C. Mazka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. Sheehan, T. Sinks and H.A. Tilson, 1996. Research needs for the risk assessment of endocrine disruptors: a report of the US-EPA sponsored workshop. *Environ. Health. Perspect.*, 102: 715-740.
3. Routledge, E.J., D. Sheahan, C. Desbrow, G. Brighty, M. Waldock and J.P. Sumpter, 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1559-1565.
4. Harries, J.E., D.A. Sheahan and S. Jobling, 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 534-541.
5. Milnes, M.R., D.S. Bermudez, T.A. Bryan, T.M. Edwards, M.P. Gunderson, I.L.V. Larkin, B.C. Moore and J.L. Guillette, 2006. Contaminant-induced feminization and demasculinization of nonmammalian vertebrate males in aquatic environments. *Environmental Research*, 100: 3-17.
6. Kime, D.E., 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *The Science of the Total Environment*, 225: 3-11.
7. Francis, R.C., 1992. Sexual lability in teleosts: developmental factors. *Q. Rev. Biol.*, 67: 1-18.
8. Larsson, D.G.J., M. Adolfson-Erici, J. Parkkonen, M. Pettersson, A.H. Berg, P.E. Olsson and L. Förlin, 1999. Ethinyloestradiol-an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.*, 45: 91-97.
9. Jobling, S., M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty and J.P. Sumpter, 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.*, 32: 2498-2506.
10. Harries, J.E., A. Janbakhsh, S. Jobling, P. Matthiessen, J.P. Sumpter and C.R. Tyler, 1999. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the UK. *Environ. Tox. Chem.*, 18: 932-937.
11. Jobling, S., S. Coey, J.G. Whitmore, D.E. Kime, K.J.W. van Look, B.G. McAllister, N. Beresford, A.C. Henshaw, G. Brighty, C.R. Tyler and J.P. Sumpter, 2002b. Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility. *Biol. Reprod.*, 67: 515-524.
12. Kidd, K.A., P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak and R.W. Flick, 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104: 8897-8901.
13. Scholz, S. and I. Mayer, 2008. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293: 57-70.
14. Regoli, F., M. Nigro and E. Orlando, 1998. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquat. Toxicol.*, 40: 375-392.
15. Jiménez, B., M.C. Fossi, M. Nigro and S. Focardi, 1999. Biomarker approach to evaluating the impact of scientific stations on the Antarctic environment using *Trematomus bernacchii* as a bioindicator organism. *Chemosphere*, 39: 2073-2078.
16. Miller, H.C., G.N. Mills, D.G. Bembo, J.A. Macdonald and C.W. Evans, 1999. Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an indicator of environmental pollution in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. *Aquat. Toxicol.*, 44: 183-193.
17. Regoli, F., M. Nigro, M. Benedetti, S. Gorbi, C. Pretti, P.G. Gervasi and D. Fattorini, 2005a. Interactions between metabolism of trace metals and xenobiotic agonists of the Ah receptor in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*: environmental perspectives. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24: 1475-1482.
18. Themmen, A.P.N. and I.T. Huhtaniemi, 2000. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr. Rev.*, 21: 551-583.
19. Kime, D.E., 1993. "Classical" and "non-classical" steroids in fish reproduction. *Rev. Fish. Biol. Fisher.*, 3: 160-180.
20. Tyler, C.R., J.P. Sumpter, H. Kawauchi and P. Swanson, 1991. Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 84: 291-299.
21. Thomas, P., 1990. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. *J. Exp. Zool.*, 4: 126-128.
22. Miwa, S., L. Yan and P. Swanson, 1994. Localization of two gonadotropin receptors in the salmon gonad by *in vitro* ligand autoradiography. *Biol. Reprod.*, 50: 629-642.
23. Petersen, C. and O. Söder, 2006. The Sertoli cell-a hormonal target and "super" nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm. Res.*, 66: 153-161.
24. Ohta, T., H. Miyake, C. Miura, H. Kamei, K. Aida and T. Miura, 2007. Folliclestimulating hormone induces spermatogenesis mediated by androgen production in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Biol. Reprod.*, 77: 970-977.

25. García-López, P., J. Bogerd, J.C. Granneman, W. van Dijk, J.M. Trant and R.W. Schulz, 2009. Leydig cells express follicle-stimulating hormone receptors in African catfish. *Endocrinology*, 150: 357-365.
26. Rocha, A., S. Zanuy, M. Carrillo and A. Gómez, 2009. Seasonal changes in gonadal expression of gonadotropin receptors, steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenic enzymes in the European sea bass. *General and Comparative Endocrinology*, 162: 265-275.
27. Miller, W.L., 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr. Rev.*, 9: 295-318.
28. Stocco, D.M. and B.J. Clark, 1996. Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis. *Biochem. Pharmacol.*, 51: 197-205.
29. Manna, P.R. and D.M. Stocco. 2005. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein expression: functional and physiological consequences. *Curr. Drug. Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.*, 5: 93-108.
30. Sreenivasulu, G., P. Sridevi, P.K. Sahoo, I. Swapna, W. Ge, R. Kirubakaran, A. Dutta-Gupta and B. Senthilkumar, 2009. Cloning and expression of StAR during gonadal cycle and hCG-induced oocyte maturation of air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.*, 154: 6-11.
31. Peter, R.E., V.L. Trudeau and B.D. Soley, 1991. Brain regulation of reproduction in teleosts. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. Monogr.*, 16: 89-118.
32. Goos, H.J.T., B. Senthilkumar and K.P. Joy, 1999. Neuroendocrine integrative mechanisms in the control of gonadotropin secretion in teleosts. In *Comparative Endocrinology and Reproduction*, Eds., K.P. Joy, A. Krishna and C. Halder, Narosa Publishing House, New Delhi.
33. Okuzawa, K., K. Gen, M. Bruysters, J. Bogerd, Y. Gothlif, Y. Zohar and H. Kagawa, 2003. Seasonal variations of the three gonadotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid levels in brain of female red seabream. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 130: 324-332.
34. Senthilkumar, B., K. Okuzawa, K. Gen, T. Ookura and H. Kagawa, 1999. Distribution and seasonal variations in levels of three native GnRHs in the brain and pituitary of perciform fish. *J. Neuroendocrinol.*, 11: 181-186.
35. Santos, E.M., M. Rand-Weaver and C.R. Tyler, 2001. Follicle-stimulating hormone and its α and β subunits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): purification, characterization, development of specific radioimmunoassays and their seasonal plasma and pituitary concentrations in females. *Biol. Reprod.*, 65: 288-294.
36. Kirubakaran, R., B. Senthilkumar, C. Sudhakumari and K.P. Joy, 2005. Seasonal dynamics in gonadotropin secretion and E2-binding in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *Fish. Physiol. Biochem.*, 31: 183-188.
37. Looper, M.L., C.A. Lents and R.P. Wettemann, 2003a. Body condition at parturition and postpartum weight changes do not influence the incidence of short-lived corpora lutea in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, 81: 2390-2394.
38. Looper, M.L., J.A. Vizcarra, R.P. Wettemann, J.R. Malayer, T.D. Braden, R.D. Geisert and G.L. Morgan, 2003b. Influence of estradiol, progesterone and nutrition on concentrations of gonadotropins and GnRH receptors and abundance of mRNA for GnRH receptors and gonadotropin subunits in pituitary glands of beef cows. *J. Anim. Sci.*, 81: 269-278.
39. Joy, K.P., B. Senthilkumar and C.C. Sudhakumari, 1998. Periovalvulatory changes in hypothalamic and pituitary monoamines following GnRH analogue treatment in the catfish *Heteropneustes fossilis*: a study correlating changes in plasma hormone profiles. *J. Endocrinol.*, 156: 365-372.
40. Nagahama, Y. and M. Yamashita, 2008. Regulation of oocyte maturation in fish. *Dev. Growth. Diff.*, 50: 195-219.
41. Trudeau, V.L., 1997. Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.*, 2: 55-68.
42. Swapna, I. and B. Senthilkumar, 2009. Influence of ethynylestradiol and methyltestosterone on the hypothalamo-hypophyseal-gonadal axis of adult air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquatic Toxicology*, 95: 222-229.
43. Peter, R.E. and K.L. Yu, 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish. Biol. Fisheries.*, 7: 173-197.
44. Schulz, R.W. and H.J.T. Goos, 1999. Puberty in male fish: concepts and recent developments with special reference to the African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 177: 5-12.

45. WHO World Health Organization, 2002. Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. In Report WHO/PCS/EDC/02, Eds., T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock and G. Van Der Kraak, pp: 180.
46. Tyler, C.R., S. Jobling and J.P. Sumpter, 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.*, 28: 319-361.
47. Edwards, T.M., B. Moore and L. Guillette, 2006. Reproductive dysgenesis in wildlife: a comparative view. *Int. J. Androl.*, 29: 109-121.
48. USEPA, 1998. Endocrine disruptor screening and testing advisory committee (EDSTAC) final report. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
49. Larkin, P., I. Knoebel and N.D. Denslow, 2003. Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.*, 136: 149-161.
50. Guillette, L.J. and A.D. Crain, 2000. Environmental Endocrine Disruptors: an Evolutionary Perspective. New York, pp: 355.
51. NRC, 1999. Hormonally Active Agents in the Environment. National Academy Press, Washington, DC.
52. Knorr, S. and T. Braunbeck, 2002. Decline in reproductive success, sex reversal and developmental alterations in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) after continuous exposure to octylphenol. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 51: 187-196.
53. Tanaka, J.N. and J.M. Grizzle, 2002. Effects of nonylphenol on the gonadal differentiation of the hermaphroditic fish, *Rivulus marmoratus*. *Aquat. Toxicol.*, 57: 117-125.
54. Humadi, L.A., 2011. The Toxic Effects following Gestational and Lactational Exposure of Rats to 4-tert-octylphenol on the Subsequent Development of the Vas Deferens Tissue. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 3: 161-171. IDOSI Publications.
55. Makynen, E.A., M.D. Kahl, K.M. Jensen, J.E. Tietge, K.L. Wells and G. Van Der Kraak, 2000. Effects of the mammalian antiandrogen vinclozolin on development and reproduction of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 48: 461-475.
56. Baatrup, E. and M. Junge, 2001. Antiandrogenic pesticides disrupt sexual characteristics in the adult male guppy *Poecilia reticulata*. *Environ. Health. Perspect.*, 109: 1063-1070.
57. Bayley, M., M. Junge and E. Baatrup, 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. *Aquat. Toxicol.*, 56: 227-239.
58. Kinnberg, K. and G. Toft, 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 54: 16-24.
59. Haubruge, E., F. Petit and M.J. Gage, 2000. Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol A. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 22: 2333-2337.
60. Shioda, T. and M. Wakabayashi, 2000. Effect of certain chemicals on the reproduction of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 40: 239-243.
61. Sohoni, P., C.R. Tyler, K. Hurd, J. Caunter, M. Hetheridge, T. Williams, C. Woods, M. Evans, R. Toy, M. Gargas and J.P. Sumpter, 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol a in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.*, 35: 2917-2925.
62. Jobling, S., N. Beresford, M. Nolan, T. Rodgers-Gray, G.C. Brighty, J.P. Sumpter and C.R. Tyler, 2002a. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol. Reprod.*, 66: 272-281.
63. Govindasamy, C. and M. Sundaramoorthy, 2011. Impact of Municipal Waste on the Water Quality of River Palar, Tamilnadu, India. *Global J. Environmental Research*, 5:39-45. IDOSI Publications.
64. Zillioux, E.J., I.C. Johnson, Y. Kiparissis, C.D. Metcalfe, J.V. Wheat, S.G. Ward and H. Liu, 2001. The sheepshead minnow as an in vivo model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17 β -ethynylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 1968-1978.
65. Ankley, G.T., K.M. Jensen, E.A. Makynen, M.D. Kahl, J.J. Korte and M.W. Hornung, 2003. Effects of the androgenic growth promoter 17-beta-trenbolone on fecundity and reproductive endocrinology of the fathead minnow. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22: 1350-1360.
66. Arcand-Hoy, L.D. and W.H. Benson, 1998. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17: 49-57.

67. Sloman, K.A., 2007. Effects of trace metals on salmonid fish: The role of social hierarchies. *Applied Animal Behaviour Science*, 104: 326-345.
68. Safe, S., 2003. Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nat. Med.*, 9: 1000-1001.
69. Henson, M.C. and P.J. Chedrese, 2004. Minireview. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp. Biol. Med.*, 229: 383-392.
70. Nesatyy, V.J., B.V. Rutishauser, R.I. Eggen and M.J. Suter, 2005. Identification of the estrogen receptor Cd-binding sites by chemical modification. *Analyst.*, 130: 1087-1097.
71. Bulger, W.H. and D. Kupfer, 1985. Estrogenic activity of pesticides and other xenobiotics on the uterus and male reproductive tract. *Endocr. Toxicol.*, 36: 31-52.
72. Michibata, H., Y. Nojima and M.K. Kojima, 1987. Stage sensitivity of eggs of the teleost *Oryzias latipes* to cadmium exposure. *Environ. Res.*, 42: 321-327.
73. Rani, A.U., 2000. Cadmium-induced bioaccumulation in the selected tissues of a freshwater teleost, *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ann. NY. Acad. Sci.*, 919: 318-320.
74. Jalabert, B., J.F. Baroiller, B. Breton, A. Fostier, F. Le Gac, Y. Guiguen and G. Monod, 2000. Main neuro-endocrine, endocrine and paracrine regulations of fish reproduction and vulnerability to xenobiotics. *Ecotoxicology*, 9: 25-40.
75. Mills, L.G., R.E. Gutjahr-Gobell, R.A. Haebler, D.J.B. Horowitz, S. Jayaraman, R.J. Pruell, R.A. McKinney, G.R. Gardner and G.E. Zaroogian, 2001. Effects of estrogenic (o,p0-DDT; octylphenol) and antiandrogenic (p,p0-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat. Toxicol.*, 52: 157-176.
76. Foster, E.P., M.S. Fitzpatrick, G.W. Feist, C.B. Schreck, J. Yates, J.M. Spitsbergen and J.R. Heidel, 2001. Plasma androgen correlation, EROD induction, reduced condition factor and the occurrence of organochlorine pollutants in reproductively immature white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) from the Columbia River, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 182-191.
77. Orlando, E.F., N.D. Denslow, L.C. Folmar and L.G. Guillette, 1999. A comparison of the reproductive physiology of largemouth bass, *Micropterus salmoides*, collected from the Escambia and Blackwater Rivers in Florida. *Environ. Health. Perspect.*, 107: 199-204.
78. Zhang, L.L., I.A. Khan and C.M. Foran, 2002. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Com. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, 132: 203-211.
79. Parrot, J.L., J.J. Jardine, B.R. Blunt, L.H. McCarthy, M.E. McMaster, C.S. Wood, J. Roberts and J.H. Carey, 1999. Comparing biological responses to mill process changes: a study of steroid concentrations in goldfish exposed to effluent and waste streams from a Canadian bleached sulphite mill. *Water. Sci. Technol.*, 40: 115-121.
80. Khan, I.A. and P. Thomas, 2000. Lead and Aroclor 1254 disrupt reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. *Mar. Environ. Res.*, 50: 119-123.
81. Khan, I.A. and P. Thomas, 2001. Disruption of neuroendocrine control of luteinizing hormone secretion by Aroclor 1254 involves inhibition of hypothalamic tryptophan hydroxylase activity. *Biol. Reprod.*, 64: 955-964.
82. Khan, I.A., S. Mathews, K. Okuzawa, H. Kagawa and P. Thomas, 2001. Alterations in the GnRH-LH system in relation to gonadal stage and Aroclor 1254 exposure in Atlantic croaker. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 129: 251-259.
83. Radhakrishnan, M.V. and S. Hemalatha, 2010. Sublethal Toxic Effects of Cadmium Chloride to Liver of Freshwater Fish *Channa striatus* (Bloch.). *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 2: 54-56. IDOSI Publications.
84. Le Guével, R., F.G. Petit, P. LeGoff, R. Métivier, Y. Valotaire and F. Pakdel, 2000. Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) estrogen receptor activity by cadmium. *Biol. Reprod.*, 63: 259-266.
85. Stoica, A., B.S. Katzenellenbogen and M.B. Martin, 2000. Activation of estrogen receptor- α by the heavy metal cadmium. *Mol. Endocrinol.*, 14: 545-553.
86. Thomas, P., 1999. Non-traditional sites of endocrine disruption by chemicals on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis: interactions with steroid membrane receptors, monoaminergic pathways and signal transduction systems *Endocrine Disruptors: Effects on Male and Female Reproductive Systems*. Naz RK. Boca Raton, FL.
87. Palace, V.P., R.E. Evans, K. Wautier, C. Baron, L. Vandenbyllardt, W. Vandersteen and K. Kidd, 2002. Induction of vitellogenin and histological effects in wild fathead minnows from a lake experimentally treated with the synthetic estrogen, ethynylestradiol. *Water. Qual. Res. J. Can.*, 37: 637-650.

88. Blazquez, M., P.T. Bosma, E.J. Fraser, K.J.W. Van Look and V.L. Trudeau, 1998. Fish as model for the endocrine regulation of reproduction and growth. *Comp. Biochem. Physiol.*, 119C: 345-364.
89. Singhal, R.L., R. Nijayvargiya and G.S. Shukla, 1985. Toxic effects of cadmium and lead on reproductive functions. In *Target Organ Toxicology Series: Endocrine Toxicology*, Eds., J.A. Thomas, K.S. Korach and J.A. McLachlan. New York, pp: 149-180.
90. Foran, C.M., B.N. Peterson and W.H. Benson, 2002. Influence of parental and developmental cadmium exposure on endocrine and reproductive function in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 133: 345-354.
91. Tilton, S.C., C.M. Foran and W.H. Benson, 2003. Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 136C: 265-276.
92. Ansari, S. and B.A. Ansari, 2011. Embryo and Fingerling Toxicity of Dimethoate and Effect on fecundity, Viability, Hatchability and survival of zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 3: 167-173. IDOSI Publications.
93. Miles-Richardson, S.R., V.J. Kramer, S.D. Fitzgerald, J.A. Render, B. Yamini, S.J. Barbee and J.P. Giesy, 1999a. Effects of waterborne exposure of 17 β -estradiol on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.*, 47: 129-145.
94. Miles-Richardson, S.R., S.L. Pierens, K.M. Nichols, V.J. Kramer, E.M. Snyder, S.A. Snyder, J.A. Render, S.D. Fitzgerald and J.P. Giesy, 1999b. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ. Res.*, 80: 122-137.
95. Kwak, H.J., M.O. Bae, M.H. Lee, Y.S. Lee, B.J. Lee, K.S. Kang, C.H. Chae, H.J. Sung, J.S. Shin, J.H. Kim, W.C. Mar, Y.Y. Sheen and M.H. Cho, 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 20: 787-795.
96. Schoenfuss, H.L., J.T. Levitt, G. Van der Kraak and P.W. Sorensen, 2002. Ten-week exposure to treated sewage discharge has relatively minor, variable effects on reproductive behavior and sperm production in goldfish. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 2185-2190.
97. Van den Belt, K., P.W. Wester, L.T.M. Van der Ven, R. Verheyen and H. Witters, 2002. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 767-775.
98. Gronen, S., N. Denslow, S. Manning, S. Barnes, D. Barnes and M. Brouwer, 1999. Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-octylphenol. *Environ. Health. Perspect.*, 107: 385-390.
99. Lye, C.M., C.L.J. Frid and M.E. Gill, 1998. Seasonal reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to sewage effluent. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 170: 249-260.
100. Lye, C.M., C.L.J. Frid, M.E. Gill and D. McCormick, 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar. Pollut. Bull.*, 34: 34-41.
101. Toft, G., T.M. Edwards, E. Baatrup and J.L.J. Guillette, 2003. Disturbed sexual characteristics in male mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) from a lake contaminated with endocrine disrupters. *Environ. Health. Perspect.*, 1: 1.
102. Das, R.C., 1988. Cadmium toxicity to gonads in freshwater fish, *Labeo bata* (Hamilton). *Arch. Hydrobiol.*, 112: 467-474.
103. Pereira, J.J., R. Mercaldo-Allen, C. Kuropat, D. Luedke and G. Sennefelder, 1993. Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 24: 427-431.
104. Guillette, L.J. and M.P. Gunderson, 2001. Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction*, 122: 857-864.
105. Gunderson, M.P., G.A. LeBlanc and L.J. Guillette, 2001. Alterations in sexually dimorphic biotransformation of testosterone in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated lakes. *Environ. Health Perspect.*, 109: 1257-1264.
106. Aminard, J.C. and C. Amiard-Triquet, 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Tec and Doc Lavoisier. Paris.
107. Swanson, P., J.T. Dickey and B. Campbell, 2003. Biochemistry and physiology of fish gonadotropins. *Fish. Physiol. Biochem.*, 28: 53-59.

108. Folmar, L.C., N.D. Denslow, V. Rao, M. Bayley, D.A. Crain, J. Enblom, J. Marcino and L.J. Guillette, 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male Carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Comp. Biochem. Physiol.*, 104: 1096-1101.
109. Zerulla, M., R. Länge, T. Steger-Hartmann, G. Panter and D.R. Dietrich, 2002. Morphological sex reversal upon short-term exposure to endocrine modulators in juvenile fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicology Letters*, 131: 51-63.
110. Panter, G.H., T.H. Hutchinson, R. Länge, M. Zerulla, C.M. Lye, J.P. Sumpter and C.R. Tyler, 2002. Utility of a juvenile Fathead minnow screening assay for detecting (anti-) estrogenic substances. *Environ. Tox. Chem.*, 21: 319-326.
111. Chang, K.M., 1995. Metallothionein: potential biomarker for monitoring Heavy Metal pollution in Fish around Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, 31: 411-415.
112. Olsson, P.E., M. Zafarulla and L. Gedamu, 1989. A role of metallothionein in zinc regulation after estradiol induction of vitellogenin synthesis in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Biochem. J.*, 257: 555-559.
113. Overnell, J., R. McIntosh and T.C. Fletcher, 1987. The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, *Pleuronectes platessa*, during the breeding season and the effects of estradiol injection. *J. Fish. Biol.*, 30: 539-546.
114. Van Cleef-Toedt, K.A., L.A. Kaplan and J.F. Crivello, 2001. Killifish metallothionein messenger RNA expression following temperature perturbation and cadmium exposure. *Cell. Stress. Chaperones*, 6: 351-359.
115. Rosalba, G., E. Papis, S. Rimoldi, G. Terova, M. Saroglia and G. Bernardini, 2004. Rearing density influences the expression of stress-related genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Gene*, 341: 111-118.
116. Mousavi-Sabet, H., 2011. The Effect of 17-Alpha Methyl testosterone on Masculinization, Mortality Rate and growth in Convict Cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Journal of Fish and Marine Sciences*, 3: 422-426. IDOSI Publications.
117. Schreck, C.B., 1974. Hormonal treatment and sex manipulation in fishes. *Control of Sex in Fishes*. In Virginia Polytechnic Institute and State University Sea Grant Program, Eds., Schreck, C.B. pp: 84-106.
118. Yamazaki, F., 1983. control and manipulation in fish. *Aquaculture*, 33: 329-354.
119. Kwon, J.Y., V. Haghpanah, L.M. Kogson-Hurtado, B.J. McAndrew and D.J. Penman, 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. *J. Exp. Zool.*, 287: 46-53.
120. Kobayashi, T., H. Kajiura-Kobayashi and Y. Nagahama, 2003. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. *Cytogenet. Genome. Res.*, 101: 289-294.
121. Nagahama, Y., 2005. Molecular mechanisms of sex determination and gonadal sex differentiation in fish. *Fish. Physiol. Biochem.*, 31: 105-109.
122. Raghuvver, K. and B. Senthilkumaran, 2009. Identification of multiple Dmrt1s in catfish: localization, dimorphic expression pattern, changes during testicular cycle and after methyltestosterone treatment. *J. Mol. Endocrinol.*, 42: 437-448.
123. Blázquez, M., A. González, M. Papadaki, C. Mylonas and F. Piferrer, 2008. Sex related changes in estrogen receptors and aromatase gene expression and enzymatic activity during early development and sex differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 158: 95-101.
124. Piferrer, F., 2001. Sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture*, 197: 229-281.
125. Wester, P.W. and J.H. Kim, 1986. Histopathological study of *Oryzias latipes* medaka. after long-term ?-hexachlorocyclohexane exposure. *Aquat. Toxicol.*, 9: 21-45.
126. Gray, M.A. and C.D. Metcalfe, 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka *Oryzias latipes* exposed to p-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16: 1082-1086.
127. Jobling, S. and J.P. Sumpter, 1993. Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study using Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 27: 361-372.
128. Purdom, C.E., P.A. Hardiman, V.J. Bye, N.C. Eno, C.R. Tyler and J.P. Sumpter, 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.*, 8: 275-285.

129. Howell, W.M., D.A. Black and S.A. Bortone, 1980. Abnormal expression of secondary sex characteristics in a population of Mosquitofish, *Gambusia affinis holbrooki*: evidence for environmentally induced masculinization. *Copeia*, 4: 676-681.
130. Munkittrick, K.R., C.B. Portt, G. van der Kraak, R.J. Smith and D.A. Rokosh, 1991. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity and serum steroid levels of a Lake Superior White Sucker (*Catostomus commersoni*) population. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1371-1380.
131. Munkittrick, K.R., G. van der Kraak, M.E. McMaster and C.B. Portt, 1992. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11: 1439.
132. Parks, L.G., C.S. Lambricht, E.F. Orlando, L.J.J.R. Guillette, G.T. Ankley and J.R. Gray, 2001. Masculinization of female Mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway river water is associated with androgen receptor agonist activity. *Toxicol. Sci.*, 62: 257-267.
133. Ellis, R.J., M.R. van den Heuvel, T.R. Stuthridge, L.H. Mc Carthy, N. Ling, I.D. Hogg and D. Dietrich, 2001. Androgenic responses in two fish species following exposure to a New Zealand pulp and paper mill wastewaters. In *Toxicol. Sci. USA*, pp: 771-771.
134. Nolan, M., S. Jobling, G. Brighty, J.P. Sumpter and C.R. Tyler, 2001. A histological description of intersexuality in the roach. *J. Fish. Biol.*, 58: 160-176.
135. Rodgers-Gray, T.P., S. Jobling, C. Kelly, S. Morris, G. Brighty, M.J. Waldock, J.P. Sumpter and C.R. Tyler, 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environ. Sci. Technol.*, 35: 462-470.
136. Fossi, M.C., S. Casini, S. Ancora, A. Moscatelli, A. Ausili and G. Notarbartolo-Di-Sciara, 2001. Do endocrine disrupting chemicals threaten Mediterranean swordfish Preliminary results of vitellogenin and zona radiata proteins in *Xiphias gladius*. *Mar. Environ. Res.*, 52: 477-483.
137. Fossi, M.C., S. Casini, L. Marsili, S. Ancora, G. Neri, T. Romeo, A. Moscatelli, A. Ausili and G. Notarbartolo Di Sciara, 2002. Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Mar. Environ. Res.*, 54: 667-671.
138. De Metrio, G., A. Corriero, D. Zubani, F. Cirillo, M. Deflorio, C.R. Bridges, J. Eicker, J.M. De la Serna, P. Megalofonou and D.E. Kime, 2003. Evidence of high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*). *Mar. Poll. Bull.*, 46: 358-361.
139. Legler, J., J.L.M. Broekhof, A. Brouwer, P.H. Lanser, A.J. Murk, P.T. Van der Saag, F.C. Vethaak, P. Wester, D. Zivkovic and B. Van der Burg, 2000. A novel in vivo bioassay for (xeno-) estrogens using transgenic zebrafish. *Environ. Sci. Technol.*, 34: 4439-4444.
140. Martinrobichaud, D.J., R.H. Peterson, T.J. Benfer and L.W. Crim, 1994. Direct feminization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L) using 17 β -estradiol-enriched artemia as food. *Aquaculture*, 123: 137-151.
141. Strussmann, C.A., F. Takashima and K. Toda, 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Aquaculture*, 139: 31-45.
142. Kim, D.S., H.J. Cho, I.C. Bang, G.C. Choi and Y.K. Nam, 2001. Effects of immersion of larvae in 17 beta oestradiol on feminization, structural changes of gonad and growth performance in the Far Eastern catfish *Silurus asotus* (Linnaeus). *Aquacult. Res.*, 32: 323-328.
143. Gimeno, S., H. Komen, A.G.M. Gerritsen and T. Bowmer, 1998a. Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquat. Toxicol.*, 43: 77-92.
144. Gimeno, S., H. Komen, S. Jobling, J. Sumpter and T. Bowmer, 1998b. Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquat. Toxicol.*, 43: 93-109.
145. Yokota, H., Y. Tsuruda, M. Maeda, Y. Oshima, H. Tadokoro, A.R. Nakazono, T. Honjo and K. Kobayashi, 2000. Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 1925-1930.
146. Lee, Y.H., J.L. Du, W.S. Yueh, B.Y. Lin, J.D. Huang, C.Y. Lee, M.F. Lee, E.L. Lau, F.Y. Lee, C. Morrey, Y. Nagahama and C.F. Chang, 2001. Sex change in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegelii*: a review in gonadal development, estradiol, estrogen receptor, aromatase activity and gonadotropin. *J. Exp. Zool.*, 290: 715-726.
147. Smith, M.J. and L. Jennes, 2001. Neural signals that regulate GnRH neurons directly during the oestrous cycle. *Reproduction*, 122: 1-10.

148. Tsai, C.L., L.H. Wang and L.S. Fang, 2001. Estradiol and para-chlorophenylalanine down regulate the expression of brain aromatase and estrogen receptor- α mRNA during the critical period of feminization in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Neuroendocrinology, 74: 325-334.
149. Matta, M.B., J. Linse, C. Cairncross, L. Francendese and R.M. Kocan, 2001. Reproductive and transgenerational effects of methylmercury or Aroclor 1268 on *Fundulus heteroclitus*. Environ. Toxicol. Chem., 20: 327-335.
150. Zhang, X., M. Hecker, J.W. Park, A.R. Tompsett, J. Newsted, K. Nakayama, P.D. Jones, D. Au, R. Kong, R.S.S. Wu and J.P. Giesy, 2008. Real-time PCR array to study effects of chemicals on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis of the Japanese medaka. Aquatic Toxicology, 88: 173-182.
151. Villeneuve, D.L., P. Larkin, I. Knoebl, A.L. Miracle, M.D. Kahl, K.M. Jensen, E.A. Makynen, E.J. Durhan, B.J. Carter, N.D. Denslow and G.T. Ankley, 2007b. A graphical systems model to facilitate hypothesis-driven ecotoxicogenomics research on the teleost brain-pituitary-gonadal axis. Environ. Sci. Technol., 41: 321-330.
152. Melo, A.C. and J.S. Ramsdell, 2001. Sexual dimorphism of brain aromatase activity in medaka: induction of a female phenotype by estradiol. Environ. Health. Perspect., 109: 257-264.
153. Safe, S., 2000. Endocrine disruptors and human health-is there a problem: an update. Environ. Health. Perspect., 108: 487-493.
154. Thomas, P. and I.A. Khan, 1995. Mechanisms of chemical interference with reproductive endocrine function in sciaenid fishes Chemically Induced Alterations R.M. Rolland, M. Ilbertson and R.E. Peterson.
155. Loomis, A.K. and P. Thomas, 1999. Binding characteristics of estrogen receptor (ER) in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) testis: different affinity for estrogens and xenobiotics from that of hepatic ER. Biol. Reprod., 61: 51-60.
156. Murphy, C.A., K.A. Rose and P. Thomas, 2005. Modelling vitellogenesis in female fish exposed to environmental stressors: predicting the effects of endocrine disturbance due to exposure to a PCB mixture and cadmium. Reprod. Toxicol., 19: 395-409.
157. Tyler, C.R., R. vanAerle, T.H. Hutchinson, S. Maddix and H. Trip, 1999. An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. Environ. Tox. Chem., 18: 337-347.
158. Sumpter, J.P. and S. Jobling, 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health. Persp., 103: 173-178.
159. Heppell, S.A., N.D. Denslow, L.C. Folmar and C.V. Sullivan, 1996. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Environ. Health. Perspect., 103: 9-15.
160. Sole', M., D. Raldua, D. Barcelo and C. Porte, 2003. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones and biotransformation enzymes in female carp in relation to a sewage treatment works. Ecotoxicol. Environ. Safe., 56: 373-380.
161. Scott, A.P., I. Katsiadaki, P.R. Witthames, K. Hylland, I.M. Davies, A.D. McIntosh and J. Thain, 2006. Vitellogenin in the blood plasma of male cod (*Gadus morhua*): a sign of oestrogenic endocrine disruption in the open sea? Mar. Environ. Res., 61: 149-170.
162. Hutchinson, T.H., G.T. Ankley, H. Segner and C.R. Tyler, 2006. Screening and testing for endocrine disruption in fish-biomarkers as "signposts," not "traffic lights" in risk assessment. Environ Health Perspect. Environ. Health. Perspect., 114: 106-114.
163. OECD, 2006. Report of the validation of the 21-day fish screening assay for the detection of endocrine substances (phase 1b), series on testing and assessment, ENV/JM/MONO, pp: 29.
164. USEPA, 2007. Validation of the fish short-term reproduction assay: integrated summary report, US. US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
165. Prévot-D'Alvise, N., S. Pierre, S. Coupé, S. Gaillard, S. Richard, J. Aubert and J.P. Grillasca, 2011. The cutting Edge of endocrine disrupting chemicals in freshwater fishes. in Environmental Research, 21: 301-330.



EFFECT OF WATER TEMPERATURE INCREASE ON HO-1 EXPRESSION IN EUROPEAN SEA BASS (*Dicentrarchus labrax* L.) TISSUES

L. HACHFI¹, R. SIMIDE¹, S. RICHARD¹, S. COUVRAY^{1,2}, S. COUPE^{1,4}, S. GAILLARD^{1,4}, S. PIERRE³, J.P. GRILLASCA^{1,3,4} AND N. PREVOT-D'ALVISE¹*

¹ Équipe de Biologie Moléculaire Marine - PROTEE, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France

² Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez- Le Brusç, 83140 Six Fours Les Plages, France

³ AquaBioMass – 1025 Chemin du Naï, 83136 Méounes les Montrieux, France

⁴ BioTechServices, Université du Sud Toulon-Var, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex, France

Abstract

One of the most pertinent environmental factors influencing the marine organism life is temperature. It has been demonstrated that an increase of temperature is able to induce the synthesis of heat shock proteins (HSP). In this study we investigated the expression of HO-1 mRNA, also referred to as HSP32, in different tissues of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) at several time points after increased temperature exposure (from 12°C to 30°C). Our results showed that HO-1 was not expressed in gills, heart, muscle and brain while it was expressed at a basal level in intestine. In liver, spleen and kidneys, HO-1 expression was influenced by temperature increases. In the spleen, we found a significant decrease of the HO-1 expression at the end of 4 weeks. In kidneys a very fast collapse of HO-1 expression level was recorded reaching null value as soon as one hour after exposure to 30°C. In liver, HO-1 expression increased from one hour of exposure to 30°C confirming HO-1 involvement to heat shock response in this organ. This increasing trend reached a 4.5-fold higher value than the initial level after 4 weeks.

Key words: *Dicentrarchus labrax*, gene expression, heme oxygenase-1, temperature increase, Heat Shock Protein 32.

Article information

Received on June 24, 2012

Accepted on September 7, 2012

* Corresponding author

Tel: + 33 (0) 4 94142670

Fax: + 33 (0) 4 94142045

E-mail: nathalie.prevot@univ-tln.fr

INTRODUCTION

One of the most pertinent environmental factors influencing the marine organism life is temperature (15). With the global warming and the worldwide decline of fishery stocks, increasing interest is accorded to study the effects of temperature increase on physiological and biochemical responses of fishes (8,11,19,20). Temperature exceeding the tolerance range can disrupt growth and reproduction of fish as well as larval development (27,30) and is considered as a real stress for organisms. Indeed an increase of normal growing temperature of 4 to 8°C is able to induce the synthesis of stress proteins (7). Classically named as heat shock proteins (HSP), their synthesis has been shown to be the first response to a large number of non-physiological stressors other than heat such as heavy metals, toxic chemicals, UV-light, etc... These proteins are synthesized to protect organisms from environmental stressors in order to maintain homeostasis and insure cell survival even if some display basal synthesis levels in normal unstressful conditions (17,34). This mechanism, commonly named stress adaptation or tolerance, is supposed to minimize the response of the organism to further exposures to the same stimulus (34). Genes coding for HSP represent an early biomarker of stress exposure in ecotoxicological studies (17). HSP are commonly classified by their molecular weight HSP25, HSP32, HSP60, HSP70 etc...(34).

Heme oxygenase-1 (HO-1), also referred to as heat shock protein (HSP32) is one of the three isoforms (in addition to HO-2 and HO-3) of the heme oxygenase enzyme (HO) responsible for the heme degradation into biliverdin (a cytoprotective antioxidant), carbon monoxide (a sig-

naling gas) and iron. Biliverdin and its products prevent cells from oxidative damages (13,24,34). However, extensive research have demonstrated that HO-1 induction may have both antioxidant and pro-oxidant activities related to iron release (28). Immunomodulatory as well as anti-inflammatory and anti-apoptotic properties have also been revealed (4,5). Unlike HO-2 and HO-3 isoforms which are constitutively expressed in cells under normal conditions, the HO-1 isoform has been demonstrated to be inducible as an adaptative cellular defense against various stressors (1) such as heat shock, UVA radiation, hydrogen peroxide, sodium arsenite, heavy metals, endotoxin, etc... These stressors were reported to induce HO-1 expression (17 and references therein). Moreover, HO-1 plays a relevant role in cytoprotective process (34).

The European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, Linne 1785) is one of the major species bred in aquaculture and is naturally present in the Mediterranean sea where temperature varies from 10°C to 28°C along the year (19). Growth and metabolism are dependent on water temperature (8 and references therein). Optimal growth temperature has been set between 22 and 25°C, whereas growth seems to stop at 11-15°C. Temperatures lower than 2°C and higher than 32°C are lethal to sea bass. Temperature interacts not only with biological factors but also with external ones like oxygen and salinity (18 and references therein). Other effects of non-optimal temperature, such as spleen contraction, increase in the erythrocyte number, hyperglycaemia, increase in leucocrit and swelling of erythrocytes reflecting an hypoxic state were observed (11). Since European sea bass represents a great commercial interest, it is relevant to study the impact of environmental variations that may

affect its welfare.

In the present study, we evaluate the effect of water temperature increase in *D. labrax* HO-1 gene expression in eight tissues (heart, liver, intestine, spleen, kidneys, gills, brain and muscle) at several time points in a warm temperature acclimation experiment.

MATERIALS AND METHODS

Animals and aquariums

All experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care under the appropriate approved animal care protocol described in «The care and use of fish in research, teaching and testing». Juvenile European sea bass were reared in a fish farm located at «La Seyne sur Mer» near the Mediterranean coast of France, within natural environmental conditions.

Eighteen one-year-old juveniles (80–100 g) were collected and transferred into 150 L filter aquariums in our zoo-technical laboratory and held at 12°C for 5 weeks before the warm acclimation experiment. They were fed daily to satiation during the entire experiment.

Warm acclimation experiment

The warm acclimation experiment was conducted as previously described by Watabe *et al.* (33). The aquarium water temperature was increased by 1°C every hour from 12°C to 30°C, then maintained at 30°C for 4 weeks. Fishes were divided into groups of three for each of the six experimental conditions (12°C control group, and 30°C groups acclimated for 1h and from 1 to 4 weeks). The material used for this experiment included resistors (Shego, 300 W) connected in series with the thermostat (Thermostat, Aquael). The temperature was checked on the digital thermostat and another thermometer in the aquarium. The accuracy on the water temperature was $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Other water parameters were also strictly controlled: salinity 30 g/L, pH 7.5, nitrite <0.3 mg/L and nitrate <12.5 mg/L.

Tissue collection and RNA extraction

Fish were sedated with 2-phenoxyethanol overdose and sacrificed by cervical dislocation.

Samples of liver, kidneys, spleen, brain, muscle, gills, heart and intestine were collected from freshly sacrificed fishes and immediately submerged in RNAlater (Ambion, the RNA Company). Then they were stored at -80°C until further analysis.

Total RNA was extracted from tissues (50–100 mg) using 1 ml of EXTRACT-ALL (Eurobio, France) according to the manufacturer's instructions. After homogenization using FastPrep-24 and Lysing Matrix D (MP Biomedicals), 200 μl of chloroform were added and samples were vortexed for 15 sec and left at room temperature for 3 min. Then they were centrifuged at 12000 g for 15 min at 4°C, the aqueous phase was transferred to new tubes and 500 μl of isopropanol were added and the tubes were left for 10 min at room temperature.

After a second centrifugation (12000 g, 10 min, 4°C), supernatant was removed and total RNA pellet was washed in 75% ethanol.

Following the third centrifugation (7500 g, 5 min, 4°C), supernatant was removed and total RNA pellet was air dried for 10 min. Later the total RNA pellet was redissolved in 50 μl of distilled water.

A digestion with 2U/ μl DNase I, RNase-free (Ambion) at 37°C for 30 min was performed in order to avoid any DNA contamination. An electrophoresis on an agarose gel showed a clear individual 28S and 18 rRNA bands and no smear confirming the integrity of extracted RNA (data not shown). Concentration and quality were assessed by spectrophotometry.

Reverse transcription and polymerase chain reaction

The cDNAs were generated following the standard protocol of Superscript II RNase H Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) using random Hexa-primers and 1 μg of total RNA. Oligonucleotides used for the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) are listed in Table 1. PCR conditions were as follow: 2 min at 94°C, 30 cycles of 45 sec at 94°C (DNA denaturation), 45 sec at 63°C (annealing), 2 min at 72°C (extension), followed by a 5 min final extension phase. The PCR was performed using specific primers (initial concentration: 10 pmol/ μL) for HO-1 (forward: HO-1Dir201; reverse: HO-1Rev201), resulting in a 201 bp PCR product corresponding to the amplification between positions +494 and +694 of the HO-1 sequence HO-1 (GenBank accession no.EF139130). Normalization was carried with RPL17 sequence (GenBank accession no.AF139590) run under the same conditions and resulting in a 389 bp PCR product corresponding to the amplification between positions +18 and +407. Its expression is supposed to be invariable among individuals and experimental conditions (Table 1). The visualization of amplified cDNA was performed by a 1.5% TAE agarose gel electrophoresis (UV, coloration with ethidium bromide). The 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen) was used to verify the size of amplified bands.

Gene expression and statistical analysis

Gene expression levels were quantified with ImageJ software (25) and normalized with RPL17 gene expression. The image analysis falls within the linear range of the densitometry. Analysis of the results was performed by ANOVA using the software XLSTAT. The null hypothesis supposing that no significant difference exists between groups was rejected for a probability under 0.05. The Tukey's multiple range test was used to determine significant differences between different groups.

RESULTS

Following one hour of heat stress, we noted a 2.5 fold increase in HO-1 expression in liver compared to the control group. From one hour to 3 weeks, HO-1 expression steadily increased to reach after 4 weeks of heat exposure, a 4.5-fold increase statistically different from the initial value (Fig. 1 and Fig. 2) ($P < 0.05$).

In the spleen, we found a significant decrease of HO-1 expression at the end of the 4 week period. This decrease in HO-1 expression resulted in values lower than baseline values observed in fish group under control conditions (12°C) (data not shown).

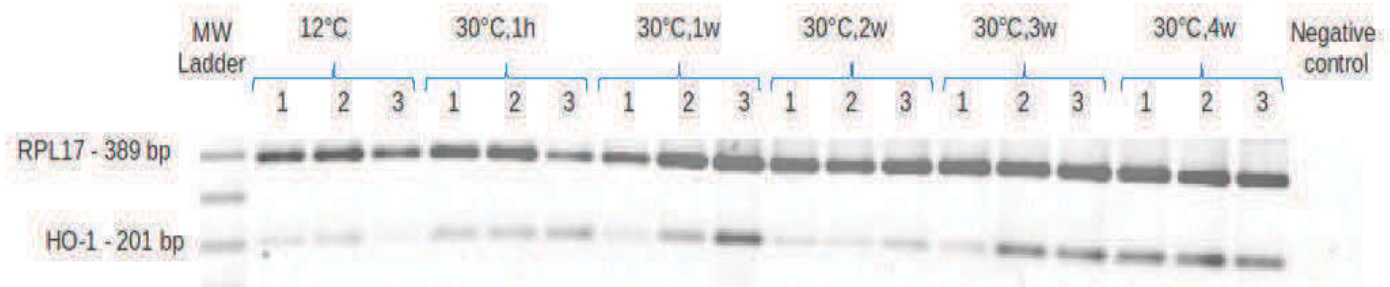
A decrease in HO-1 expression was also observed in kidneys. This important decrease appeared earlier than in the spleen despite similar baseline levels. HO-1 gene expression reached null value as soon as one hour after exposure to 30°C and remained at this level for the rest of the experi-

Table 1. Primers used in polymerase chain reaction.

Primer	Sequence (5'→3')	cDNA position
HO-1Dir201	5'CCCTGAATTTCTAGTTGCCCATGC3'	494→517
HO-1Rev201	5'TCCGTCAGCTCCACGCTGTTCATC3'	671→694
RPL17Dir	5'GGTGGTTCATCTGGAGCCAAGTCC3'	18→43
RPL17Rev	5'GCGTTAGAGGCTATCCGGGGCC3'	385→407

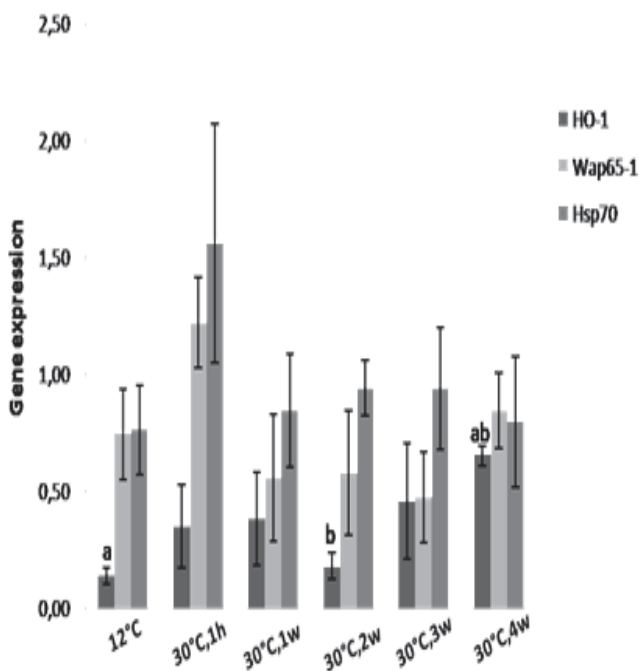
HO-1 (GenBank accession no.EF139130)

RPL17 (GenBank accession no.AF139590)

**Figure 1.** Electrophoresis result of HO-1 gene expression in sea bass liver tissue after increased water temperature exposure (MW- molecular weight, h- hour, w- week, bp- base pair, 1- first individual, 2- second individual, 3- third individual).

ment.

In intestine, HO-1 gene expression levels maintained the initial value throughout the experiment while no expression of HO-1 was observed in other tissues (heart, brain, muscle or gills) regardless of experimental conditions (data not shown).

**Figure 2.** Average levels of HO-1, wap65 and hsp70 gene expressions in sea bass liver tissue after increased water temperature exposure. Wap65 and hsp70 levels were previously determined and published (20). Relative mRNA levels of HO-1 were detected by semi-quantitative PCR. Data shown are expressed as mean \pm SEM. Different letters indicate significant statistical differences ($P < 0.05$) after a Tukey's test.

DISCUSSION

In this study, we explored HO-1 gene expression in response to a heat stress in different sea bass tissues. Our results showed that HO-1 expression differs between tissues. HO-1 was not expressed in gills, heart, muscle and brain while it was expressed at a basal level in intestine in spite of the temperature increase. In liver, spleen and kidneys, where HO-1 appeared sensitive to the temperature increase, the pattern of HO-1 expression variation was specific to each tissue. In liver, HO-1 expression increased from one hour of exposure to 30°. It followed an increasing trend throughout the duration of the experiment and reached a value 4.5-fold higher than the initial level after 4 weeks showing a clear influence of temperature on HO-1 expression.

In a previous work (20), we investigated the effects of temperature increase on the expression of two other genes involved in temperature acclimation process in liver; wap65-1 (an isoform of the "warm temperature acclimation-related 65kD protein) and hsp70 (a heat shock protein which acts as "chaperone" helping newly synthesized protein transport (17)). Our results on HO-1 expression variations after increased water temperature exposure are close to our previous findings. Indeed, all three genes of interest were expressed at 12°C even if HO-1 was expressed at a much lower level compared to wap65-1 and hsp70. Unlike HO-2 and HO-3 that are constitutively expressed, expression of HO-1 seems to be detectable only in stress conditions (17).

After one hour exposure to 30°C, a 2-2.5-fold increase for all three genes was recorded. Whereas HO-1 expression levels continued to increase even after one hour, both wap65-1 and hsp70 expressions decreased right after and

regained values close to those observed in control groups (Fig. 2).

In sea bass, wap65-1, hsp70 and HO-1 seem to be involved in a heat shock response. However wap65-1 and hsp70 responses are only involved at an early stage of experiment, while HO-1 expression increase is maintained and achieves values higher than baseline levels.

HO-1 expression level also increased in rat liver after hyperthermic treatment (42°C, 20 min) (24), but HO-1 expression pattern differs from the one found in the present study. Maximal HO-1 expression was observed as soon as one hour after heat stress to reach values 20 to 40-fold that of control groups. It then regains control group value by 6h after temperature increase treatment. In the same study, coordinated induction of HO-1 response was also demonstrated in rat kidneys and heart (24). In sea bass, we did not find similar results for these organs. Indeed, one hour after increased temperature exposure of fish, HO-1 expression in kidneys collapsed while it was not expressed at all in the heart throughout the experiment. The intensity and duration of exposure and mainly the species could explain such differences.

The contribution of HO-1 in renal cytoprotection has long been studied (21) and even if it is weakly expressed in kidneys in normal conditions, it is rapidly over expressed in renal injuries. It is clearly involved in protection against renal damages and even prevention and reversion of fibrosis (4,5,6). Only few works have focused on the pattern of HO-1 expression in response to stress in the kidneys of fish. In goldfish (*Carassius auratus*) HO-1 induction was sharply increased precisely in posterior kidney exposed to hypoxia conditions (31). Given that hyperthermia has been often suggested to induce hypoxia in central fish tissues and even to induce a collapse of the ventilatory and circulatory activities (12,22), it is interesting to compare our results to hypoxia-induced effects. It remains to be noted that in the study concerning goldfish, HO-1 was highly transcribed in posterior kidney, head kidneys, gills and in intestine and at lower level in heart, spleen and brain in non-stressed fishes. These findings are consistent with ours for the kidneys, intestine (where initial level of HO-1 was highly expressed), heart and brain (where initial level of HO-1 was lowly expressed) but interestingly differ from our data notably for the liver, spleen and gills (31). Results are also divergent concerning transcription of HO-1 after induction of stress where HO-1 was found up-regulated only in posterior kidney and gills in the goldfish, whereas in the sea bass it was down-regulated in kidneys and no expression was detected at any moment in the gills, muscle, heart and brain. Such a divergence in outcomes may be related to different molecular mechanisms involved in the reaction to each type of stress, as well as the fish species used. Therefore, further studies are needed to explore this mechanism and to understand why each organism reacts differently.

For the heart, it was proven that HO-1 was present and regulated in this organ and that it plays a key role in blood pressure regulation mediated by the carbon monoxide production.

In the heart, HO-1 was up-regulated after angiotensin administration as an adaptative response to angiotensin-induced cardiac damage. A cardioprotective role of HO-1 was also demonstrated in HO-1 knockout mice exposed to hypoxia (14 and references therein). In contrast, our data

suggest that HO-1 is not expressed in the sea bass heart in normal conditions and that a heat shock does not induce HO-1 expression.

In the brain, the absence of HO-1 before and after temperature increase results from the fact that HO-1 does not represent the major isoform of heme oxygenase in this tissue. However, HO-1 expression has been detected in rat brain following an hyperthermia treatment (9) and heat shock was identified as the only stressor that can increase HO-1 transcripts in this tissue (10). Even if HO-1 was also found abundantly expressed in the sea bass brain (23), HO-2 is still by far the prominent isoform of heme oxygenase in the brain. HO-1 role in the nervous system remains unclear (2,16) despite the HO-1 neuroprotection and immunoreactivity that have been demonstrated in nervous tissues (14 and references therein).

In the spleen, in homeostatic state, HO-1 expression levels are similar to those found in other studies on the same species (23). Among all organs, the initial HO-1 expression is the highest in the spleen because hemoglobin degradation takes place mainly in this organ requiring continuous induction of HO-1 (3,21,29). However, following induction of a heat stress, we observed a notable unexplained decrease in HO-1 expression. Contrary to our findings, HO-1 expression was significantly up-regulated in rat spleen after exposure to other different types of stress such as hemolytic agents e.g aniline, phenylhydrazine and phenacetin (26,32).

Our data confirm HO-1 involvement in a heat shock response and suggest that HO-1 may be part of an array of genes that could be used as biomarkers to heat stress in the sea bass liver. Both its rapid response to stress and the long duration of its involvement make it interesting in such studies. Studies concerning HO-1 expression in response to heat stress in entire organism remain scarce. Fish species and temperature levels used in the experiment are highly variable as well as the duration of exposure to heat stress. Further studies are required to explore mechanisms of induction of HO-1 expression involved in fish acclimation.

Acknowledgment

We acknowledge the marine farm "Tamaris Sud Fish" for their generous gifts. We are very grateful to the Conseil Régional PACA (France) and Conseil Général du Var (France) as well as Toulon Var Technologie (France) for their support. We also thank Sonia Bernage Tudal for her technical help.

REFERENCES

1. Abraham, N. G., Lavrovsky, Y., Schwartzman, M. L., Stoltz, R. A., Levere, R. D., Gerritsen, M. E., Shibahara, S. and Kappas, A., Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: Protective effect against heme and hemoglobin toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, **92**: 6798–6802.
2. Ahmad, A. S., Zhuang, H. and Doré, S., Heme oxygenase-1 protects brain from acute excitotoxicity. *Neuroscience.* 2006, **141**: 1703–1708.
3. Braggins, P. E., Trakshel, G. M., Kutty, R. K. and Maines, M. D., Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: Comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986, **141**: 528–533.
4. Correa-Costa, M., Amano, M. T. and Câmara, N. O. S., Cytoprotection behind heme oxygenase-1 in renal diseases. *W.J.N.* 2012, **1**: 4–11.
5. Costa, M. C., Semedo, P., da Silva Monteiro, A. P. F., Pereira, R. L.,

- Gonçalves, G. M., Cenedeze, M. A., Faleiros, A. C. G., Dos Reis, M. A., Pacheco-Silva, A. and Câmara, N. O. S., Cytoprotective role of heme oxygenase-1 upregulation in progressive renal disease. *Einstein*. 2009, **7**: 436-444.
6. Courtney, A. E. and Maxwell, A. P., Heme Oxygenase 1: Does It Have a Role in Renal Cytoprotection? *Am. J. Kidney Dis.* 2008, **51**: 678-690.
7. De Maio, A., The heat shock response. *New Horiz.* 1995, **3**: 198-207.
8. Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S. and Oliva-Teles, A., Rapid metabolic adaptation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles fed different carbohydrate sources after heat shock stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006, **145**: 73-81.
9. Ewing, J. F. and Maines, M. D., Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991, **88**: 5364-5368.
10. Ewing, J. F., Haber, S. N. and Maines, M. D., Normal and heat-induced patterns of expression of heme oxygenase-1 (HSP32) in rat brain: hyperthermia causes rapid induction of mRNA and protein. *J. Neurochem.* 1992, **58**: 1140-1149.
11. Hadj kacem, N., Aldrin, J. F. and Romestand, B., Immediate effects of rapid temperature increase on some blood parameters of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linne, 1758). *Aquaculture.* 1987, **64**: 325-331.
12. Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D. and Pörtner, H. O., Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. *J. Exp. Biol.* 2006, **209**: 353-363.
13. Immensshuh, S. and Ramadori, G., Gene Regulation of Heme Oxygenase-1 as Therapeutic Target. *Biochem. Pharmacol.* 2000, **60**: 1121-1128.
14. Ishizaka, N., Aizawa, T., Mori, I., Taguchi, J. I., Yazaki, Y., Nagai, R. and Ohno, M., Heme oxygenase-1 is upregulated in the rat heart in response to chronic administration of angiotensin II. *Am. J. Physiol-Heart. C.* 2000, **279**: H672-H678.
15. Jobling, M., In: *Fish Bioenergetics*. (eds.), Chapman & Hall, London, 1994, 328 p.
16. Maines, M. D. and Gibbs, P. E. M., 30 some years of heme oxygenase: From a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, **338**: 568-577.
17. Pavel Rössner, J., Binková, B. and Šrám, R. J., Heat shock proteins hsp32 and hsp70 as biomarkers of an early response? In vitro induction of heat shock proteins after exposure of cell culture to carcinogenic compounds and their real mixtures. *Mutat. Res.* 2003, **542**: 105-116.
18. Person-Le Ruyet, J., Mahe, K., Le Bayon, N. and Le Delliou, H., Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture.* 2004, **237**: 269-280.
19. Pierre, S., Coupé, S., Prévot-D'Alvise, N., Gaillard, S., Richard, S., Gouze, E., Aubert, J. and Grillasca, J. P., Cloning of Wap65 in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*) and expression in sea bass tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 2010, **155**: 396-402.
20. Pierre, S., Tarnowska, K., Hachfi, L., Coupé, S., Simide, R., Couvray, S., Garnier, C., Grimaldi, M., Richard, S., Gaillard, S., Prévot-D'Alvise, N., and Grillasca, J. P., Effects of water temperature increase and heavy metals contamination on Wap65 gene expression in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Cell. Mol. Biol.* 2011, **57**: 1614-1622.
21. Pimstone, N. R., Engel, P., Tenhunen, R., Seitz, P. T., Marver, H. S. and Schmid, R., Inducible heme oxygenase in the kidney: a model for the homeostatic control of hemoglobin catabolism. *J. Clin. Invest.* 1971, **50**: 2042-2050.
22. Pörtner, H. O., Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol.* 2002, **132**: 739-761.
23. Prévot-D'Alvise, N., Pierre, S., Gaillard, S., Gouze, E., Gouze, J. E., Aubert, J., Richard, S. and Grillasca, J. P., cDNA sequencing and expression analysis of *Dicentrarchus labrax* heme oxygenase-1. *Cell. Mol. Biol.* 2008, **54**: 46-54.
24. Raju, V. S. and Maines, M. D., Coordinated expression and mechanism of induction of HSP32 (heme oxygenase-1) mRNA by hyperthermia in rat organs. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 2002, **1217**: 273-280.
25. Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. 2011, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2011, accessed on March 2011.
26. Rokushima, M., Omi, K., Imura, K., Arari, A., Furukawa, N., Itoh, F., Miyazaki, M., Yamamoto, J., Rokudhima, M., Okada, M., Torii, M., Kato, I. and Ishizaki, J., Toxicogenomics of drug-induced hemolytic anemia by analyzing gene expression profiles in the spleen. *Toxicol. Sci.* 2007, **100**: 290-302.
27. Rombough, P. J., The effects of temperature on embryonic and larval development. In: *Society for Experimental Biology Seminar Series 61: Global Warming Implications for Freshwater and Marine Fish.*, Wood, C.M. and McDonald, D.G. (eds.), Cambridge University Press, 1996, 177-223.
28. Ryter, S. and Tyrrell, R. M., The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* 2000, **28**: 289-309.
29. Ryter, S. W., Alam, J. and Choi, A. M. K., Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol. Rev.* 2006, **86**: 583-650.
30. Van der Kraak, G. and Pankhurst, N. W., Temperature effects on the reproductive performance of fish. In: *Society for Experimental Biology Seminar Series 61: Global Warming Implications for Freshwater and Marine Fish*, Wood, C.M. and McDonald, D.G. (eds.), Cambridge University Press, 1996, 159-176.
31. Wang, D., Zhong, X. P., Qiao, Z. X. and Gui, J. F., Inductive transcription and protective role of fish heme oxygenase-1 under hypoxic stress. *J. Exp. Biol.* 2008, **211**: 2700-2706.
32. Wang, J., Ma, H., Boor, P. J., Ramanujam, V. M. S., Ansari, G. A. S. and Khan, M. F., Up-regulation of oxygenase-1 in rat spleen after aniline exposure. *Free Radic. Biol. Med.* 2010, **48**: 513-518.
33. Watabe, S., Kikuchi, K. and Aida, K., Cold and warm-temperature acclimation induces specific cytosolic protein in goldfish and carp. *Nippon. Suisan. Gakk.* 1993, **59**: 151-156.
34. Wheeler, D. S. and Wong, H. R., Heat shock response and acute lung injury. *Free Radic. Biol. Med.* 2007, **42**: 1-14.



In situ spine sampling and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) PCR methods proved relevant for molecular studies on the sea urchin *Paracentrotus lividus*

Stéphane Coupé^{a,*}, Sylvain Couvray^{a,b}, Katarzyna Tarnowska^a, Rémy Simide^a, Lamia Hachfi^a,
Stéphanie Pierre^a, Sandrine Gaillard^a, Simone Richard^a, Nathalie Prévot d'Alvise^a, Elvire Gouze^c,
Yvan Martin^b, Jean-Luc Bonnefont^b, Nardo Vicente^b, Joel-P Grillasca^a

^a Laboratoire PROTEE, Equipe de Biologie Moléculaire Marine, Université du Sud Toulon-Var, Avenue de l'Université, BP 20132, 83957 La Garde Cedex, France

^b Institut Océanographique Paul Ricard, Ile des Embiez – Le Bruscat, 83 140 Six Fours Les Plages, France

^c Inserm U895, Centre méditerranéen de médecine moléculaire, Bâtiment Universitaire ARCHIMED, 151 route saint Antoine de ginestiere, BP 23194, 06204 Nice cedex 3, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 May 2011

Received in revised form 19 September 2011

Accepted 19 September 2011

Available online 10 October 2011

Keywords:

In situ

Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

Paracentrotus lividus

Tissue sampling

Sea urchin

ABSTRACT

In France, there are raising concerns about the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*, whose populations decline. In this context, molecular analyses contribute to the better understanding of processes that shape populations, which is required to adapt management and conservation programmes. The present study aimed at developing an *in situ* non-destructive spine sampling method and an ISSR-PCR approach, both dedicated to the genetic analysis of individuals and populations. Forty-five individuals of 3 close populations were studied. *In situ* spine sampling proved relevant, leading to the clear genotyping of all purified DNAs without any contamination. Molecular analysis revealed high genetic diversity with a large proportion of low-frequency ISSR markers. Six ISSR primers produced 154 scorable polymorphic markers of which 118 (77%) were present at a frequency lower than 25%. Based on genotyping profiles obtained with 3 ISSR primers, significant genetic differentiation between the studied populations was detected. Taken together, these results revealed that both *in situ* spine sampling and ISSR method are relevant for molecular analyses and that they will likely find their application in future conservation and management programmes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In the south of France, the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* has experienced a huge population decline. Deciphering processes (e.g. natural and anthropogenic) that shape populations are needed to adapt conservation and management strategies (Guidetti et al., 2005). This implies long-term genetic monitoring of populations, requiring the analysis of numerous genetic markers on a critical number of individuals. This would be labour intensive and expensive. There is thus a need to develop both easy tissue sampling strategies adapted to endangered marine animals and new PCR approaches that generate high numbers of polymorphic genetic markers at affordable costs.

Molecular genetics has now been widely used to address ecological and conservation issues, thanks to the tremendous diversity of analysis one can perform on only few picograms of DNA (e.g. hairs or faeces). This has led to the development of *in situ* non-invasive and non-destructive sampling procedures for conservation monitoring, allowing biologists to collect critical data on wildlife populations

without capturing or sacrificing animals. This is of major importance when dealing with small, scarce and endangered populations (Kumar et al., 2007; Lawrence et al., 2008; Le Vin et al., 2011; Zhan et al., 2008). Indeed, while non invasive sampling (i.e. hair, saliva, mucus) does not alter animal integrity and life, this method presents serious limitations due to low amount and quality of DNA recovered, and presence of potential PCR inhibitors. Such limitations might result in the absence of amplification or in incorrect genotyping (i.e. allelic drop out). This can lead to serious misinterpretations in conservation studies, in particular when they concern species with low levels of heterozygosity (Taberlet et al., 1999; Zhan et al., 2008), such as sea urchins (Calderón et al., 2008, 2009). On the contrary, non-destructive methods (i.e. blood sample, biopsy) are invasive but result in higher amounts of recovered DNA (Berg et al., 1995).

Because some tissues can regenerate in echinoderms, the non-destructive method is likely to be the most appropriate for this species (Hamm and Burton, 2000; Waters and Roy, 2003, unpublished personal data). In *P. lividus* sea urchins, spines contain muscle cells. These cells are covered by epidermic tissue over the half basal length (Ebert, 1967; Heatfield and Travis, 1975; Märkel and Röser, 1983) and are easily accessible. Therefore, urchin spine appears a good target tissue for DNA collection, even though it may face non-invasive sample limitations, especially when considering young urchins with small

* Corresponding author. Tel.: +33 494 142 670; fax: +33 494 142 961.
E-mail address: stephane.coupe@univ-tln.fr (S. Coupé).

spines. Moreover, samples collected underwater may potentially be contaminated by cross-reactive organisms or inhibitors. Because urchin individuals should be replaced at their initial sites after spine sampling, *in situ* sampling appears to be a more convenient method. To our knowledge, this method has never been assessed in this species.

Molecular genetic analysis dedicated to wildlife monitoring and conservation issues requires a large set of reliable, highly informative and cost-effective genetic markers (Hagerty et al., 2008; Paetkau et al., 1995; Sanchez-Fernandez et al., 2008; Varela et al., 2007). Among those are dominant Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. ISSR consists in nucleotide sequences flanked by two microsatellite priming sites, inversely oriented on opposite DNA strands, and near enough to be effectively amplified by PCR. Interests of ISSR techniques rely on high polymorphism and wide distribution of microsatellites along genomes, which enables to detect low differentiation levels. ISSR PCR analysis has proven to be efficient in gene flow evaluation, fine-scale genetic structure analysis, and parentage determination (Haig et al., 2003; Su et al., 2008; Wolfe and Liston, 1998; Zong et al., 2008). This type of approach is also reproducible, easy to perform and cost effective. Although ISSR has intensively been used to evaluate genetic structure variations in terrestrial ecosystems, its applications to marine population have been reported scarcely (Casu et al., 2005, 2009; Varela et al., 2007) and to date, have never been used in molecular studies on sea urchin.

The objectives of this study were to develop ISSR-PCR and to assess the relevance of an *in situ* (underwater) spine sampling method, both dedicated to molecular studies that would find applications in conservation and management programmes.

2. Methods

2.1. Specimens and sampling procedure

Fifteen individuals were randomly collected during the legal harvesting period (mid-October to mid-April), by snorkelling between the surface and 5 m depth at three close areas (Rayolet, Sicié, Baux Rouges) of the French-east Mediterranean coast (Fig. 1). Divers wore wet suits and gloves. Two age classes of *P. lividus* were considered based on their size: juveniles (less than 1 year old) and adults,

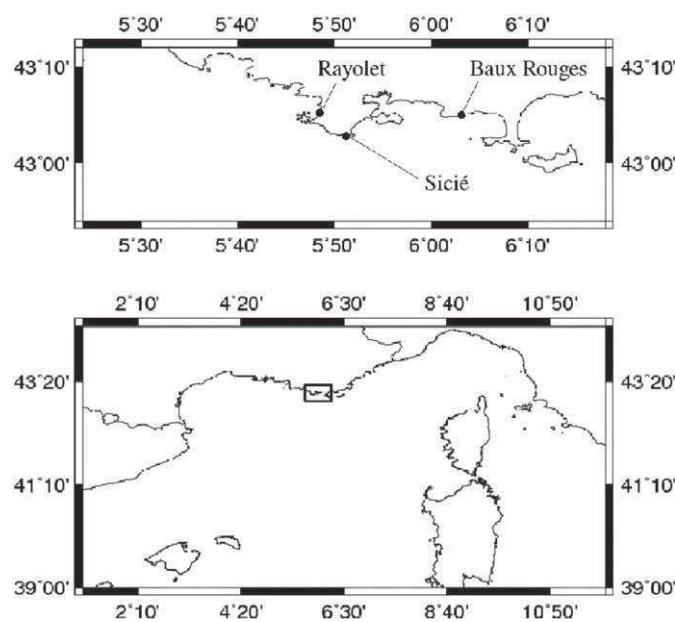


Fig. 1. Localization of the studied populations. Top: location of the studied sites. Bottom: overall location of the studied area (frame).

whose test diameters were inferior to 2 cm and superior to 4 cm, respectively (Calderón et al., 2009).

Practically, urchins were hand captured and up to 4 spines were collected at the surface with a clean flat-end clamp and put into a referenced 1.5 ml eppendorf tube with approximately 1 ml of sea water. Following spine collection, the whole urchin was put into a waterproof box with the same reference number as the spine sample. Urchins were sacrificed and a piece of skin around the mouth was collected for tissue DNA extraction. Samples were kept in tubes for the sampling campaign duration (approx. 2 h) after which spines were placed in absolute ethanol and kept at -20°C until DNA extraction.

In order to assess the potential effect of sea water on urchin genotyping profiles, 15 ml of sea water was collected at the surface, from which 1 ml was centrifuged for 10 min at 5000 g. Then supernatants were discarded and pellets kept at -20°C until DNA extraction.

For convenience, spine and skin tissue samples surrounding the mouth will be referred to as “spine” (S) and “tissue” (T), respectively.

To evaluate the efficiency and reliability of the sampling methodology, DNAs purified from spine and tissue for each urchin were genotyped using the ISSR-PCR method described below. Genotyping profiles were then compared to evidence potential contaminations and differences in intensities of amplified bands.

2.2. DNA extraction and ISSR-PCR

DNAs were purified using DNeasy Blood and Tissue kit following the “animal tissue protocol” (Qiagen), eluted in a 200 μl elution buffer and quantified using a spectrophotometer at 260 nm (Eppendorf, Biophotometer Plus).

A set of 6 primers was used (Table 1). They were designed by 16 to 23 nucleotides, with a GC content between 31 and 50%. Optimal annealing temperatures, primer concentrations, magnesium and DNA amounts were assessed. Retained conditions yielded clear and reproducible genotyping profiles.

The reaction mixture consisted in (final concentration): 5 PRIME HotMaster Taq Buffer (1X containing 2.5 mM MgCl_2), 5 PRIME HotMaster Taq polymerase (0.6 U) (Dutscher, France), dNTP (200 μM each), primer (2.4 μM), 20 ng of DNA and molecular grade water to 15 μL . PCRs were performed in a Mastercycler thermocycler (Eppendorf, France) and conditions were as follows: initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min annealing at 50°C for 50 s, 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 15 min. PCR controls (*i.e.* negative and sea water) and replicates were included in each PCR amplification to ensure result repeatability and exclude potential PCR contaminations. PCR products (8 μL) were analysed by electrophoresis using a 1.5% agarose gel in a 10 mM borate buffer. Gels were run at 110 V for about 2 h and 30 min and stained by soaking in 1 $\mu\text{l}/10\text{ ml}$ ethidium bromide solution for 10 min. ISSR genotyping profiles were visualised under UV light and

Table 1
Characteristics of the ISSR primers.

Primers	Sequence (5'-3')	Size range of bands (bp)	Number of bands	Mean number of bands/ind.	Proportion of polymorphic bands (%)		
					Rayolet	Sicié	Baux Rouges
eb6	(CT) ₉ G	310–1250	20	3.9	47.6	76.2	81
eb2m5	(CAGT) ₄ DC	250–1100	16	1.9	22.2	66.7	44.4
G2	(CTT) ₇ AC	300–1500	21	1.5	36.4	68.2	10
G9	(ACA) ₅ G	160–1800	37	5.5	50	89.5	55.3
G8	(AAC) ₅ T	200–3000	41	6	44.2	83.7	72.1
G17	(CTG) ₄ RT	350–1900	19	6.2	36.8	78.9	94.7
Total			154		43.5	83.1	68.2

recorded by digital photography. Band sizing was performed using 100 bp and 1 kb ladders as references (see figure legends).

2.3. ISSR analysis

Clear (even faint) and reproducible bands were considered. Smear bands were eliminated from analysis. Amplified ISSR fragments were scored for presence (1) or absence (0) of bands (Haig et al., 2003; Wolfe and Liston, 1998), and converted into allele frequencies. Each band was considered polymorphic if the relevant band was present in one or more, but not all, individuals.

Analysis was performed under the assumption of Hardy–Weinberg equilibrium by means of AFLP-Surv v1.0. (Vekmans, 2002) using Bayesian methods for diploid outcrossing species with non-uniform *a priori* distribution of allele frequencies (Zivotovsky, 1999). This software was used to calculate expected heterozygosity (HE), mean gene diversity within population (HS), total gene diversity (HT) and genetic differentiation among populations (FST). In order to test the significance of FST values at 1%, we performed 1000 permutations. Frequencies of each locus among populations were also determined using the aforementioned software.

3. Results

3.1. ISSR data analysis

Six ISSR-PCR amplifications generated a total of 154 reliable fragments which were all polymorphic, although possibly frequent (Fig. 2). The size of these fragments ranged between 160 and 3000 bp. The average number of bands per individual generated by each primer ranged from 1.5 to 6.2 with an average of 4.2 bands per individual. Analysis of the proportion of polymorphic bands revealed a clear difference between the three tested populations (Table 1). The population of Sicié presented a homogeneous, high level polymorphism with an average of 72.2% and a coefficient of variation (CV) of 11.4%. By contrast, the populations of Rayolet and Baux Rouges presented a lower polymorphism level with an average of 39.5% (CV = 25.6%) and 59.6% (CV = 50.7%) respectively.

The distribution of the average proportion of polymorphic bands highlighted that 77% of the bands were found in less than 25% of the individuals among the three populations, with an average of 35% of the bands present at a frequency lower than 10% (Table 2). Moreover, 33.1% of the total bands were specific to one or more individuals within a population while 37% of the bands were absent in one population but present in the two others.

Table 2

Distribution of the proportion of polymorphic bands in n % of the whole population.

Primers	Proportion of bands found in less than n % on the whole population					
	n = 10	n = 25	n = 50	n = 75	n = 90	n = 100
eb6	25	55	80	100		
eb2m5	50	87.5	87.5	100		
G2	67	95.5	100			
G9	33	87	95	97.5	100	
G8	27.5	82	97.5	97.5	100	
G17	16	42.5	74	84.5	89.5	100
All	35.2	77.4	91	96.8	98.7	100

Analysis of genetic differentiation between populations for each single primer yielded consistent FST values for all but eb2m5 primers, ranging from 0.011 to 0.104 ($p < 0.05$). Genetic differentiation was assessed using several primer combinations in order to take into account a high number of bands. The pool of data obtained with the primers eb6 (FST = 0.104), G17 (FST = 0.043) and G8 (FST = 0.03) gave the highest consistent overall FST value of 0.063. Analysis of pairwise genetic differentiation highlighted that the population of Rayolet was low-to-moderately differentiated from the two other populations, but the populations of Sicié and Baux Rouges were rather poorly differentiated (Table 3). Expected heterozygosities were similar for the populations of Sicié and Baux Rouges, and represented twice that found for the population of Rayolet (Table 3).

3.2. Efficiency and reliability assessment of the *in situ* spine sampling methodology

The total amount of DNA purified from spines was very similar among individuals in the same group and averaged 12 µg and 1 µg in adults and juveniles, respectively. The amount of DNA purified from tissue was always more than 50 µg and was dependent on the mass of sampled tissue. Dilutions of DNA purified from urchin samples did not improve PCR efficiencies, confirming the absence of inhibitors. PCRs performed on pure and diluted DNAs purified from sea water samples were all negative, except when a positive control DNA was added to the reaction mixture that yielded to the expected genotyping profiles (*data not shown*). Long-sized bands generated by ISSR-PCR confirmed that DNA was likely not degraded (Fig. 2). Genotyping profiles obtained with DNA purified from either spines or skin tissues were identical in number, size and relative intensities of the bands. Also, intense and individual-specific ISSR bands confirmed the absence of cross-contamination between samples (Fig. 3).

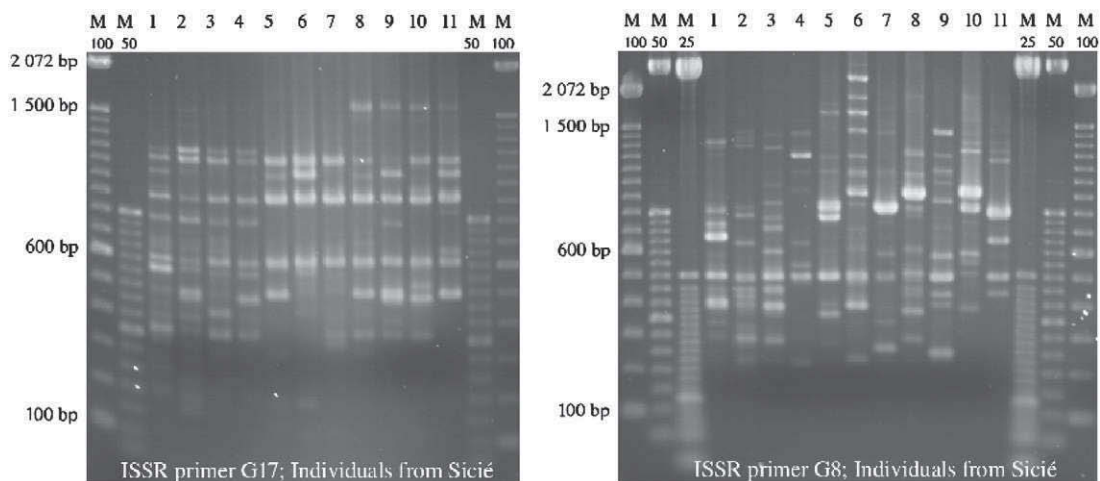


Fig. 2. Example of ISSR genotyping profiles. M100, M50 and M25: respectively 100 bp, 50 bp and 25 bp Molecular Weight DNA Ladder (Invitrogen).

Table 3
Parameters of genetic variability (ISSR primers eb6, G17, G8).

Population	H _E	H _S	H _T	F _{ST} [*]	Pairwise F _{ST} between populations [*]		
Rayolet	0.109				0.000		
Sicié	0.223				0.073	0.000	
Baux Rouges	0.219				0.101	0.032	0.000
All		0.184	0.196	0.063			

* p < 0.0001.

4. Discussion

The first striking result of the present work is that ISSR genotyping profiles were very different from one individual to another, suggesting high genome plasticity. We observed a high genetic diversity with a large proportion of low-frequency ISSR markers. This result was consistent with previous molecular studies performed on *P. lividus* by Duran et al. (2004), Calderón et al. (2008), and more recently by Maltagliati et al. (2010). Based on their study of different markers (*i.e.* mitochondrial cytochrome c oxidase, 16rRNA gene, adenine nucleotide transporter, nuclear microsatellite and mitochondrial cytochrome b) these authors could not show clear genetic structure of close populations, but demonstrated that *P. lividus* better fit the isolation by distance model (Calderón et al., 2009; Palumbi, 2003). By contrast, Rizzo et al. (2009) reported the use of RAPD, which is similar in principle to ISSR, to distinguish between two relatively close populations of stressed and non-stressed *P. lividus*. While the present study focused on limited data, we have been able to demonstrate moderate yet significant genetic differentiation between three close populations (approximately 20 km between Rayolet and Baux Rouges). The use of several ISSR primers allowed for screening large fractions of the genome with both coding and non-coding regions likely to be amplified. Some specific markers of a population may reflect a particular adaptation to local environments or a local “specificity”. In our study, current, pollution, or physical parameters may explain differences found between the population of Rayolet and the two other populations (Hereu et al., 2004; Pedrotti, 1993). These should be investigated in future dedicated studies. Noteworthy, the population of Rayolet appears to be physically isolated from the populations of Sicié and Baux Rouges, which could explain the moderate pairwise F_{ST} values between Rayolet and either Baux Rouges or Sicié. It is likely that the pool of larvae brought by the east-to-west main Mediterranean circulating current (Ligure) does not easily reach the population of Rayolet, all the more that this site is exposed to the strong north wind Mistral (Hereu et al., 2004; Pedrotti, 1993). In turn self-recruitment also may account for the observed differences.

More evident genetic differentiation between populations is likely possible assuming that it depends on the appropriate choice of ISSR markers to consider (Casu et al., 2009). To this aim, ISSR seems a

well-adapted approach, because it likely generates high number of polymorphic data, thus putative population specific markers. Further studies based on additional ISSR markers will likely lead to a more precise understanding of the population structure (from wide to local scales).

From a practical point of view, ISSR is cost-effective and requires neither prior knowledge about the genome sequence, nor any *a priori* concerning the relevance of the genome region studied. Moreover, we have shown that ISSR generate many low-frequency markers, thus it is also a suitable tool for parentage analysis or selective programmes.

Besides ISSR analysis, we proved the relevance of a new *in situ* sea urchin spine sampling dedicated to genetic analysis. This method has never been described before and presents several advantages. First, our results indicate that there is no need to harvest urchins, that should remain alive at their initial sites (Ebert, 1967; Heatfield and Travis, 1975; Märkel and Röser, 1983). Noteworthy, the technique is reliable even for small-size juvenile urchins which are likely less than 1 year old (Calderón et al., 2009). This approach is even more interesting for adult sampling for which the test size cannot be consistently correlated to the age when considering inter-annual cohorts that may present higher genetic differentiation due to pre- and/or post-larval selection (Debenham et al., 2000). Finally, yearly sampling of juveniles is an interesting mean to increase the number of genotyped individuals of a population – they will become progenitors that are already genotypes, which can also help to reduce efforts and costs over time.

Potential environmental contamination might result in a misinterpretation of genotyping profiles with important consequences on conservation and management issues. In order to prevent such bias, water sample should always be included in the experiments.

At last, both the *in situ* spine sampling and the ISSR method have proved relevant for molecular studies on the sea urchin *P. lividus* species, especially considering endangered populations, and should find applications in management and conservation programmes. Ongoing research performed on a large number of individuals and populations, using additional ISSR molecular markers, will likely contribute to a better characterization of the genetic structure of *P. lividus* populations and to the understanding of processes that shape urchin populations in the French east Mediterranean coast.

Acknowledgements

Part of this work has been financially supported by the Institut Océanographique Paul Ricard, the Conseil Régional Provence-Alpes-Côte-d’Azur, the Conseil Général du Var (CG83) and Toulon Provence Méditerranée (TPM). We also thank Toulon Var Technologies (TVT) and the Pole Mer PACA for their support. [SS]

References

- Berg, D.J., Haag, W.R., Guttman, S.I., Sickel, J.B., 1995. Mantle biopsy: a technique for nondestructive tissue-sampling of freshwater mussels. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 14, 577–581.
- Calderón, I., Giribet, G., Turon, X., 2008. Two markers and one history: phylogeography of the edible common sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Lusitanian region. *Mar. Biol.* 154, 137–151.
- Calderón, I., Palacín, C., Turon, X., 2009. Microsatellite markers reveal shallow genetic differentiation between cohorts of the common sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) in northwest Mediterranean. *Mol. Ecol.* 14, 3036–3049.
- Casu, M., Maltagliati, F., Cossu, P., Lai, T., Galletti, M.C., Castelli, A., Commito, J.A., 2005. Fine-grained spatial genetic structure in the bivalve *Gemma gemma* from Maine and Virginia (USA), as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 46–54.
- Casu, M., Tiziana, L., Curini-Galletti, M., Ruiu, A., Pais, A., 2009. Identification of Mediterranean *Diplodus* spp. and *Dentex dentex* (Sparidae) by means of DNA Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 368, 147–152.
- Debenham, P., Brzezinski, M., Foltz, K., Gaines, S., 2000. Genetic structure of populations of the red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 253, 49–62.

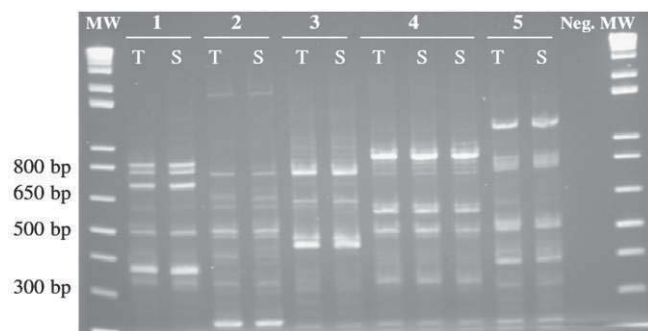


Fig. 3. Example of genotyping profiles of 5 individuals obtained from spine or tissue DNA. Profiles were obtained with the primer G9. T: skin tissue; S: spine; MW: 1 kb + Molecular Weight Ladder (Invitrogen). Individuals 1 to 5 from Sicié.

- Duran, S., Palacín, C., Becerro, M.A., Turon, X., Giribet, G., 2004. Genetic diversity and population structure of the commercially harvested sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Mol. Ecol.* 13, 3317–3328.
- Ebert, T.A., 1967. Growth and repair of spines in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* (Stimpson). *Biol. Bull.* 133, 141–149.
- Guidetti, P., Bussotti, S., Boero, F., 2005. Evaluating the effects of protection on fish predators and sea urchins in shallow artificial rocky habitats: a case study in the northern Adriatic Sea. *Mar. Environ. Res.* 59, 333–348.
- Hagerty, B.E., Peacock, M.M., Kirchoff, V.S., Tracy, C.R., 2008. Polymorphic microsatellite markers for the Mojave desert tortoise, *Gopherus agassizii*. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 1149–1151.
- Haig, S.M., Mace, T.R., Mullins, T.D., 2003. Parentage and relatedness in polyandrous comb-crested jacanas using ISSRs. *J. Hered.* 94, 302–309.
- Hamm, D.E., Burton, R.S., 2000. Population genetics of black abalone *Haliotis cracherodii* along the central California coast. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 254, 235–247.
- Heatfield, B.M., Travis, D.F., 1975. Ultrastructural studies of regenerating spines of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. II. Cell types with spherules. *J. Morphol.* 145, 51–71.
- Hereu, B., Zabala, M., Linares, C., Sala, E., 2004. Temporal and spatial variability in settlement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the NW Mediterranean. *Mar. Biol.* 144, 1011–1018.
- Kumar, R., Singh, P.J., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S.K., Lakra, W.S., 2007. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Indian J. Exp. Biol.* 45, 992–997.
- Lawrence, H.A., Taylor, G.A., Crockett, D.E., Millar, C.D., Lambert, D.M., 2008. New genetic approach to detecting individuals of rare and endangered species. *Conserv. Biol.* 5, 1267–1276.
- Le Vin, A.L., Adam, A., Tedder, A., Arnold, K.E., Mable, B.K., 2011. Validation of swabs as a non-destructive and relatively non-invasive DNA sampling method in fish. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 107–109.
- Maltagliati, F., Di Giuseppe, G., Barbieri, M., Castelli, A., Dini, F., 2010. Phylogeography and genetic structure of the edible sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) inferred from the mitochondrial cytochrome b gene. *Biol. J. Linn. Soc.* 100, 910–923.
- Märkel, K., Röser, U., 1983. The spine tissues in the echinoid *Euclidaris tribuloides*. *Zoomorphology* 103, 25–41.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C., 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4, 347–354.
- Palumbi, S.R., 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13, S146–S158.
- Pedrotti, M.L., 1993. Spatial and temporal distribution and recruitment of echinoderm larvae in the Ligurian Sea. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 73, 513–530.
- Rizzo, C., Cammarata, M., Di Carlo, M., Pancucci, A., Parrinello, N., 2009. RAPD profiles distinguish *Paracentrotus lividus* populations living in a stressing environment (Amvrakikos Gulf, Greece). *Russ. J. Genet.* 45, 499–503.
- Sanchez-Fernandez, B., Soriguer, R., Rico, C., 2008. Cross-species tests of 45 microsatellite loci isolated from different species of ungulates in the Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) to generate a multiplex panel. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 1378–1381.
- Su, H., Wang, L., Liu, L., Chi, X., Zhang, Y., 2008. Use of inter-simple sequence repeat markers to develop strain-specific SCAR markers for *Flammulina velutipes*. *J. Appl. Genet.* 49, 233–235.
- Taberlet, P., Waits, L.P., Luikart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 14, 323–327.
- Varela, M.A., Gonzalez-Tizon, A., Marinas, L., Martinez-Lage, A., 2007. Genetic divergence detected by ISSR markers and characterization of microsatellite regions in *Mytilus mussels*. *Biochem. Genet.* 45, 565–578.
- Vekmans, X., 2002. AFLP-Surv. Available at <http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>.
- Waters, J.M., Roy, M.S., 2003. Marine biogeography of southern Australia: phylogeographical structure in a temperate sea-star. *J. Biogeogr.* 30, 1787–1796.
- Wolfe, A.D., Liston, A., 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. In: Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J. (Eds.), *Plant Molecular Systematics II*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 43–86.
- Zhan, A., Bao, Z., Hu, X., Lu, W., Wang, S., Peng, W., Wang, M., Hui, M., Hu, J., 2008. Accurate methods of DNA extraction and PCR-based genotyping for single scallop embryos/larvae long preserved in ethanol. *Mol. Ecol. Resour.* 8, 790–795.
- Zhivotovsky, L.A., 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Mol. Ecol.* 8, 907–913.
- Zong, M., Liu, H.L., Qiu, Y.X., Yang, S.Z., Zhao, M.S., Fu, C.X., 2008. Genetic diversity and geographic differentiation in the threatened species *Dysosma pleiantha* in China as revealed by ISSR analysis. *Biochem. Genet.* 46, 180–196.

Lamia HACHFI

Université de Toulon

Équipe de Biologie Moléculaire Marine EB2M - PROTEE, Université De
Toulon, BP 20132, Avenue de l'Université, 83957 La Garde Cedex,
France

**Effets de stress physico-chimique sur l'expression de gènes
impliqués dans l'homéostasie et la fonction de l'axe
hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique chez le loup
(*Dicentrarchus labrax* L.)**

Résumé en français

Les écosystèmes marins constituent une cible majeure des changements globaux qui affectent de façon pérenne notre planète.

Nous nous sommes intéressés à deux de ces changements susceptibles de menacer le milieu marin : le réchauffement climatique par le biais de l'étude de l'effet du stress thermique sur l'expression de *ho-1* et la pollution via l'étude de l'impact des métaux lourds à effets perturbateurs endocriniens (le cadmium et le plomb) sur l'axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique (HHGH) chez le loup (*Dicentrarchus labrax* L.).

Nos résultats montrent une réponse importante de *ho-1* aux stress thermique et chimique dans le foie. Nous avons également démontré une forte accumulation hépatique du Cd, et à un degré moindre du Pb, accompagnée d'une sur-expression du gène *mt* codant pour les métallothionéines. Des variations dans l'expression de gènes clés le long de l'axe HHGH (*arom b*, *fsh β* , *arom a...*) ont été observées après intoxication par les deux métaux sans pour autant induire des effets physiologiques observables.

La question se pose de savoir si la synergie des stress physico-chimiques impacte la dynamique et l'état sanitaire des populations marines.

Mot clés : Perturbateurs endocriniens ; axe hypothalamo-hypophyso-gonado-hépatique ; cadmium ; plomb ; stress thermique ; expression des gènes ; *Dicentrarchus labrax* L.

**Effects of physicochemical stress on the expression of genes involved in the
homeostasis and the hypothalamic-pituitary-gonadal-liver axis function in the sea
bass (*Dicentrarchus labrax* L.)**

Résumé en anglais

Marine ecosystems are a major target of global changes that continuously affect our planet.

In the present study we investigated two of these changes that may threaten the marine environment: global warming, through the study of the effect of heat stress on *ho-1* expression and marine pollution through the study of the impact of heavy metals acting as endocrine disruptors (cadmium and lead) on the hypothalamic-pituitary-gonadal-liver (HHGL) axis in the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.).

Our results show an important response of *ho-1* to both thermal and chemical stress in the liver. We also demonstrated a high hepatic accumulation of Cd, and to a lesser extent of Pb. This accumulation was correlated with an overexpression of *mt* gene coding for metallothionein. Changes in the expression of candidate genes (*arom b*, *fsh β* , *arom a...*) along the HHGL axis were observed after metal intoxication but no physiological effects were observed.

The question then arises to what extent the synergy of physicochemical stress impacts the dynamics and the welfare of marine species.

Keywords : Endocrine disrupting chemicals ; hypothalamic-pituitary-gonadal-liver axis ; cadmium ; lead ; heat stress ; gene expression ; *Dicentrarchus labrax* L.