



**HAL**  
open science

# Développement de la mesure de la vitellogénine chez les invertébrés & utilisation de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez le crustacé amphipode *gammarus fossarum*

Guillaume Jubeaux

► **To cite this version:**

Guillaume Jubeaux. Développement de la mesure de la vitellogénine chez les invertébrés & utilisation de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez le crustacé amphipode *gammarus fossarum*. Ecotoxicologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT : 2012LYO10111 . tel-01141642

**HAL Id: tel-01141642**

**<https://theses.hal.science/tel-01141642v1>**

Submitted on 13 Apr 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.

## THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

N° Ordre

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD DE LYON 1

ECOLE DOCTORALE : Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

**DIPLOME DE DOCTORAT**

(Arrêté du 7 Août 2006)

Soutenue publiquement le 3 Juillet 2012 par :

**Guillaume JUBEAUX**

---

**DEVELOPPEMENT DE LA MESURE DE LA VITELLOGENINE CHEZ LES**  
**INVERTEBRES & UTILISATION DE MARQUEURS DE LA PERTURBATION**  
**ENDOCRINIENNE CHEZ LE CRUSTACE AMPHIPODE *GAMMARUS FOSSARUM***

---

COMPOSITION DU JURY

Guy CHARMANTIER, PR, Université de Montpellier .....rapporteur  
Christophe MINIER, PR, Université du Havre..... rapporteur  
Nathalie MONDY, MDC-HdR, Université de Lyon ..... examinateur  
Jean PRYGIEL, PR, Université de Lille ..... examinateur  
Jeanne GARRIC, DR, IRSTEA de Lyon..... directrice de thèse  
Arnaud SALVADOR, PR, Université de Lyon ..... co-directeur de thèse  
Olivier GEFFARD, CR, IRSTEA de Lyon..... co-directeur de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration  
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire  
Vice-président du Conseil Scientifique  
Secrétaire Général

## **M. A. Bonmartin**

M. le Professeur G. Annat  
M. le Professeur D. Simon  
M. le Professeur J-F. Mornex  
M. G. Gay

## **COMPOSANTES SANTE**

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard  
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux  
UFR d'Odontologie  
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques  
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation  
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne  
Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly  
Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois  
Directeur : M. le Professeur F. Locher  
Directeur : M. le Professeur Y. Matillon  
Directeur : M. le Professeur P. Farge

## **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies  
Département Biologie  
Département Chimie Biochimie  
Département GEP  
Département Informatique  
Département Mathématiques  
Département Mécanique  
Département Physique  
Département Sciences de la Terre  
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives  
Observatoire de Lyon  
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1  
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique  
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1  
Institut de Science Financière et d'Assurances  
Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi  
Directeur : M. le Professeur F. Fleury  
Directeur : Mme le Professeur H. Parrot  
Directeur : M. N. Siauve  
Directeur : M. le Professeur S. Akkouche  
Directeur : M. le Professeur A. Goldman  
Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid  
Directeur : Mme S. Fleck  
Directeur : Mme le Professeur I. Daniel  
Directeur : M. C. Collignon  
Directeur : M. B. Guiderdoni  
Directeur : M. P. Fournier  
Directeur : M. G. Pignault  
Directeur : M. le Professeur C. Coulet  
Directeur : M. le Professeur J-C. Augros  
Directeur : M. R. Bernard



*A mon grand père ...*



## Remerciements

Je tiens à remercier mes encadrants de thèse : Jeanne Garric (directrice de thèse et du laboratoire d'écotoxicologie à l'Irstea de Lyon), Arnaud Salvador (professeur des universités au laboratoire de sciences analytiques de l'Université de Lyon) et Olivier Geffard (chargé de recherche au laboratoire d'écotoxicologie de l'Irstea de Lyon).

Jeanne Garric, merci de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire. Ces années passées au sein de l'équipe « écotox » ont été très enrichissantes, professionnellement et humainement.

Arnaud, merci de m'avoir accueilli dans ton laboratoire et de m'avoir permis d'en apprendre tant sur la spectrométrie de masse, notamment que c'est du matériel hautement inflammable!

Olivier, que dire ? Un simple merci ne suffirait pas tant tu m'as apporté ! Je ne saurais trouver les mots justes pour exprimer la gratitude et l'estime que j'ai à ton égard. Je te remercie tout simplement d'être l'encadrant que tu as été (« au dessus c'est l soleil ! ») ; j'en prends d'autant plus la mesure en cette fin de thèse. Je retiendrai de toi cette capacité à positiver plutôt qu'à se laisser abattre, et à ce titre merci d'avoir su me re-motiver dans les moments difficiles. Je suis fier d'avoir pu travailler sur ce projet à tes côtés et j'espère pouvoir continuer à l'avenir...

Juste après, je tiens tout particulièrement à remercier Arnaud Chaumot (chargé de recherche au laboratoire d'écotoxicologie de l'Irstea de Lyon). Tu as toujours été disponible pour moi en répondant par exemple à mes nombreuses interrogations, que ce soit pour les statistiques ou pour mieux comprendre les subtilités de la phylogénie, et en participant activement à ma thèse. Ce n'est pas anodin si je te remercie juste après mon équipe encadrante car pour beaucoup de raisons légitimes, je t'ai toujours considéré comme un de mes encadrants. Je tiens à ce titre t'exprimer tout mon respect et mon estime. Quand tu veux pour les mojitos et les « gateaux pour chien » !

- - -

Après avoir remercier les principaux instigateurs de mes travaux de thèse, je tiens à remercier Guy Charmantier et Christophe Minier qui me font l'honneur d'être rapporteurs de mon travail de thèse. En toute sincérité, sachez que malgré le peu que je connais de vous, je mesure la chance mais aussi le défi de faire juger mon travail par votre compétence scientifique. Enfin, je remercie Nathalie Mondy et Jean Prygiel d'avoir accepté de prendre de leur temps pour examiner ma thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de pilotage : mes encadrants et surtout Mireille Charmantier-Daurès et François Bonneton pour avoir pris le temps de vous intéresser à mes travaux. Au cours de ces deux réunions, sachez que ce temps ne fut pas vain pour moi et que j'ai toujours intégré vos remarques avec beaucoup de considération.

- - -

Merci à mes stagiaires : Romy Techer et Fabien Audouard-Combe. L'énergie que vous avez mis dans vos stages respectifs ont grandement contribué à l'acquisition de données au cours de ma thèse. Romy, sache que « Dieu » te remercie pour avoir supporté son humour.

Merci aux membres et ex-membres du laboratoire et en particulier : Adeline, merci pour ta bonne humeur, tes phrases cultes et le Pouilly « bouchonné » ; les Amandines qui m'ont bien fait marrer ; Benoît, merci pour les moments passés autour d'un verre de vin ... ou de goutte ; Christelle, merci pour ton aide en stats' et surtout ta bonne humeur communicative, les moments passés ensemble pendant les colloques (plus jamais de Mc Do à l'aéroport !) et promis, si je gagne au loto je t'achèterai un Mac ; Claire ; Cyrielle, merci de m'avoir fait découvrir « Facebook », la « batchata » ou encore le « kuduro » ; Emilie Lacaze, merci pour ta cool-attitude et ces moments « collector » passés ensemble que je ne suis pas prêt d'oublier ... et sans rancune pour avoir souillé ma voiture ; Hervé Quéau, merci pour les coups de main lors des manip' et les délires ; Jacques Mouthon ; Jean-Philippe Besse dit « Micheline » en raison de sa plus grande



découverte (Gun Mayhem), merci pour les moments « offs » passés ensemble durant lesquels tu m'as fait découvrir un talent méconnu : Normand Lamour... merci mon pti pinson ! ; Jérôme ; Judith parce que « grand-mère sait faire un bon café » ; Juliette ; Khédidja ; Manuella, merci pour ta solidarité (il n'y a pas que moi qui ait eu la poisse sur certaines manip') et ta bonne humeur hors pair ; Raphaël, merci pour ta bonne humeur, ton humour et pour avoir renoncé à draguer ma copine ; Renaud, merci pour ton aide au cours des manip, ton humour certain et mon nouveau pare-choc. Dommage que tu ne connaisses pas la superficie de Trinité et Tobago... enfin c'est largement compensé par celle de l'Argentine que tu as su me donner dans un état de « fatigue avancé ».

Mention spéciale pour mon poto « Roro », ces années de thèse m'auront permis d'apprendre à te connaître et à te considérer aujourd'hui comme un véritable ami!

Je garde beaucoup de bons souvenirs de cette thèse avec toi : les colloques, les nombreux délires de bureau, les missions « terrain » (dans la Chartreuse !!) et surtout les nombreux restos et caves... que j'espère on ne manquera pas de se rappeler en souvenir de ce bon vieux temps avec Aurélie et Lilou ! Merci pour ton soutien et ta zen-attitude!

Merci aussi à Céline Boulangé-Lecomte et Benoît Xuereb, maîtres de conférences au laboratoire d'écotoxicologie de l'Université du Havre. Les réunions de projet PNRPE resteront un très bon souvenir ! Merci aussi à vous deux pour les informations qui m'ont permis de rédiger ce manuscrit.

Je tenais aussi à remercier tous les collègues chimistes de l'université de Lyon pour leur sympathie et les discussions échangées au cours des longues séries de SPE ou autour d'un café : Amélie, Aurore, « Cathy », Quentin (le toulousaing') et Jérôme Lemoine. Merci tout particulièrement à Romain Simon, thésard au laboratoire des sciences analytiques, capable de reconnaître les solvants à l'odeur (fait attention quand même, ça peut être dangereux) ! Merci pour les nombreux coups de main !

- - -

Merci aussi aux personnes à qui je pense au moment d'écrire ces remerciements de thèse : retour aux années lycée où mon professeur de SVT, Sylvain Delépine a su me transmettre cette fibre « biologiste », les années Mc Do et les délires passés en cuisine avec les copains jusqu'aux années fac où Alain Geffard m'a permis de faire de l'écotoxicologie au cours de mes deux stages de Master, c'est en partie grâce à toi si j'ai pu faire une thèse en écotoxicologie, merci pour ta confiance et ta bonne humeur ! Merci aussi aux membres du laboratoire d'écotoxicologie de Reims de cette époque : Odile, Sandrine, Vincent, Sabrina, Frédéric, Ali, Mouhammad et les autres.

Un grand merci à toute ma famille et mes amis, et particulièrement à mes parents, mes beau-parents, mon frère, mon neveu, ma filleule et mes belles-soeurs qui m'ont particulièrement soutenu dans cette dernière ligne droite. Merci à Caro et Juju pour les meilleures tartes au sucre et le baby-sitting de dernière minute. Enfin, ma louloute, Matthew, Jim' et Rom'... malgré la distance, merci pour votre soutien!

Pour finir ces remerciements, je tiens à remercier Amandine... voilà plus de 8 ans que tu partages ma vie. Merci pour ton soutien infallible depuis le début, pendant et surtout en cette fin de thèse. Merci aussi pour les longues journées passées sur mon manuscrit. Si j'ai toujours réussi ce que j'entreprenais, tu y es pour plus que personne ! L'arrivée de notre fils Noah restera un moment inoubliable! Sâche fiston, lorsque tu pourras lire ces quelques lignes, que je ne m'attendais pas à ce que tu bouleverses autant ma vie, déjà parce que tu es né 3 semaines avant l'envoi de mon manuscrit (merci pour ton soutien nocturne) mais surtout parce que tu m'apportes énormément de joie de vivre. L'avenir s'annonce radieux pour nous trois...





## TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS .....	VII
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX .....	..IX
LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS .....	XIX
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b><u>CHAPITRE 1</u> : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. PHYLOGÉNIE ET ENDOCRINOLOGIE .....</b>	<b>9</b>
1.1.1. <i>Phylogénie et signalisation hormonale des métazoaires</i>	9
1.1.2. <i>Systématique des ecdysozoaires et place des crustacés</i>	11
1.1.3. <i>Endocrinologie des crustacés</i>	12
1.1.3.1. <i>Fonctionnement et anatomie du système endocrinien</i>	13
1.1.3.1.1. <i>Le complexe « organe X / glande du sinus » et les neurohormones</i>	13
1.1.3.1.2. <i>L'organe Y et les ecdystéroïdes</i>	14
1.1.3.1.3. <i>L'organe mandibulaire et les terpénoïdes</i>	15
1.1.3.1.4. <i>Les glandes androgènes et l'hormone androgène</i>	16
1.1.3.2. <i>Les hormones vertébrostéroïdes</i>	18
1.1.3.3. <i>Régulation hormonale des processus physiologiques</i>	19
1.1.3.3.1. <i>La mue</i>	19
1.1.3.3.2. <i>La différenciation sexuelle et la gamétogenèse</i>	22
1.1.3.3.2.1. <i>La différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires</i>	23
1.1.3.3.2.2. <i>La gamétogenèse</i>	24
<b>1.2. PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : EFFETS &amp; OUTILS DE DIAGNOSTIC .....</b>	<b>27</b>
1.2.1. <i>L'étude des perturbateurs endocriniens chez les crustacés</i>	27
1.2.1.1. <i>Perturbateurs endocriniens avérés chez les vertébrés</i>	27
1.2.1.2. <i>Insecticides régulateurs de croissance</i>	28
▪ <i>les juvénoïdes</i>	29
▪ <i>les analogues de l'ecdystéroïde</i>	30
1.2.2. <i>Marqueurs pour évaluer l'impact PE de composés chez les crustacés</i>	31
1.2.3. <i>Développement de marqueurs sub-individuels : la mesure de la vitellogénine</i>	35

1.2.3.1. Généralités sur la vitellogénine	35
1.2.3.2. Méthodologies disponibles pour la mesure de vitellogénine	37
1.2.3.2.1. Méthode d'immunoagglutination : ELISA	37
1.2.3.2.2. Méthode indirecte : ALP	38
1.2.3.2.3. Méthodes génomiques	39
1.2.3.2.4. Méthode alternative : la spectrométrie de masse	41
1.2.3.3. Utilisation de la vitellogénine pour l'étude des perturbateurs endocriniens chez les invertébrés	42
▪ les mollusques	42
▪ les crustacés	45
1.2.4. Variabilité intrinsèque des biomarqueurs et obtention de valeurs de référence	47
1.2.4.1. Facteurs abiotiques	47
1.2.4.2. Facteurs biotiques	48
1.2.4.3. Valeurs de référence	49
<b>1.3. MODELE BIOLOGIQUE : GAMMARUS FOSSARUM .....</b>	<b>51</b>
1.3.1. Systématique du gammare Gammarus fossarum	51
1.3.2. Ecologie	52
1.3.3. Morphologie	53
1.3.4. Critères morphologiques pour l'identification de l'espèce	54
1.3.5. Anatomie	56
1.3.5.1. Appareil digestif	56
1.3.5.2. Système nerveux	57
1.3.5.3. Appareil circulatoire	57
1.3.5.4. Appareil reproducteur	58
1.3.6. Reproduction	59
1.3.6.1. Cycles d'inter-mue et de reproduction	59
1.3.6.2. L'accouplement	60
1.3.7. Utilisation des gammares en écotoxicologie	61
<b>1.4. OBJECTIFS .....</b>	<b>63</b>
<b><u>CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES .....</u></b>	<b>67</b>
<b>2.1. OUTILS BIOINFORMATIQUES .....</b>	<b>69</b>
2.1.1. Les banques de données	69

2.1.2. <i>La traduction en ligne</i>	69
2.1.3. <i>Le BLAST</i>	69
2.1.4. <i>Les alignements de séquences</i>	70
<b>2.2. MATERIEL BIOLOGIQUE .....</b>	<b>71</b>
2.2.1. <i>Prélèvement de gammares</i>	71
2.2.2. <i>Maintien au laboratoire des gammares</i>	72
2.2.3. <i>Dissection des gonades de gammares</i>	73
2.2.4. <i>Echantillonnage des invertébrés</i>	73
<b>2.3. EXPERIMENTATIONS .....</b>	<b>75</b>
2.3.1. <i>Application du biotest de reprotoxicité chez Gammarus fossarum</i>	75
2.3.2. <i>Expérimentations sous conditions contrôlées au laboratoire</i>	77
2.3.2.1. <i>Effet de la spermatogenèse chez les mâles</i>	78
2.3.2.2. <i>Effet de contaminants modèles chez les mâles et les femelles</i>	78
2.3.2.3. <i>Méthodes d'exposition</i>	79
2.3.3. <i>Exposition sur le terrain de gammares transplantés</i>	80
2.3.3.1. <i>Impact de facteurs environnementaux chez le mâle</i>	81
2.3.3.2. <i>Campagne de d'exposition in situ</i>	82
2.3.3.3. <i>Méthodes d'encagement</i>	82
<b>2.4. MARQUEURS BIOLOGIQUES .....</b>	<b>84</b>
2.4.1. <i>Le dosage de la vitellogénine</i>	84
2.4.1.1. <i>Extraction protéique des échantillons</i>	84
2.4.1.2. <i>Digestions enzymatiques</i>	85
2.4.1.3. <i>Quantification absolue via un étalon interne</i>	86
2.4.1.4. <i>Purification et re-concentration des échantillons</i>	86
2.4.1.5. <i>Analyse par LC-MS/MS</i>	87
2.4.2. <i>Les traits de vie chez Gammarus fossarum</i>	89
2.4.2.1. <i>Détermination du stade de mue</i>	89
2.4.2.2. <i>Mesure des paramètres de reproduction</i>	90
2.4.2.2.1. <i>Vitellogenèse secondaire (croissance et production d'ovocytes)</i>	90
2.4.2.2.2. <i>Développement embryonnaire</i>	91

**CHAPITRE 3 : DEVELOPPEMENT ET GENERALISATION DE LA MESURE DE VITELLOGENINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) CHEZ LES INVERTEBRES ..... 93**

**3.1. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN ESSAI LC-MS/MS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE DE LA VITELLOGENINE CHEZ L'AMPHIPODE DULÇAQUICOLE *GAMMARUS FOSSARUM* ..... 95**

3.1.1. *Séquençage partiel du gène de la vitellogénine chez Gammarus fossarum (Note 1)* 95

3.1.2. *L'essai LC-MS/MS en alternative à l'ELISA pour la quantification de biomarqueurs en écotoxicologie : application à la mesure de vitellogène chez un crustacé (Gammarus fossarum) (Publication n°1)* 101

**3.2. DEVELOPPEMENT ET GENERALISATION DE LA MESURE DE VITELLOGENINE CHEZ LES INVERTEBRES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) (PUBLICATION N°2) .... 111**

**CHAPITRE 4 : ETUDE DU BIOMARQUEUR Vg CHEZ L'AMPHIPODE DULÇAQUICOLE *GAMMARUS FOSSARUM* ..... 127**

**4.1. VALIDATION FONCTIONNELLE DE LA MESURE DE LA VITELLOGENINE CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM* (PUBLICATION N°3) ..... 129**

**4.2. UTILISATION *IN SITU* ET PERTINENCE DU BIOMARQUEUR Vg CHEZ LE MALE (PUBLICATION N°4) ..... 143**

**CHAPITRE 5 : UTILISATION D'UN BIOTEST DE REPROTOXICITE CHEZ LA FEMELLE *GAMMARUS FOSSARUM* (PUBLICATION N°5) ..... 159**

**CHAPITRE 6 : SYNTHESE DES RESULTATS ET DISCUSSION GENERALE ..... 197**

**6.1. DEVELOPPEMENT DE LA MESURE DE LA Vg CHEZ LE GAMMARE ..... 200**

6.1.1. *Choix du modèle biologique* 200

6.1.2. *Choix de la méthode de mesure de la Vg* 201

6.1.3. *Mise en place d'un essai LC-MS/MS robuste pour la quantification de la Vg* 202

6.1.4. *Etude de la signification fonctionnelle du biomarqueur Vg* 205

<b>6.2. GENERALISATION DE LA LC-MS/MS CHEZ LES INVERTEBRES .....</b>	<b>208</b>
6.2.1. <i>Développement d'un essai LC-MS/MS pour la mesure de Vg chez les invertébrés</i>	209
6.2.2. <i>Potentiel de généralisation de l'essai LC-MS/MS</i>	211
<b>6.3. PERTINENCE DU BIOMARQUEUR VG CHEZ LE MALE .....</b>	<b>213</b>
6.3.1. <i>Screening de substances au laboratoire</i>	213
6.3.2. <i>Variabilité intrinsèque et application in situ</i>	215
6.3.2.1. <i>Facteur biotique : le stade de spermatogenèse</i>	215
6.3.2.2. <i>Facteurs environnementaux sur des sites de référence</i>	216
6.3.2.3. <i>Effets de PE dans le milieu naturel</i>	218
<b>6.4. PERTINENCE DES MARQUEURS DE REPROTOXICITE CHEZ LA FEMELLE .....</b>	<b>220</b>
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>225</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>229</b>





## LISTE DES ABREVIATIONS

**20HE** : 20-hydroxyecdysone

**P** : 17-hydroxyprogésterone

**aa** : acide aminé

**ADN(c)** : acide désoxyribonucléique (complémentaire)

**AF** : acide farnesoïque

**ALP** : phosphate alkali-labile, de l'anglais « *alkali-labile phosphate* »

**AMBIC** : bicarbonate d'ammonium, de l'anglais « *ammonium bicarbonate* »

**AP** : alkylphénol

**Apo** : apolipoprotéine

**ApoCr** : apolipoprotéine

**ApoLp** : apolipoprotéine

**ARNm** : acide ribonucléique messager

**BLAST** : de l'anglais « *basic local alignment search tool* »

**BPA** : bisphénol A

**BZ** : benzophénone

**CA** : carbamazépine

**CHH** : hormones hyperglycémiantes crustacés, de l'anglais « *crustacean hyperglycemic hormone* »

**CP** : protéine coagulante, de l'anglais « *clotting protein* »

**CY** : cyprotérone

**DCE** : directive cadre sur l'eau

**DTT** : dithiotreitol

**DUF** : domaine à la fonction inconnue, de l'anglais « *domain of unknown function* »

**E2** : estrone

**E2** : 17 $\beta$ -oestradiol

**EcR** : récepteur ecdystéroïde, de l'anglais « *ecdysteroid receptor* »

**EE2** : 17 $\alpha$ -éthynylestradiol

**ELISA** : dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, de l'anglais « *enzyme-linked immunosorbent assay* »

**ER** : récepteur oestrogène, de l'anglais « *estrogen receptor* »

**EST** : marqueur de séquence exprimée, de l'anglais « *expression sequence tag* »

**FA** : acide formique, de l'anglais « *formic acid* »

**GA** : glande androgène

**GIH** : hormone inhibitrice de la gonade, de l'anglais « *gonad inhibiting hormone* »

**GS** : glande du sinus

**GSH** : hormone stimulatrice de la gonade, de l'anglais « *gonad stimulating hormone* »

**HA** : hormone androgène

**HAP** : hydrocarbure aromatique polycyclique

**IAM** : iodoacétamide

**JH** : hormone juvénile, de l'anglais « *juvenile hormone* »

**LC-MS/MS** : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem, de l'anglais « *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry* »

**LLTP** : protéine de transfert des lipides, de l'anglais « *large lipid transfer protein* »

**LP** : lipoprotéine

**MF** : méthyle-farnesoate

**MFPB** : protéine fixant le méthyle-farnesoate, de l'anglais « *methyl-farnesoate binding protein* »

**MIH** : hormone inhibitrice de la mue, de l'anglais « *molt inhibiting hormone* »

**MOIH** : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire, de l'anglais « *mandibular organ inhibiting hormone* »

**MTP** protéine de transfert des triglycérides, de l'anglais « *microsomal triglyceride transfer protein* »

**MX** : méthoxyfénozide

**NP** : nonylphénol

**IRC** : insecticide régulateur de croissance, en anglais « *insect growth regulator* »

**ITP** : peptide transporteur d'ion, de l'anglais « *ion transport peptide* »

**OH** : hormone ovarienne, de l'anglais « *ovarian hormone* »

**OM** : organe mandibulaire

**OX** : organe X

**OY** : organe Y

**pb** : paire de bases

**PCB** : polychlorobiphényle

**PE** : perturbateur endocrinien, en anglais « *endocrine disruptor* »

**PonA** : ponastérone A

**PZ** : propiconazole

**REACH** : *enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques*, de l'anglais « *registration, evaluation and authorisation of chemicals* »

**RP** : R-propranolol

**RXR** : récepteur rétinoïde X, de l'anglais « *retinoid X receptor* »

**SPE** : extraction sur phase solide, de l'anglais « *solid phase extraction* »

**USP** : ultraspiracle

**vWD** : domaine von Willebrand, de l'anglais « *von Willebrand domain* »

**Vq**: vitellogénine

**VIH** : hormone inhibitrice de la vitellogenèse, de l'anglais « *vitellogenesis inhibiting hormone* »

**VSOH** : hormone ovarienne stimulatrice de la vitellogénine, de l'anglais « *vitellogenin stimulating ovarian hormone* »

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure 1.1.** : Vue moderne de la phylogénie animale basée sur des données moléculaires (d'après Halanych, 2004). (p.10)
- Figure 1.2.** : Classification et diversité taxonomique au sein de l'embranchement des arthropodes (d'après Regier *et al.*, 2010). (p.11)
- Figure 1.3.** : Morphologie des trois grandes classes de crustacés du sous-embranchement des Pancrustacés : les branchiopodes, les maxillopodes et les malacostracés (modifié de LeBlanc, 2007). (p.12)
- Figure 1.4.** : Schéma d'une vue latérale d'amphipode mâle (♂) et femelle (♀) du sous-ordre des *Gammaridea* indiquant la position des principaux centres de régulation endocrinienne (modifié de Hyne, 2011). (p.13)
- Figure 1.5.** : Structures chimiques du précurseur de la biosynthèse d'ecdystéroïdes (cholestérol) et des deux principales formes actives (20-hydroxyecdysone et ponastérone A). (p.15)
- Figure 1.6.** : Synthèse simplifiée des voies de synthèse des terpénoïdes chez les insectes et les crustacés. La voie métabolique des mevalonates est à l'origine de la production des vertébrostéroïdes chez les vertébrés et des terpénoïdes chez les arthropodes. (modifié de Tobe & Bendena, 1999 ; Hui *et al.*, 2010) (p.16)
- Figure 1.7.** : Représentation schématique de la structure de la préprohormone produite par la glande androgène chez le crabe *Cherax quadricarinatus* (modifié de Ventura *et al.*, 2011). (p.17)
- Figure 1.8.** : Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule les processus de la mue chez les crustacés (modifié de Xuereb, 2009a et Hyne, 2011). (p.21)
- Figure 1.9.** : Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule la différenciation et la gamétogenèse chez les crustacés malacostracés femelles (modifié de Mazurova *et al.*, 2008 ; Xuereb, 2009b ; Hyne, 2001 ; Subramoniam, 2011). (p.22)
- Figure 1.10.** : Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule la différenciation et la gamétogenèse chez les crustacés malacostracés mâles (modifié de Mazurova *et al.*, 2008 ; Xuereb, 2009b ; Hyne, 2001 ; Subramoniam, 2011). (p.23)
- Figure 1.11.** : Structure chimique de l'hormone juvénile des insectes, du méthyle-farnesoate et de trois exemples d'insecticides juvéniles (méthoprène, fénoxicarbe et pyriproxifène) (McKenney, 2005). (p.29)
- Figure 1.12.** : Structure chimique de l'hormone de mue (20-hydroxyecdysone) et de trois insecticides analogues de l'ecdystéroïde : l'halofénoside, le tébufénoside et le méthoxyfénoside (Dhadialla *et al.*, 1998). (p.30)
- Figure 1.13.** : Structure moléculaire bi-dimensionnelle de la vitellogénine et localisation de la poche lipidique. (p.35)

- Figure 1.14.** : Evolution et structure des transporteurs lipidiques (LLTP) chez les métazoaires (modifié de Hayward *et al.*, 2010). (p.36)
- Figure 1.15.** : Photo de deux individus appartenant à l'espèce *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) représentant un mâle (♂) et une femelle (♀) formant un précopula ou en phase d'amplexus. (p.51)
- Figure 1.16.** : Aire de répartition géographique de l'amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum* en Europe (selon Barnard & Barnard, 1983). (p.52)
- Figure 1.17.** : Schéma d'une vue latérale d'un *Gammaridae* (modifié de Chevreux & Fage, 1970). (p.53)
- Figure 1.18.** : Schéma d'une coupe transversale de *Gammaridae* au niveau du mésosoma d'une femelle et entre le 7<sup>e</sup> périomère du mésosoma et le 1<sup>er</sup> pléomère du métasoma d'un mâle (modifié d'après Chevreux & Fage, 1970). (p.54)
- Figure 1.19.** : Synthèse des clés d'identification de *Gammaridae* (d'après Felten, 2003). (p.55)
- Figure 1.20.** : Coupe latérale d'un *Gammaridae* présentant les principaux viscères le composant. (d'après Schmitz, 1992). (p.56)
- Figure 1.21.** : Coupes longitudinales de *Gammaridae* mâle et femelle : localisation du système reproducteur au niveau du mésosoma et du métasoma et structure de l'appareil génital (d'après Charniaux-Cotton, 1965). (p.59)
- Figure 1.22.** : Description des cycles d'inter-mue et de reproduction chez la femelle *Gammarus fossarum* (d'après Geffard *et al.*, 2010). (p.60)
- Tableau 1.1.** : Liste non-exhaustive d'études de laboratoire rapportant les effets de PE chez les crustacés. (p.31)
- Tableau 1.2.** : Espèces de crustacés et de mollusques chez lesquelles des techniques de dosage de la vitellogénine par immuno-essais ont été validées. (p.37)
- Tableau 1.3.** : Espèces de crustacés et de mollusques chez lesquelles des techniques de dosage de la vitellogénine par la méthode ALP ont été validées. (p.38)
- Tableau 1.4.** : Espèces de crustacés et de mollusques chez lesquelles la séquence codante du gène de la vitellogénine a été partiellement ou complètement caractérisée. (p.40)
- Tableau 1.5.** : Etudes ayant rapporté des modulations de la synthèse de vitellogénine chez des mollusques suite à une exposition au laboratoire ou sur le terrain. (p.42)
- Tableau 1.6.** : Etudes ayant rapporté des modulations de la synthèse de Vg chez des crustacés suite à une exposition au laboratoire ou sur le terrain. (p.45)

## **CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES**

- Figure 2.1.** : Localisation du site de prélèvement de *Gammarus fossarum* sur un affluent du Rhône : « la Bourbre », au niveau de la Tour du Pin (Isère, France). (p.71)

- Figure 2.2.** : Prélèvement d'organismes épibenthiques au troubleau suivi par le tri des gammares sur une colonne de tamis (Lacaze, 2011). **(p.72)**
- Figure 2.3.** : Installation pour la stabulation des gammares au laboratoire **(p.72)**
- Figure 2.4.** : Etapes de dissection des gonades mâle et femelle. 1 : Mâle et femelle en amplexus ; 2 : Elimination du céphalon, des cæcums et du tube digestif ; 3. Isolation et récupération de la gonade mâle ; 4. Isolation et récupération de la gonade femelle contenant les ovocytes. **(p.73)**
- Figure 2.5.** : Application du biotest développé chez *Gammarus fossarum* pour la mesure de marqueurs en lien avec la reproduction (d'après Geffard *et al.*, 2010). **(p.75)**
- Figure 2.6.** : Relation entre la température (°C) et la durée (jours) des différents stades du cycle de mue chez *Gammarus fossarum* (modifié de Coulaud, 2012). **(p.76)**
- Figure 2.7.** : Substances modèles testées au cours des expérimentations au laboratoire en conditions contrôlées chez *Gammarus fossarum*. **(p.79)**
- Figure 2.8.** : Dispositif expérimental semi-statique utilisé au cours des expositions au laboratoire en conditions contrôlées chez *Gammarus fossarum*. **(p.115)**
- Figure 2.9.** : Localisation des sites d'encagement *in situ* de *Gammarus fossarum*. **(p.82)**
- Figure 2.10.** : Matériels et méthodes d'encagement sur le terrain avec de gauche à droite : la chambre d'encagement, les caisses d'encagement et les systèmes d'encagement dans une rivière installés près de la berge (photo de droite). **(p.83)**
- Figure 2.11.** : Etapes du protocole de broyage (A) et de délipidation (B) des échantillons. **(p.84)**
- Figure 2.12.** : Etapes de réduction, d'alkylation et de digestion enzymatique (enzyme utilisée : la trypsine) des échantillons. **(p.85)**
- Figure 2.13.** : Etapes de purification et de re-concentration des échantillons de gammares mâles. **(p.87)**
- Figure 2.14.** : Schéma simplifié du couplage LC-MS/MS. **(p.87)**
- Figure 2.15.** : Principe du mode MRM : sélection de l'ion parent au niveau du premier quadripôle (Q1), suivie de la fragmentation de l'ion parent et de la production d'ions fils dans le second quadripôle (Q2) et d'une sélection de l'ion fils au niveau du troisième et dernier quadripôle avant sa détection. **(p.88)**
- Figure 2.16.** : Méthodologie de détermination du stade de mue chez la femelle : les changements tégumentaires du dactylopodite et du protopodite de la 3e et 4e paire de périopodes au cours du cycle de mue de *Gammarus fossarum* (modifié de Xuereb, 2009a ; Geffard *et al.*, 2010). **(p.89)**
- Figure 2.17.** : Méthodologie de mesure des « marqueurs macroscopiques » associée aux critères de détermination du stade de développement pour les embryons (d'après Xuereb, 2009b). **(p.90)**
- Figure 2.18.** : Photographie sous loupe binoculaire d'embryons de *Gammarus fossarum* présentant divers types d'anomalies après 21 jours de développement à 12°C (stade 3) (d'après Lacaze *et al.*, 2011c). **(p.91)**

**Tableau 2.1.** : Liste des invertébrés utilisés afin de développer la mesure de vitellogénine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). (●) Espèces pour lesquelles une séquence partielle ou complète codant pour la Vg est disponible dans les banques génomiques (numéro d'accès dans le Tableau 1.4). (p.74)

**Tableau 2.2.** : Liste détaillée des expérimentations réalisées au laboratoire en conditions contrôlées. (p.77)

**Tableau 2.3.** : Liste détaillée des expérimentations réalisées sur le terrain (*in situ*). (p.81)

### **CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT ET GENERALISATION DE LA MESURE DE VITELLOGENINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) CHEZ LES INVERTEBRES**

#### **Note 1**

**Figure 3.1.** : Etapes conduisant au séquençage partiel de la Vg chez *Gammarus fossarum* (p.99)

#### **Publication n°1**

**Figure 1.** : Partial vitellogenin protein sequence of *G. fossarum* and the MS/MS spectra of two observed peptides. The bold and underlined amino acids in sequence represent peptides detected in the MRM assay. (p.105)

**Figure 2.** : Reconstructed chromatograms (TIC) showing the sum of the 8 tryptic peptides observed (3 MRM transitions per peptide) of Vg. (p.106)

**Figure 3.** : Correlation of the chromatographic peak area between the ILIPGVGK peptide with other Vg peptides (A–C). Reproduction cycle times (from phase B to phase D2) are also presented (A). The same set of samples was used for the two other comparisons (B and C). (p.106)

**Figure 4.** : Extracted ion chromatogram of MRM transition (398.8 to >457.3) monitored for ILIPGVGK (A) protein extraction solvent, (B) protein extraction solvent spiked at 2.5 µg/mL, and (C) male *G. fossarum* extract. (p.107)

**Figure 5.** : Vitellogenin concentration (in pmol of Vg/mg of organism, mean±SD, n=5) in *G. fossarum* females exposed to methyl farnesoate concentrations ranging from 0 to 100 µg/L. (p.108)

**Table 1.** : Calibration curve regression parameters. (p.107)

**Table 2.** : Intra-day variation for ILIPGVGK (398.8/457.3) and ILIPGV\*GK (401.8/463.3) (n = 6). (p.108)

#### **Publication n°2**

**Figure 1.** : The five steps followed for the identification of Vg-proteotypic peptides in species with known Vg-like protein sequences. (p.115)

**Figure 2.** : Illustration of the validation of Vg-proteotypic peptides in *Drosophila melanogaster*. Reconstructed chromatograms (TIC) in female (A) and male (B) showing the sum of the 16 validated peptides (only the most intense transition of each peptide is represented); (C)

extracted ion chromatogram of the three most intense transitions monitored for YAMLDIEK peptide; (D) MS/MS fragmentation spectra for sequence validation. (p.117)

**Figure 3.** : Transferability of Vg-proteotypic peptides from Vg-sequenced to Vg-unsequenced species. Panels A, B and C report the results of successful identification in gammarids, daphnids, and drosophilids of Vg-proteotypic peptides, which were first validated in a reference Vg-sequenced species indicated in bold. Panel D reports the results in gastropods without a first validation in the Vg-sequenced species *Haliotis discus*. Peptides are reported in Table S2. (p.118)

**Figure 4.** : From the validated peptide LENMNLER in *Drosophila melanogaster* to the identification of the peptide LENMSLEK in *D. subobscura* using the evolutionary conservation of egg-yolk protein sequences within drosophilids. (p.120)

**Table 1.** : Identification of Vg-proteotypic peptides in eight protostome invertebrate species, for which Vg-like protein sequences were available in public sequence databases. The different steps of peptide identification are described in Fig. 1. Numbers in bold correspond to Vg-proteotypic peptides considered for cross species application in gammarids, daphnids and drosophilids (Fig. 3). List of validated peptides are reported in Table S1. (p.114)

**Suppl. Table 1.** : Details for the establishment of positive / negative samples according to the biology of tested species. (p.123)

**Suppl. Table 2.** : List of validated peptides in the different species of the study (except *L. salmonis* for which sequence confirmation by MS/MS fragmentation has not been performed). (p.124)

## **CHAPITRE IV : ETUDE DU BIOMARQUEUR Vg CHEZ L'AMPHIPODE DULÇAQUICOLE *GAMMARUS FOSSARUM***

### **Publication n°3**

**Figure 1.** : Correlation of *Gammarus fossarum* Vg level (expressed in pmole ILIPGVGK peptide per oocyte) and mean oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup>) throughout the reproductive-molt cycle of sexually active females (from AB to D2 molt stage). AB, C1, C2, D1 and D2 correspond to five molt stages characterized in *G. fossarum* (Geffard *et al.*, 2010). Symbols: AB stage (solid square), C1 stage (empty triangle), C2 stage (solid triangle), D1 stage (empty circle) and D2 stage (solid circle). Black solid and dashed lines illustrate linear correlation and standard error (adjusted R-squared: 0.89; p-value < 1e<sup>-16</sup>). 9 ≥ n ≥ 15 females per molt stage. (p.135)

**Figure 2.** : Vg level (expressed in pmole ILIPGVGK peptide per oocyte, A) and mean oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup>, B) in C2 molt stage *Gammarus fossarum* females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100 µg.L<sup>-1</sup>) and methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100 µg.L<sup>-1</sup>). (p.136)

**Figure 3.** : Correlation of *Gammarus fossarum* Vg level (expressed in pmole ILIPGVGK peptide per oocyte, Y axis) and mean oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup>, X axis) in C2 molt stage females after 21-day exposure to methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100 µg.L<sup>-1</sup>). Symbols: MF – 0.01 µg.L<sup>-1</sup> (empty square), MF – 1 µg.L<sup>-1</sup> (empty triangle) and MF – 100 µg.L<sup>-1</sup> (empty circle) exposed females. Gray box delimits C2 molt stage from Vg content (Y axis) and mean oocyte surface (X axis), previously characterized in control group through the reproductive-molt cycle of sexually active females (from AB to D2 molt stages) (see Section 3.1, Table 1 and Fig. 1). Black solid



and dashed lines show linear correlation and standard error of Vg content and mean oocyte surface in control group through the reproductive-molt cycle of sex-ually active females (from AB to D2 molt stages, see Section 3.1, Fig. 1).  $10 \geq n \geq 14$  C2 molt stage females per condition. (p.136)

**Figure 4.** : Square-root of Vg level (expressed in pmol ILIPGVGK peptide per mg) in *Gammarus fossarum* males after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and R-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control = water; solvent control = acetone 0.005%. Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. The p-values of the global effect of treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control groups (solvent free control and solvent control) in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines represent median and superior confidence interval of all controls combined.  $n = 15$  males per condition, except for CY-1,000 ( $n = 9$ ). (p.137)

**Table 1.** : *Gammarus fossarum* Vg level in males and embryos throughout the embryonic development cycle (from 1 to 5 embryonic stage), and Vg level and mean oocyte surface in females throughout the reproductive-molt cycle (from AB to D2 molt stage). AB, C1, C2, D1 and D2 correspond to five molt stages and 1, 2, 3, 4 and 5 correspond to five developmental stages characterized in *G. fossarum* (Geffard *et al.*, 2010). Table presents mean  $\pm$  standard error values of Vg level quantified by LC-MS/MS (expressed in pmol ILIPGVGK peptide per mg in male, per oocyte in female, and per embryo), and values of mean oocyte surface measured after analysis of oocyte images with Sigma Scan Pro 5 software in females (expressed in  $\text{mm}^2$ ). Statistical analyses are reported in the text. *nd* = not determined.  $7 \geq n \geq 15$  per condition. (p.135)

**Table 2.** : *Gammarus fossarum* survival rates (%) and C1, C2 and D1 molt stages (%) in females after 21 days of exposure: solvent-free control (i.e., water), solvent control (i.e., acetone 0.005%), 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate (0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). (p.135)

#### **Publication n°4**

**Figure 1.** : Levels of Vg (expressed in pmole/mg) quantified in *G. fossarum* males during spermatogenesis. "Day-1": less than 24 h before egg fertilization; "Day 0": 24 hours after egg fertilization; "Day +7": seven days after egg fertilization.  $n = 10$ . Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. (p.149)

**Figure 2.** : Levels of Vg (expressed in pmole/mg) quantified in *G. fossarum* males during four *in situ* deployments in the Ardières and Bourbre reference stations (December 2008, April 2009, July 2009, October 2009). Same conventions as figure 1. Similar letters indicate no difference between boxplots (Mann-Whitney with Bonferroni correction  $p > 0.05$ ).  $n = 10$ . (p.150)

**Figure 3.** : Levels of Vg (expressed in pmole/mg) quantified in *G. fossarum* males during the *in situ* deployments in reference and polluted stations (June 2010). Same conventions as figure 1. Stars indicate significant difference between the reference stations and a polluted station (Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ).  $n = 15$ . (p.150)

**Table 1.** : General information on two reference stations on Ardières (Les Ardillats) and Bourbre (Tour du Pin) rivers in December 2008, April 2009, July 2009, and October 2009. (p.148)

**Table 2.** : General information on 21 *in situ* deployments in reference (R) or polluted (P) stations in the Rhône-Alpes region during June 2010. (p.148)

**Suppl. Table 1.** : General information of bioaccumulation levels in *G. fossarum* males for heavy metals, pesticides, and persistent organic pollutants in 21 *in situ* deployments in reference (R) or polluted (P) stations in the Rhône-Alpes region during June 2010. Red cells indicate measured concentrations in gammarids strictly superior to threshold values (expressed in  $\mu\text{g.g}^{-1}$  for metals and  $\text{ng.g}^{-1}$  for organic contaminants). Ni: nickel; Cd: cadmium ; Pb: lead ; Hg : mercury ; DDE : dichlorodiphenyldichloroethylene ; DDD : dichlorodiphenyldichloroethane ; DDT : dichlorodiphenyltrichloroethane ; PBDE : polybromodiphenylether ; PCB : polychlorinated biphenyl (p.155)

## **CHAPITRE V : UTILISATION D'UN BIOTEST REPROTOXICITE CHEZ LA FEMELLE *GAMMARUS FOSSARUM***

### **Publication n°5**

**Figure 1.** : *Gammarus fossarum* mean oocyte surface (expressed in  $\text{mm}^2$ ) in C2 molt-stage females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), and *R*-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control = Water; Solvent control = Acetone 0.05%. Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. The *p*-values of statistical testing of the global effect of treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control of the experiment (both solvent-free control and solvent control), in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control.  $7 \geq n \geq 15$  C2-molt stage females per condition. (p.168)

**Figure 2.** : *Gammarus fossarum* normalized number of oocytes in C2 and D1 molt-stage females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), and *R*-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control = Water; Solvent control = Acetone 0.05%. Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. The *p*-values of statistical testing of the global effect of treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control of the experiment (both solvent-free control and solvent control), in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control.  $9 \geq n \geq 15$  C2- and D1-molt stage females per condition. (p.169)

**Figure 3.** : *Gammarus fossarum* percentage of normal embryo (95% CI) in C2 and D1 molt-stage females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesaote (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), and *R*-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control = Water; Solvent control = Acetone 0.05%. The *p*-values of statistical testing of the global effect of treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ). Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median and 95% CI of the overall control.  $9 \geq n \geq 15$  C2 and D1 molt-stage females per condition. Detailed analyses are reported in the text. (p.170)

**Figure 4.** : *Gammarus fossarum* mean oocyte surface (expressed in  $\text{mm}^2$ ) in C2 molt-stage females after field exposure in 13 stations (A–M). Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control of the experiment (stations A,B,C,D and E).  $7 \geq n \geq 18$  C2 molt-stage females per condition. (p.171)

**Figure 5.** : *Gammarus fossarum* normalized oocyte number in C2 and D1 molt-stage females after field exposure on 13 stations (A–M). Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control of the experiment (stations A,B,C,D and E), in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control.  $7 \geq n \geq 18$  C2 and D1 molt-stage females per condition. (p.172)

**Figure 6.** : *Gammarus fossarum* percentage of normal embryo (95% CI) in C2 and D1 molt-stage females after field exposure in 13 stations (A–M). \* = significant difference ( $p < 0.05$ ). Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median and 95% CI of the overall control of the experiment (stations A,B,C,D and E).  $7 \geq n \geq 18$  C2 and D1 molt-stage females per condition. Detailed analyses are reported in the text. (p.173)

**Table 1.** : *Gammarus fossarum* occurrence of survival (%) and occurrence of C1, C2, and D1 molt stages (%) in females: solvent-free control (*i.e.*, water), solvent control (*i.e.*, acetone 0.05%), 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), and *R*-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). (p.167)

**Table 2.** : Station physicochemical parameters and *Gammarus fossarum* occurrence of survival (%), number of female molt stage analysis, and occurrence of C1, C2, and D1 molt stages (%) in females in 13 stations (A–M). (p.171)

## **CHAPITRE VI : SYNTHÈSE DES RESULTATS ET DISCUSSION GENERALE**

**Figure 6.1.** : [A] Prédiction des peptides protéotypiques (via le logiciel MRM Pilot) obtenus après digestion *in silico* de la séquence protéique partielle de *Gammarus fossarum* (numéro d'accès dans les banques génomiques : GU). [B] Chromatogramme des peptides (somme des transitions MRM, c.a.d. de l'intensité des ions fils) qui ont été recherchés par LC-MS/MS à

partir d'un échantillon riche en Vg (oeufs matures). ● : prédiction des sites de clivage après digestion enzymatique de la protéine à la trypsine. Les peptides soulignés correspondent aux huit plus sensibles détectés lors de l'analyse LC-MS/MS. (p.200)

**Figure 6.2.** : Spectre de fragmentation MS/MS du peptide ILIPGVGK. (p.201)

**Figure 6.3.** : Dosage « relatif » (exprimé en aire moyenne des pics d'intensité) de 5 peptides et inter-corrélation avec le peptide ILIPGVGK sur des ovocytes à différents stades de mue (soit à différents stade de vitellogenèse). (p.202)

**Figure 6.4.** : Mesure de la Vg (exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK /mg de poids frais) chez *Gammarus fossarum* [A] de la femelle au cours de la vitellogenèse (exprimée en fonction des stades de mue A, B, C1, C2, D1 et D2), [B] chez les embryons au cours de l'embryogenèse (exprimée en fonction des stades de développement embryonnaire I, II, III, IV et V). (p.204)

**Figure 6.5.** : Teneurs en Vg (exprimées en pmole de peptide ILIPGVGK /mg de poids frais) mesurées chez la femelle en début ou en fin de vitellogenèse (respectivement, stades de mue A et D2) et chez le mâle et, le ratio femelle/mâle (différences inter-sexe). (p.204)

**Figure 6.6.** : Corrélation entre la mesure de Vg (exprimée en pmole ILIPGVGK / ovocyte) et la mesure de surface des ovocytes (exprimée en mm<sup>2</sup>) au cours d'un cycle complet de reproduction (exprimé en terme de stade de mue : AB (période de post-mue), C1 et C2 (période d'inter-mue), D1 et D2 (période de pré-mue)). (p.205)

**Figure 6.7.** : Stratégie d'identification et de validation des peptides spécifiques de la Vg en cinq étapes appliquées pour les six espèces étudiées, pour lesquelles une séquence partielle ou complète de la Vg est disponible dans les banques de données génomiques. (p.207)

**Figure 6.8.** : Bilan du nombre de peptides prédits et de peptides validés ainsi que de la proportion de peptides validés par rapport au nombre de peptides prédits chez les six espèces d'invertébrés. (p.208)

**Figure 6.9.** : Transférabilité et validation des peptides spécifiques de la Vg chez les espèces séquencées (*Gammarus fossarum*, *Daphnia magna* et *Drosophila melanogaster*) à des espèces de gammarés (A), de daphnies (B) et de drosophiles (C) non séquencées. (p.209)

**Figure 6.10.** : Transférabilité et validation des peptides prédits in silico à partir de la séquence du gastéropode *Haliotis discus* chez deux espèces de gastéropodes non séquencées (*Haliotis tuberculata* et *Biomphalaria glabrata*). (p.210)

**Figure 6.11.** : Teneurs en Vg (exprimées en pmole de peptide ILIPGVGK/mg) chez les gammarés mâles après 21 jours d'exposition à 8 substances modèles : 20-hydroxyecdysone (20HE), méthyle-farnesoate (MF), méthoxyfénozide (MX), propiconazole (PZ), benzophénone (BZ), carbamazépine (CA), cyprotérone (CY) et R-propranolol (RP). (p.212)

**Figure 6.12.** : Teneurs en Vg (exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK/mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* au cours de la spermatogenèse. « D-1 » : moins de 24 heures avant l'accouplement ; « D0 » : 24 heures après l'accouplement ; « D7 » : sept jours après l'accouplement. (p.214)

**Figure 6.13.** : Teneurs en Vg (exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK/mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* pendant 4 séries de transplantations sur l'Ardières et la Bourbre, sites de référence (Décembre 2008, Avril 2009, Juillet 2009 et Octobre 2009). (p.215)

**Figure 6.14** : Teneurs en Vg (exprimées en pmole de peptide ILIPGVGK/mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* au cours d'une campagne de transplantations d'organismes sur des sites de référence (R1 à R5) et des sites pollués (P1 à P16) en Juin 2010. (p.216)

**Figure 6.15** : Corrélation entre le niveau de Vg (exprimée en pmole ILIPGVGK peptide par ovocyte, axe y) et la surface moyenne des ovocytes (exprimée en mm<sup>2</sup>, axe x) chez les femelles *G. fossarum* de stade de mue C2 après 21 jours d'exposition au méthyle-farnesoate. (p.219)

**Tableau 6.1.** : Récapitulatif des effets observés à la lecture de plusieurs réponses individuelles chez les femelles *G. fossarum* exposées pendant 21 jours en conditions contrôlées de laboratoire à des composés modèles. (p.220)

# LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

## PUBLICATIONS

---

### **Publication n°1**

Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*) (2012). ***Journal of Chromatography A*** 1217:5109–5115. Romain Simon, [Guillaume Jubeaux](#), Arnaud Chaumot, Jérôme Lemoine, Olivier Geffard, Arnaud Salvador.

### **Publication n°2**

Vitellogenin-like proteins among invertebrate species diversity: potential of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development (2012). ***Environmental Science & Technology***, 46(11):6315-6323. [Guillaume Jubeaux](#), Fabien Audouard-Combe, Romain Simon, Renaud Tutundjian, Arnaud Salvador, Olivier Geffard, Arnaud Chaumot.

### **Publication n°3**

Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males (2012). ***Aquatic Toxicology***, 112-113:72-82. [Guillaume Jubeaux](#), Arnaud Salvador, Romain Simon, Hervé Quéau, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard.

### **Publication n°4**

Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: inconclusive experience (2012). ***Aquatic Toxicology***, 122-123:9-18. [Guillaume Jubeaux](#), Romain Simon, Arnaud Salvador, Christelle Lopes, Emilie Lacaze, Hervé Quéau, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard.

### **Publication n°5**

Application of reproductive toxicity assessment developed in *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) for lab and field experiments. Soumission prévue à *Aquatic Toxicology*. [Guillaume Jubeaux](#), Romain Coulaud, Romy Techer, Hervé Quéau, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard.

## COMMUNICATIONS AFFICHEES

---

### ● Colloques nationaux

La LC-MS/MS : une alternative aux méthodes ELISA pour le dosage de biomarqueurs en écotoxicologie. Application au dosage de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum*. Romain Simon, [Guillaume Jubeaux](#), Olivier Geffard, Jérôme Lemoine, Arnaud Chaumot, Arnaud Salvador. 26<sup>èmes</sup> ***Journées Françaises de Spectrométrie de Masse, Dijon-France, 13-17 Septembre 2009.***

Mesure de la vitellogénine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) chez un amphipode dulçaquicole, *Gammarus fossarum* : un biomarqueur potentiel de la perturbation endocrinienne. Guillaume Jubeaux, Romain Simon, Fabien Audouard-Combe, Hervé Quéau, Arnaud Salvador, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard. **Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Paris-France, 26-27 Juin 2011.**

Mesure de la vitellogénine chez les invertébrés : pertinence et application de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) en vue de proposer une méthode spécifique et transférable entre espèces. Guillaume Jubeaux, Fabien Audouard-Combe, Romain Simon, Renaud Tutundjian, Hervé Quéau, Arnaud Salvador, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard. **Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Paris-France, 26-27 Juin 2011.**

Measurement of vitellogenin protein in invertebrates: relevance and usefulness of mass spectrometry (LC-MS/MS) to propose a specific and transferable method across species. Romain Simon, Fabien Audouard-Combe, Guillaume Jubeaux, Renaud Tutundjian, Hervé Quéau, Jeanne Garric, Olivier Geffard, Jérôme Lemoine, Arnaud Chaumot, Arnaud Salvador. **Congès de Spectrométrie de Masse et d'Analyse Protéomique (SMAP), Avignon-France, 19-22 Septembre 2011.**

#### ● Colloques internationaux

Vitellogenin quantification by LC/MS-MS in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* : development, caracterisation et perspectives. Guillaume Jubeaux, Romain Simon, Arnaud Salvador, Jérôme Lemoine, Hervé Quéau, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard. **20<sup>th</sup> Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe Annual meeting, Sevilla-Spain, 23-27 May 2010.**

Developing a method for vitellogenin quantification to investigate the reproductive investment in gammarids. Guillaume Jubeaux, Romain Simon, Arnaud Chaumot, Fabien Audouard-Combe, Arnaud Salvador, Olivier Geffard. **14<sup>th</sup> International Colloquium on Amphipoda, Sevilla-Spain, 13-18 September 2010.**

#### COMMUNICATIONS ORALES

---

#### ● Colloques nationaux

La LC-MS/MS : une alternative aux méthodes ELISA pour le dosage de biomarqueurs en écotoxicologie. Application au dosage de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum*. Arnaud Salvador, Romain Simon, Guillaume Jubeaux, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard, Jérôme Lemoine. **Journées Santé Environnement, Cluster Environnement, Séminaire P6, Lyon-France, 4-5 Mars 2010.**

Approche multi-échelle chez *Gammarus fossarum* : Développement d'indicateurs toxicologiques pour l'évaluation de la qualité des milieux. Olivier Geffard, Arnaud Chaumot, Benoît Xuereb, Olivier Adam, Guillaume Jubeaux, Romain Coulaud. **Journées Santé Environnement, Cluster Environnement, Séminaire P6, Lyon-France, 4-5 Mars 2010.**

- **Colloques internationaux**

Quantification of vitellogenin by mass spectrometry (LC-MS/MS) in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum* : a potential endocrine disruption biomarker. Guillaume Jubeaux, Romain Simon, Fabien Audouard-Combe, Hervé Quéau, Arnaud Salvador, Arnaud Chaumot, Jeanne Garric, Olivier Geffard. **21<sup>th</sup> Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe Annual meeting, Milano-Italy, 15-19 May 2011.**

Measurement of vitellogenin protein in invertebrates : relevance and usefulness of mass spectrometry (LC-MS/MS) to propose a specific and transferable method across species. Guillaume Jubeaux, Fabien Audouard-Combe, Romain Simon, Renaud Tutundjian, Hervé Quéau, Arnaud Salvador, Arnaud Chaumot, Jeanne Garric, Olivier Geffard. **21<sup>th</sup> Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe Annual meeting, Milano-Italy, 15-19 May 2011.**





## INTRODUCTION

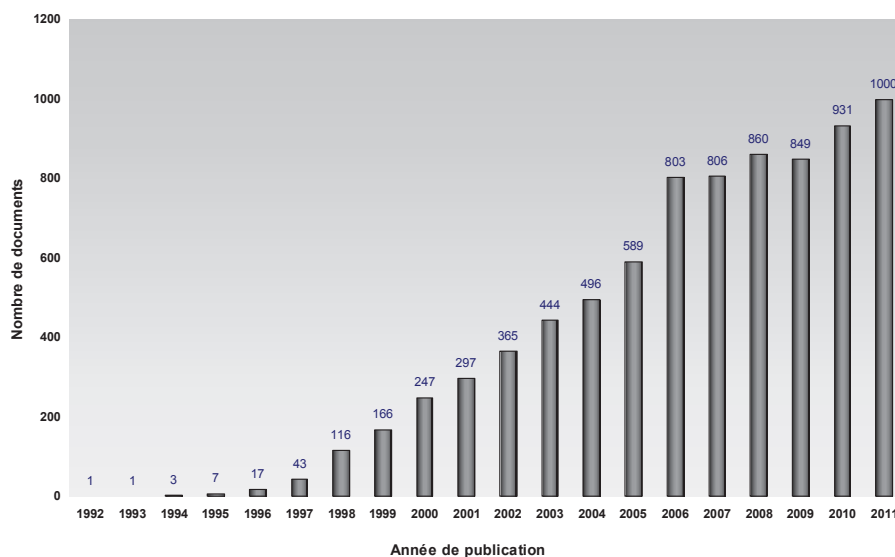
Depuis les années 1950, la chimie industrielle est en plein essor et a révolutionné les activités industrielles, agricoles, urbaines et domestiques. L'utilisation et l'émission massive de composés organiques de synthèse est devenue une des problématiques majeures dans le monde entier, aussi bien sur le plan sanitaire qu'environnemental. Avec plus de 100 000 composés de synthèse dans l'environnement (Depledge & Galloway, 2005), les milieux aquatiques restent le réceptacle de la très grande majorité de ces contaminants. De plus, la plupart de ces contaminants sont persistants dans l'environnement et s'accumulent dans les organismes et au sein des réseaux trophiques.

La récente prise de conscience de l'importance et de la fragilité des biens et services que procurent les écosystèmes aquatiques à l'Homme (Costanza *et al.*, 1997) s'est soldée par la volonté d'une gestion plus raisonnée des ressources naturelles. Par conséquent, l'évaluation de la qualité de l'eau et de la santé des écosystèmes aquatiques ainsi que la gestion des substances susceptibles d'y être introduites sont devenues obligatoires et sont inscrites dans la réglementation nationale et européenne (*e.g.*, Lois sur l'eau n°64-1245, n°92-3 et n°2006-1772 ; directive cadre sur l'eau 2000/60/CE, DCE ; Règlement européen n°1907/2006 sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et la restriction des substances chimiques, REACH).

Les méthodes permettant de surveiller la qualité des milieux aquatiques se basent aujourd'hui sur deux approches : [1] chimique – basée sur la mesure des contaminants dans les milieux physiques et biologiques, et [2] biologique – basée sur l'évaluation des effets des pollutions sur les organismes vivants, soit au niveau des individus, soit au niveau des populations et/ou des communautés (Amiard *et al.*, 1998). L'approche chimique permet de mesurer les niveaux de contamination de diverses matrices (*e.g.*, eau, sol, sédiment, végétaux, animaux). Cependant, elle présente plusieurs limites comme l'impossibilité d'évaluer l'effet des contaminants chez les individus exposés. L'approche biologique repose sur deux types d'outils complémentaires : les bioindicateurs et les biomarqueurs. L'utilisation de bioindicateurs repose sur la présence et l'abondance d'espèces ou groupes d'espèces bioindicatrices des milieux aquatiques (*e.g.*, communautés algales, macro-invertébrés benthiques, poissons (Rosenberg & Resh, 1993)) et apporte une information sur l'évaluation globale de la qualité du milieu. Cependant, les indices biocénotiques et les bioindicateurs ne répondent pas aux attentes de compréhension des processus toxiques mis en jeu, ni à l'identification des pressions qui peuvent être d'ordre physique (*e.g.*, modification de l'habitat), biologique (*e.g.*, prédation, compétition) ou chimique. De plus, ces outils ne permettent pas d'évaluer de façon précoce l'impact d'une pollution (Attrill & Depledge, 1997 ; Clements, 2000). Les biomarqueurs sont des outils plus précoces et s'imposent de plus en plus dans le domaine de l'évaluation de la qualité de l'eau et de la santé des écosystèmes (Amiard *et al.*, 1998). L'utilisation de biomarqueurs présente l'avantage d'évaluer la présence et également les effets des contaminants biodisponibles chez les individus exposés,

dans le temps et dans l'espace (Amiard *et al.*, 1998). Dans ce manuscrit, le terme « *biomarqueur* » se réfère à tous les paramètres biochimiques, moléculaires, cellulaires, histologiques ou physiologiques qui peuvent être observés ou mesurés dans les cellules, tissus, fluides corporels ou dans l'organisme entier pour mettre en évidence l'exposition ou les effets d'un ou plusieurs polluants chimiques (Depledge & Fossi, 1994 ; Lagadic, 1997).

Parmi les substances polluantes, les « *perturbateurs endocriniens* » (PE) sont au coeur des préoccupations scientifiques internationales. Au début des années 1990, un consensus scientifique a mis en lumière le risque potentiel d'une catégorie de contaminants susceptibles de perturber le fonctionnement normal du système endocrinien qui contrôle les grandes fonctions biologiques d'un organisme (Colborn *et al.*, 1993). Ces contaminants sont à l'origine d'une large gamme d'effets délétères qui ont pu être observés chez plusieurs espèces dans leur environnement naturel (*e.g.*, oiseaux, Hickey & Anderson, 1968 ; mollusques gastéropodes, Gibbs *et al.*, 1990 ; reptiles, Bergeron *et al.*, 1994 ; poissons, Sumpter & Jobling, 1995 ; batraciens, Burkhardt *et al.*, 1998 ; Hayes *et al.*, 2003). Un PE est défini comme « *un agent exogène capable d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles qui sont responsables de la maintenance, de l'homéostasie, de la reproduction, du développement, du comportement* » (Kavlock *et al.*, 1996). Depuis vingt ans, le nombre croissant de publications liées aux problèmes d'exposition et d'effet des PE témoigne d'une forte préoccupation scientifique concernant l'impact potentiel de ces composés dans les milieux aquatiques (voir la figure ci-dessous).



**Nombre de documents scientifiques publiés par année depuis 1992 sur les PE. Recherche effectuée dans la base de données bibliographiques SciVerse Scopus® avec les termes « *endocrine disruption* » et/ou « *endocrine disruptor* » dans le résumé, le titre ou les mots-clés des documents disponibles.**



L'étude de la biodisponibilité et de l'impact des PE chez les vertébrés aquatiques, principalement les poissons, a fait l'objet de nombreux projets de recherche et de publications (Matthiessen, 2003a ; Langston *et al.*, 2005). Ces travaux ont conduit au développement d'outils de diagnostic pouvant être utilisés *in situ*, tels que l'induction de la vitellogénine (Vg) plasmatique chez les mâles et les juvéniles, l'inhibition de la croissance ovarienne et testiculaire, le retard dans la maturité sexuelle, la présence d'individus intersexués, la féminisation ou la masculinisation des caractères sexuels secondaires et les concentrations anormales en hormones stéroïdiennes circulantes. En

revanche, la thématique des PE a été très peu abordée chez les invertébrés alors qu'ils représentent plus de 95 % des espèces animales et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement et le maintien des écosystèmes aquatiques (Depledge & Billingham, 1999 ; Porte *et al.*, 2006). Ce constat résulte en partie de la mauvaise connaissance de leur système de régulation hormonale et se traduit par l'absence d'outils spécifiques utilisables en milieu naturel.

De façon générale, les études menées sur les PE dans l'environnement se focalisent plus particulièrement sur la régulation hormonale en lien avec la reproduction des organismes, étant donné son rôle crucial dans le maintien des populations. La récente revue de LeBlanc (2007) a fait le point sur les réponses biologiques pouvant être proposées comme potentiels biomarqueurs de la perturbation endocrinienne chez les crustacés. Ces biomarqueurs se focalisent principalement sur l'étude de l'intersexualité, du sex-ratio dans la descendance, des altérations du cycle de mue (synchronisé avec le cycle de reproduction) ou des niveaux de Vg.

Chez les espèces ovipares, la Vg ou les protéines « Vg-like » sont les protéines précurseurs du vitellus, accumulé dans les oeufs, qui fournissent les réserves énergétiques nécessaires aux embryons pour assurer leur développement. Ces protéines sont donc par définition fortement impliquées dans la reproduction des femelles. L'induction de Vg chez les mâles et les juvéniles de poissons est un effet bien connu des contaminants œstrogéniques et fait partie des outils validés et disponibles pour mettre en évidence la biodisponibilité de ces contaminants dans le milieu naturel. Chez les invertébrés, les Vg ou Vg-like sont peu connues et caractérisées. A l'heure actuelle, la mesure de ces protéines se développe autour de deux approches. L'ELISA (« *enzyme link immunosorbent assay* ») est largement utilisée chez les vertébrés mais beaucoup moins chez les invertébrés par manque d'anticorps disponibles et du fait de sa faible transférabilité entre espèces. La méthode indirecte ALP (« *alkali-labile phosphate* ») est moins fiable mais demeure la plus répandue chez les invertébrés en raison de sa plus grande adaptabilité. Ces

approches ont été utilisées dans plusieurs études et ont permis de mettre en évidence que la synthèse des protéines *Vg-like* est sensible à l'exposition de PE chez les bivalves et les crustacés, ce qui revêt un intérêt croissant pour son utilisation comme biomarqueur en écotoxicologie (revu dans Matozzo *et al.*, 2008).

Un des challenges de l'écotoxicologie est le développement d'outils de diagnostic permettant une mise en place simple, robuste et à large échelle dans le cadre de réseaux de surveillance de la qualité des milieux aquatiques. L'utilisation de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS), se basant sur l'identification et la quantification de peptide(s) spécifique(s) de la protéine étudiée, constitue aujourd'hui une approche analytique alternative pour la mesure de biomarqueurs protéiques. Par exemple, Fortin et collaborateurs (2009) ont fait la preuve de concept de la possibilité d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem pour la quantification absolue d'un biomarqueur du cancer de la prostate. Récemment, ce type d'approche a été appréhendé en écotoxicologie pour le développement d'une méthodologie de mesure de la Vg chez plusieurs espèces de poissons (Banoub *et al.*, 2003 ; Cohen *et al.*, 2005 ; Wunschel *et al.*, 2005 ; Cohen *et al.*, 2006 ; Cohen *et al.*, 2009 ; Cohen & Banoub, 2010). Pour autant, la spectrométrie de masse n'a été actuellement que très peu utilisée chez les invertébrés.

Dans ce contexte, ce travail de thèse vise à développer la mesure de la Vg chez les invertébrés et à mettre au point des outils de diagnostic *in situ* de l'exposition à des PE chez une espèce dulçaquicole d'intérêt écologique, l'amphipode *Gammarus fossarum*. Notre démarche scientifique s'articule autour de quatre objectifs :

**[1] Développer un essai LC-MS/MS pour quantifier la Vg chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*.**

**[2] Evaluer l'intérêt de la spectrométrie de masse pour le développement d'une méthode de mesure de peptide(s) spécifique(s) de la Vg chez plusieurs groupes d'invertébrés d'intérêt écotoxicologique (mollusques, crustacés et insectes) ; ceci en tirant avantage des séquences Vg disponibles dans les banques génomiques (GenBank et EMBL).**

**[3] (a) Valider la fonction de cette protéine en étudiant l'évolution des quantités de Vg au cours de la vitellogenèse et de l'embryogenèse ainsi que les différences inter-sexe chez *Gammarus fossarum* et (b) Evaluer l'intérêt de la mesure de la Vg comme biomarqueur spécifique d'exposition à des PE chez les mâles dans le cadre d'expositions à des contaminants modèles et sur le terrain**

**[4] Evaluer l'intérêt de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez les femelles (*Gammarus fossarum*) dans le cadre d'expérimentations au laboratoire et *in situ*.**

Ce manuscrit se structure en cinq chapitres. Le **Chapitre 1** est consacré à une synthèse bibliographique des connaissances relatives à l'endocrinologie, la perturbation endocrinienne ainsi qu'aux outils de diagnostic d'une exposition à des PE, principalement chez les crustacés. Ce chapitre présente également l'espèce modèle choisie pour ces travaux, l'amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum*. Le **Chapitre 2** détaille les méthodes expérimentales mises en oeuvre pour répondre aux quatre objectifs que nous nous sommes fixés. Les Chapitres 3, 4 et 5, présentent l'ensemble des résultats obtenus sous forme d'une note et de publications. Le **Chapitre 3** se focalise sur le développement et la validation d'un essai LC-MS/MS chez *Gammarus fossarum* pour la mesure de la Vg ; puis, dans un second temps, sur le potentiel de généralisation de ce type d'essai chez plusieurs invertébrés modèles. Le **Chapitre 4** se focalise sur l'étude du biomarqueur Vg en terme de validation fonctionnelle, de variabilité intrinsèque et d'application dans le cadre d'expérimentations au laboratoire et sur le terrain afin d'évaluer la sensibilité et la pertinence de cette approche chez le mâle. Le **Chapitre 5** se focalise sur l'étude de la perturbation endocrinienne chez les femelles, ceci dans des scénarios d'exposition au laboratoire et sur le terrain. Enfin, le **Chapitre 6** est une discussion générale des principaux résultats obtenus au cours du présent travail de thèse. Ce mémoire de thèse est clôturé par une conclusion générale ouvrant sur un certain nombre de perspectives à ce travail.



# CHAPITRE I

## 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---

1.1. Phylogénie et endocrinologie

1.2. Perturbateurs endocriniens : effets et outils de diagnostic

1.3. Modèle biologique: *Gammarus fossarum*

1.4. Objectifs

---



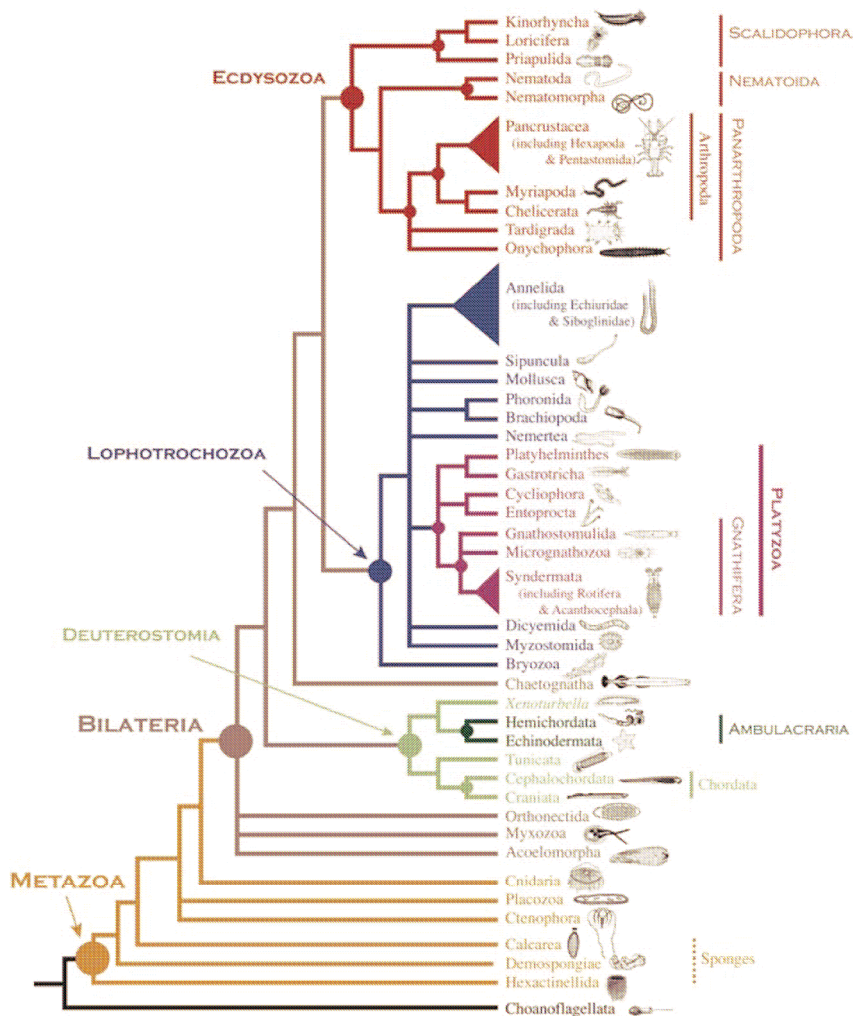


## 1.1. PHYLOGENIE ET ENDOCRINOLOGIE

### 1.1.1. Phylogénie et signalisation hormonale des métazoaires

La classification phylogénétique des métazoaires (*i.e.*, eucaryotes pluricellulaires hétérotrophes) est basée sur un ensemble d'hypothèses reposant sur les relations de parenté entre les espèces animales et la chronologie d'acquisition de certains traits de caractères. Nous prendrons ici comme exemple une classification récente basée sur les connaissances actuelles de la phylogénie des métazoaires (proposée par Halanych, 2004) qui s'appuie sur des données moléculaires (*i.e.*, une analyse comparative de séquences génomiques). Cette synthèse illustre la diversité spécifique et est présentée sur la **Figure 1.1**. Les invertébrés (ici, les métazoaires dépourvus de colonne vertébrale) constituent un groupe paraphylétique qui diverge très tôt au cours de l'évolution des métazoaires (apparus il y a environ 800 millions d'années) et occupent plusieurs embranchements : [1] l'ensemble des métazoaires non-bilatériens avec l'embranchement des cnidaires (*e.g.*, méduses, coraux et anémones) et les embranchements d'éponges et [2] la majorité des métazoaires bilatériens avec l'ensemble de la lignée des protostomiens constituée des clades des lophotrochozoaires (*e.g.*, mollusques et annélides) et des ecdysozoaires (*e.g.*, arthropodes et nématodes) et la lignée des deutérostomiens (*e.g.*, chordés et échinodermes), à l'exception donc du groupe des vertébrés (appartenant à l'embranchement des chordés, sous-embranchement des craniés). Les invertébrés regroupent la grande majorité des métazoaires et occupent une grande diversité d'habitats, avec notamment les insectes et les crustacés qui sont respectivement les principaux représentants des écosystèmes terrestres et aquatiques.

L'occupation de nombreuses niches écologiques par les invertébrés est la résultante de longs processus évolutifs et adaptatifs opérés depuis plusieurs millions d'années et qui sont à l'origine d'une grande diversité spécifique au niveau morpho-anatomique, biologique, physiologique et moléculaire. Cette diversité se traduit également par une importante divergence moléculaire ayant, par exemple, des conséquences directes sur les stratégies de régulation endocrinienne qui coordonnent les fonctions physiologiques telles que la reproduction. En effet, comme il a été illustré pour les voies de signalisation des hormones stéroïdes (Thornton, 2003 ; Markov *et al.*, 2009), la vision moderne des systèmes endocriniens des métazoaires résulte d'une évolution complexe des intervenants moléculaires tels que les récepteurs hormonaux et les enzymes impliquées dans la synthèse des hormones. Cette évolution biologique est à l'origine de la divergence des systèmes endocriniens entre les principales lignées de métazoaires ; celles-ci présentant des modes de régulation hormonale spécifiques, notamment au niveau de la reproduction.

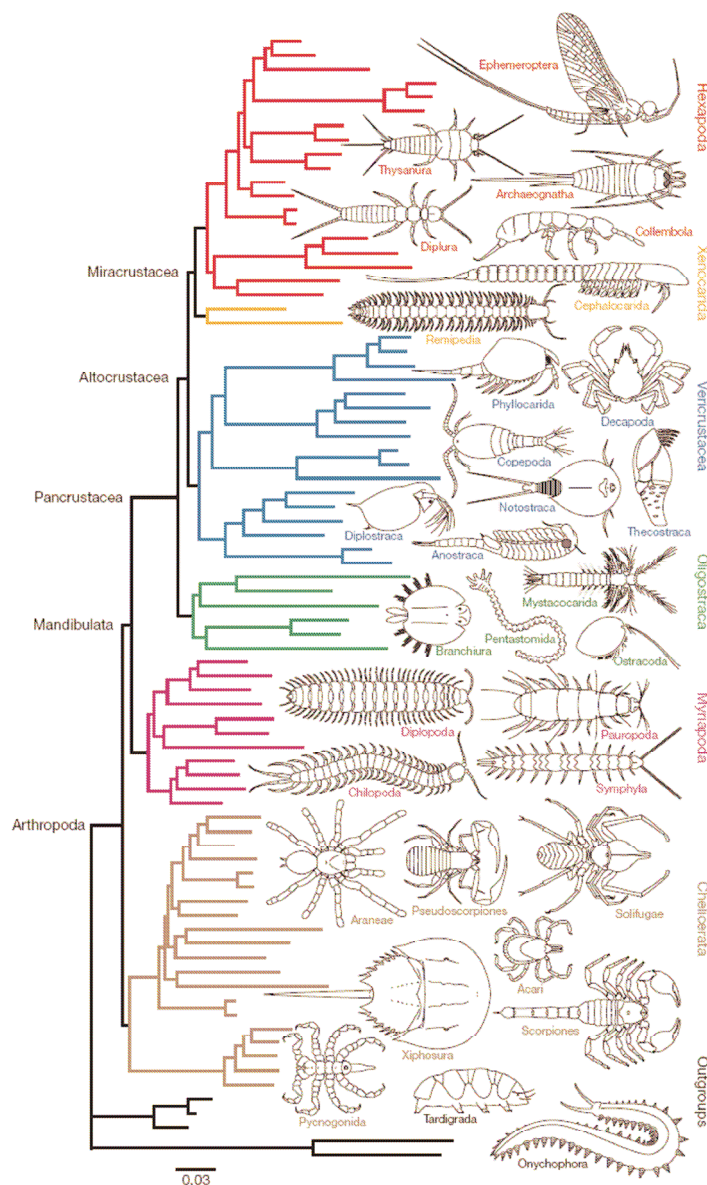


**Figure 1.1. Vue moderne de la phylogénie animale basée sur des données moléculaires (d’après Halanych, 2004).**

D’une manière générale, les deutérostomiens (incluant les vertébrés) utilisent des stéroïdes (e.g., androgènes, oestrogènes et progestogènes) en terminaison des cascades neuro-hormonales. Bien que la croissance, la reproduction, le développement et d’autres aspects de la physiologie des invertébrés soient sous contrôle hormonal, les hormones produites et utilisées chez les invertébrés ne sont pas directement analogues de celles des vertébrés, en particulier chez les arthropodes. Au sein des protostomiens, les lophotrochozoaires utilisent principalement des neuropeptides ainsi que des stéroïdes de type vertébré (appelés par commodité « *vertebrostéroïdes* » dans ce manuscrit), alors que les ecdysozoaires se caractérisent par l’utilisation de neurohormones spécifiques, d’ecdystéroïdes et de terpénoïdes (revu dans Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003 ; Janer & Porte, 2007 ; Lafont & Mathieu, 2007 ; LeBlanc, 2007 ; Nagaraju, 2007 ; Mazurová *et al.*, 2008 ; Mykles, 2011 ; Webster *et al.*, 2012).

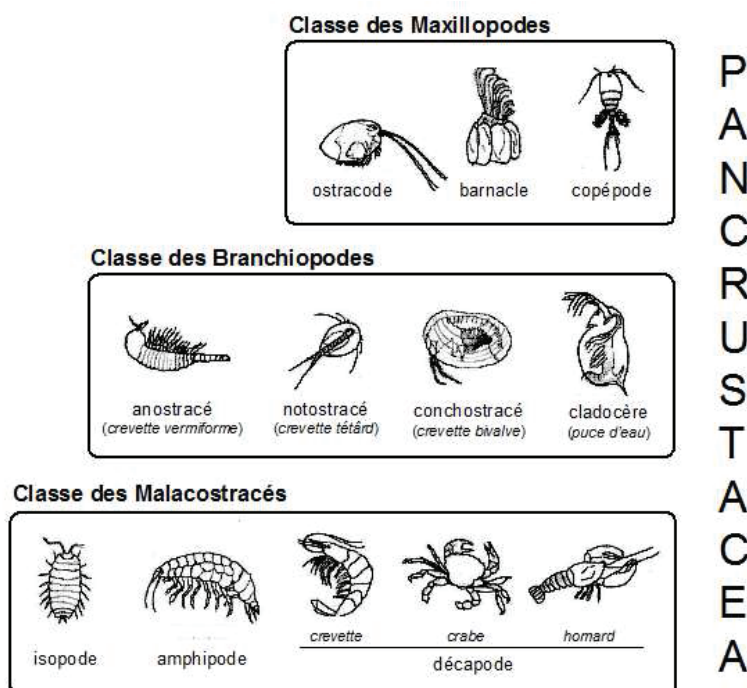
### 1.1.2. Systématique des ecdysozoaires et place des crustacés

Les ecdysozoaires sont des invertébrés bilatériens à squelette externe (formé d'une cuticule) dont le développement s'effectue par une ou plusieurs mues successives. Les ecdysozoaires sont divisés en trois super-embranchements : les scalidophores (e.g., vers marins et loricifères), les nématoidés (e.g., nématodes) et les panarthropodes (e.g., tardigrades, onychophores et arthropodes). L'embranchement le plus représenté en nombre d'espèces est celui des arthropodes qui regroupe principalement les chélicérates (e.g., scorpions, araignées et tiques), les insectes et les crustacés. La **Figure 1.2** est une classification récente des arthropodes qui illustre bien la variété taxonomique de cet embranchement avec les insectes et les crustacés regroupés dans le sous-embranchement des Pancrustacés.



**Figure 1.2.** Classification et diversité taxonomique au sein de l'embranchement des arthropodes (d'après Regier *et al.*, 2010).

Le sous-embranchement des Pancrustacés est apparu il y a entre 400 et 500 millions d'années et présente plus de 66 000 espèces de crustacés (incluant les clades *Xenocardia*, *Vericrustacea* et *Oligostracea*) majoritaires dans les écosystèmes aquatiques, et qui fournissent de nombreux services écologiques (e.g., importante biomasse dans les réseaux trophiques, redistribution de la matière organique, etc.) et économiques (e.g., production de chitine, alimentation, etc.). Les crustacés sont divisés en plusieurs classes, avec notamment les branchiopodes, les maxillopodes et les malacostracés qui présentent une importante diversité de formes et de stratégies adaptatives (**Figure 1.3**). Ainsi, au sein même de cet ensemble d'espèces, des divergences de régulation endocrinienne entre taxons peuvent être suspectées (LeBlanc, 2007).



**Figure 1.3.** Morphologies des trois grandes classes de crustacés du sous-embranchement des Pancrustacés : les branchiopodes, les maxillopodes et les malacostracés (modifié de LeBlanc, 2007).

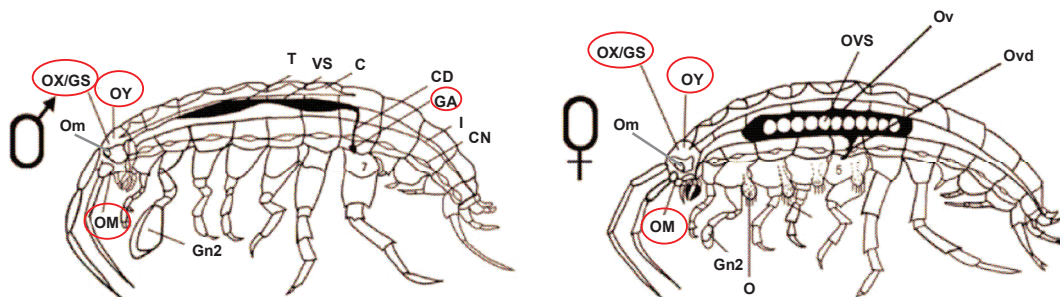
### 1.1.3. Endocrinologie des crustacés

L'endocrinologie des crustacés a fait l'objet de plusieurs synthèses bibliographiques (e.g., Laufer & Downer, 1988 ; Fingerman, 1997 ; LeBlanc *et al.*, 1999 ; LeBlanc, 2007 ; Rodríguez *et al.*, 2007 ; Mazurová *et al.*, 2008 ; Hyne, 2011). Cependant, la majeure partie de ces connaissances a été obtenue à partir d'expérimentations effectuées chez des espèces appartenant à la classe des malacostracés. Parmi cette classe, les décapodes (e.g., crabes, homards, langoustes, écrevisses et crevettes) ont été, de loin, le groupe le plus étudié, en raison de leur valeur économique et de leur grande taille (ce qui facilite les expérimentations).

### 1.1.3.1. Fonctionnement et anatomie du système endocrinien

La régulation endocrinienne repose sur l'interaction entre le système nerveux et le système endocrinien au travers de cascades hormonales impliquant des rétrocontrôles (positif ou négatif). Lorsqu'un stimulus physiologique ou environnemental est perçu au niveau du système nerveux central, des neurotransmetteurs et des neuromodulateurs régulent la sécrétion de neuro-hormones dans les voies circulatoires. Ces neuro-hormones régulent à leur tour la synthèse d'hormones au niveau des glandes endocriniennes et/ou interviennent directement dans le contrôle de la fonction physiologique ciblée. La réponse physiologique obtenue au niveau des multiples sites d'action dépend alors de l'équilibre atteint entre les différents médiateurs chimiques libérés.

Chez les crustacés, au moins quatre classes d'hormones ou de neuro-hormones (ecdystéroïdes, terpénoïdes, (neuro)peptides et monoamines) sont impliquées dans la régulation de la différenciation sexuelle, du développement, de la croissance, de la mue, de la gamétogenèse et de la vitellogenèse ; et ceci au travers de mécanismes très complexes et pas complètement caractérisés. Toutefois, quatre principaux sites ont été identifiés comme étant impliqués dans la régulation hormonale chez ces organismes : [1] le complexe « organe x / glande du sinus », [2] l'organe Y, [3] l'organe mandibulaire qui sont communs au mâle et à la femelle, et enfin [4] la glande androgène présente uniquement chez le mâle (Figure 1.4).



**Figure 1.4.** Schéma d'une vue latérale d'amphipode mâle (♂) et femelle (♀) du sous-ordre des *Gammaridea* indiquant la position des principaux centres de régulation endocrinienne (modifié de Hyne, 2011).

Les centres de la régulation endocrinienne sont entourés. C : cœur ; CD : canal déférent ; CN : chaîne nerveuse ; GA : glande androgène ; Gn2 : gnathopode secondaire ; I : intestin ; O : oostégite ; OM : organe mandibulaire ; Om : ommatidies ; OSV : ovocytes en vitellogenèse secondaire ; Ov : ovaire ; Ovd : oviducte ; OX/GS : organe X / glande du sinus ; OY : organe Y ; T : testicule ; VS : vésicule séminale

#### 1.1.3.1.1. Le complexe « organe X / glande du sinus » et les neurohormones

Le complexe « organe X / glande du sinus » (OX/GS), une glande épithélioïde, est le principal site de contrôle neuro-endocrinien chez les crustacés malacostracés via la synthèse et l'émission de neuro-

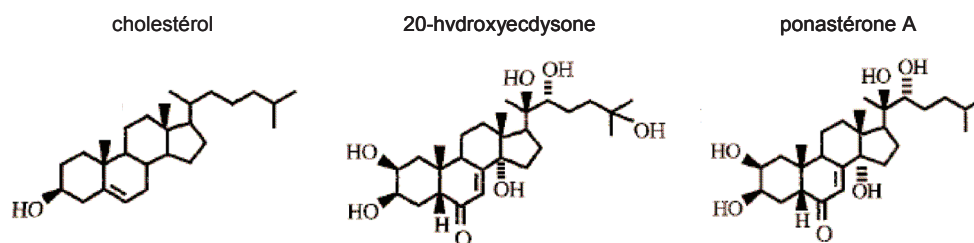
hormones (Webster *et al.*, 2012). Le complexe OX/GS est localisé dans les pédoncules oculaires chez les décapodes. Chez les taxons qui possèdent des yeux sessiles tels que les amphipodes, le complexe OX/GS est positionné en périphérie du cerveau, sur le pourtour des lobes optiques (Blanchet-Tournier, 1980 *et littérature associée*). L'organe X (OX) est formé de cellules neuro-sécrétrices dont les terminaisons axonales se regroupent au niveau de la glande du sinus (GS). Cette dernière est un organe neurohémal qui est adjacent à de grandes lacunes hémolymphatiques (Hanström, 1926). Par analogie, le complexe OX/GS est l'équivalent fonctionnel du complexe « cellules neurosécrétrices / corps cardiaque » des insectes ou encore de l'axe « hypothalamo-neurohypophysaire » des vertébrés. Le complexe OX/GS est le site de synthèse et de diffusion dans le système circulatoire de neuro-hormones peptidiques de la super-famille des hormones hyperglycémiantes (CHH) qui ont des fonctions multiples comme le contrôle de la reproduction, de la mue ou encore du métabolisme, et de l'osmorégulation (revu dans Webster *et al.*, 2012). Les membres de la super-famille des CHH regroupent plusieurs neuropeptides : CHH ; les peptides transporteurs d'ions (ITP) ; l'hormone inhibitrice de la mue (MIH) ; l'hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire (MOIH) ; l'hormone inhibitrice de la vitellogenèse (VIH) ; l'hormone inhibitrice de la gonade (GIH) (revu dans Nakatsuji *et al.*, 2009 et Webster *et al.*, 2012).

Les monoamines telles que la sérotonine (5-hydroxytryptamine), la dopamine et l'octopamine, ont été détectées dans le complexe OX/GS mais aussi dans le cerveau et le ganglion thoracique (Cooke & Sullivan, 1982 ; Nagaraju, 2011). Les monoamines ont été considérées pendant longtemps comme de simples neurotransmetteurs. Cependant, les monoamines ont montré pouvoir agir comme de véritables neuro-hormones en étant diffusées dans l'hémolymphe (Cooke & Sullivan, 1982). Plusieurs études suggèrent que les monoamines sont impliquées dans la régulation de plusieurs mécanismes physiologiques tels que la reproduction (*e.g.*, développement des gonades), la croissance et le métabolisme (revu dans Fingerman *et al.*, 1998 ; Mazurová *et al.*, 2008 ; Nagaraju, 2011). Cependant, en dépit de leur implication dans la régulation endocrinienne, les modes d'action de ces médiateurs (directs ou indirects) sont encore mal connus et restent à élucider.

#### 1.1.3.1.2. L'organe Y et les ecdystéroïdes

L'organe Y (OY) est constitué d'une paire de glandes localisée dans les segments maxillaires au niveau du céphalothorax. Cet organe est l'équivalent des glandes de mue prothoraciques des insectes (revu par Lachaise *et al.*, 1993) et est à l'origine de la biosynthèse des hormones ecdystéroïdes. Les arthropodes synthétisent une grande diversité d'ecdystéroïdes (Lachaise *et al.*, 1993 ; Grieneisen, 1994). Les étapes de la biosynthèse des ecdystéroïdes chez les crustacés sont encore mal connues et semblent impliquer les mêmes enzymes que chez les insectes (revu dans Mykles, 2011). La production de ces hormones repose sur l'utilisation d'un précurseur, le cholestérol, qui n'est pas synthétisé *de novo* chez les arthropodes mais qui provient de l'alimentation (Spaziani *et al.*, 1989 ; Grieneisen, 1994 ; Spaziani *et al.*,

1999). Le cholestérol est fixé par des lipoprotéines dans l'hémolymphe puis est capté par l'organe Y (Spaziani & Kater, 1973 ; Spaziani *et al.*, 1989). L'accumulation du cholestérol constitue une étape importante dans la biosynthèse des ecdystéroïdes chez les crustacés (Watson & Spaziani, 1985 ; Spaziani *et al.*, 1989 ; Spaziani & Wang, 1993). Les études menées sur plusieurs espèces de décapodes, utilisant du cholestérol radiomarqué, montrent qu'il se transforme en ecdysone, 3-déhydroecdysone, 20-hydroxyecdysone, 25-déoxyecdysone, 3-déhydro-20-hydroxyecdysone et/ou ponastérone A (25-déoxy-20-hydroxyecdysone) (Spaziani & Kater, 1973 ; Willig & Keller, 1976 ; Lachaise *et al.*, 1989 ; Spaziani *et al.*, 1989 ; Rudolph & Spaziani, 1992). Les ecdystéroïdes sécrétés par l'organe Y sont ensuite convertis en 20-hydroxyecdysone (20HE), ponastérone A (PonA) et 3-déhydro-20-hydroxyecdysone qui sont les principales hormones retrouvées dans l'hémolymphe des crustacés décapodes (revu dans Mykles, 2011). La 20HE, surnommée l'hormone de mue, est la principale forme active connue parmi les ecdystéroïdes (avec la PonA) chez les crustacés (**Figure 1.5**). L'action de cette hormone (et d'autres ecdystéroïdes) est contrôlée par le récepteur à l'ecdystéroïde, qui est un hétérodimère composé des produits des gènes EcR (*Ecdysteroid Receptor*) et RXR/USP (*Retinoid X Receptor/Ultraspiracle*) chez les arthropodes (revu par Durica *et al.*, 1999 ; Hopkins *et al.*, 2008 ; Nakagawa & Henrich, 2009) et qui régule par exemple, les phénomènes relatifs à la mue chez les crustacés comme chez les insectes. Par ailleurs, le rôle des autres ecdystéroïdes comme la 3-déhydroecdysone et la 25-déoxyecdysone reste à déterminer (revu par Lachaise *et al.*, 1993). Le rôle des ecdystéroïdes, et en particulier du 20HE, sera abordé plus en détail dans la suite de cette synthèse.



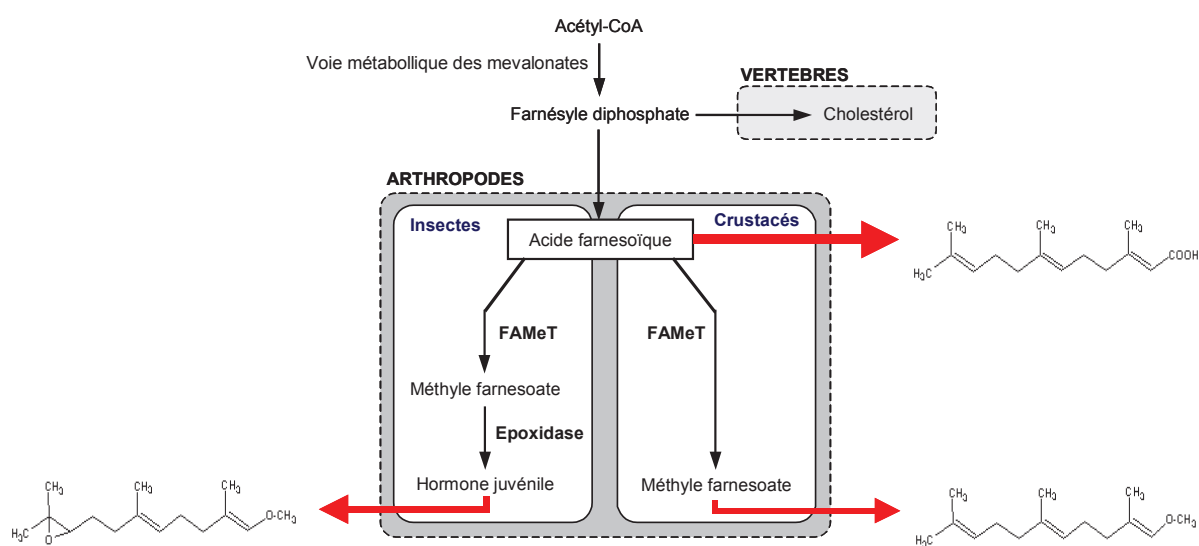
**Figure 1.5.** Structures chimiques du précurseur de la biosynthèse des ecdystéroïdes (cholestérol) et des deux principales formes actives (20-hydroxyecdysone et ponastérone A).

#### 1.1.3.1.3. L'organe mandibulaire et les terpénoïdes

L'organe mandibulaire (OM) est constitué d'une paire de glandes localisée, chez les décapodes, au niveau de la surface postérieure de l'apodème, à proximité du point d'attache des muscles mandibulaires postérieurs (revu dans Nagaraju, 2007). La position exacte de ces glandes chez les crustacés non-décapodes n'a pas été clairement établie. Chez les crustacés, l'OM est le site de synthèse de deux hormones (sesque)terpénoïdes : le méthyle-farnesoate (MF) et son précurseur, l'acide farnesoïque (AF) (Borst *et al.*, 1987 ; Laufer *et al.*, 1987 ; Nagaraju, 2007). Chez les insectes, l'AF et le MF sont les précurseurs de l'hormone juvénile (**Figure 1.6**) qui est impliquée dans le contrôle de la métamorphose et



qui n'a été retrouvée chez aucune espèce de crustacés (Tobe & Bendena, 1999). De façon générale, la biosynthèse des terpénoïdes, tels que l'AF, le MF et l'hormone juvénile semble être unique aux arthropodes (Tobe & Bendena, 1999 ; Bellés *et al.*, 2005). Dérivant de l'acétate, les unités farnésyle « C15 » sont formées chez toutes les espèces animales. Chez les vertébrés, ces unités empruntent la voie de production du cholestérol, alors que le diphosphate de farnésyle est transformé en AF chez les arthropodes (Hui *et al.*, 2010). Après sécrétion par l'OM, le méthyle-farnesoate est transporté par l'hémolymphe vers les tissus cibles à l'aide de lipoprotéines appelées « protéines de fixation du MF » (MFBP) qui ont été caractérisées chez plusieurs espèces de crustacés (revu dans Nagaraju, 2007). A l'instar des protéines fixant l'hormone juvénile chez les insectes (de Kort & Granger, 1996), les MFBP ont une grande affinité avec le MF qu'elles transportent et que l'on retrouve dans l'hémolymphe et les cellules des organes cibles des crustacés, notamment chez les décapodes (Prestwich *et al.*, 1990 ; King *et al.*, 1995 ; Takáč *et al.*, 1998). Le rôle des terpénoïdes, et en particulier du MF, sera abordé plus en détail dans la suite de cette synthèse.



**Figure 1.6.** Synthèse simplifiée des voies de synthèse des terpénoïdes chez les insectes et les crustacés. La voie métabolique des mévalonates est à l'origine de la production des vertébrostéroïdes chez les vertébrés et des terpénoïdes chez les arthropodes (modifié de Tobe & Bendena, 1999 ; Hui *et al.*, 2010).

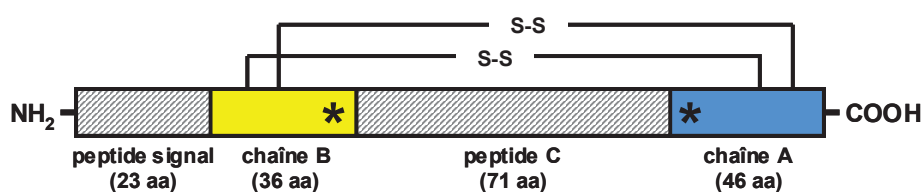
Les flèches rouges indiquent la sécrétion des terpénoïdes depuis les sites de synthèse respectifs chez les insectes et les crustacés. FAMEt : "farnesoic acid O-methyltransferase".

#### 1.1.3.1.4. Les glandes androgènes et l'hormone androgène

Les glandes androgènes (GA) sont attachées à la région sub-terminale des canaux déférents des testicules. Leur découverte date d'il y a plus de 60 ans chez le crabe *Callinectes sapidus* (Cronin, 1947). Ces glandes androgènes sont les uniques sites de synthèse de l'hormone androgène (HA) et sont

présentes uniquement chez les crustacés malacostracés. On peut noter que les femelles disposent de structures vestigiales et non fonctionnelles de la GA (tissus mésenchymatiques indifférenciés).

A l'inverse des ecdystéroïdes et des terpénoïdes qui sont des hormones de nature lipidique, l'HA est une hormone de nature protéique/peptidique incluant des sites de glycosylation (Juchault & Legrand, 1978 ; Okuno *et al.*, 1997 ; Martin *et al.*, 1999). Elle a été purifiée et analysée pour la première fois chez l'isopode *Armadillidium vulgare* et a une taille d'environ 17 kDa (Hasegawa *et al.*, 1987 ; Martin *et al.*, 1990). Le gène de l'HA a été isolé chez le décapode *Cherax quadricarinatus* et encode un précurseur protéique (préprohormone) constitué d'un peptide signal au niveau de la partie N-terminale, suivi d'une chaîne B, d'un peptide C et enfin d'une chaîne A au niveau de la partie C-terminale (**Figure 1.7**). Après clivage du peptide signal et du peptide C, la prohormone obtenue est constituée des chaînes A et B reliées entre elles à l'aide de ponts dissulfures. L'activation de cette prohormone en hormone intervient au cours de la glycosylation du peptide. Les récentes avancées suggèrent que le gène de l'hormone androgène, séquencé chez plusieurs espèces de décapodes, peut être regroupé dans la super-famille des gènes de l'insuline (« *insulin-like proteins* ») (revu dans Ventura *et al.*, 2011).



**Figure 1.7.** Représentation schématique de la structure de la préprohormone produite par la glande androgène chez le crabe *Cherax quadricarinatus* (modifié de Ventura *et al.*, 2011).

Après clivage du peptide signal et du peptide C, l'hormone androgène est constituée des chaînes A et B reliées entre elles par deux ponts dissulfures (S-S) et glycosylée sur des sites spécifiques (étoiles).

Les premiers essais montrent que l'HA partiellement purifiée déclenche un processus de masculinisation des femelles exposées jusqu'à une transformation complète et fonctionnelle du système reproducteur chez l'isopode *A. vulgare* (Katakura *et al.*, 1975 ; Hasegawa *et al.*, 1987). Plus récemment, le blocage de l'expression du gène de l'hormone androgène (à l'aide d'ARN interférant) chez le crabe *C. quadricarinatus* a pour conséquence de réduire la production de spermatozoïdes, de provoquer une dégénérescence des testicules et d'activer le processus de vitellogenèse (Rosen *et al.*, 2010).

Pour bien comprendre la fonction de la GA, les expériences d'ovariectomie et d'androgènectomie menées chez plusieurs espèces de crustacés, incluant amphipode, isopode et décapodes, montrent d'une manière générale que [1] l'ablation de la GA transforme le mâle en femelle, [2] l'implantation de la GA transforme la femelle en mâle, [3] ces transformations sont réversibles, et [4] enfin, l'implantation d'ovaire chez le mâle n'a aucun effet (revu dans Ford, 2008). L'HA est donc l'hormone responsable de la différenciation sexuelle des individus génétiquement mâles et du maintien de leurs caractères sexuels primaires et secondaires (Charniaux-Cotton, 1954a, 1965 ; Laufer *et al.*, 1987).

En conclusion, les crustacés sont définis comme étant des femelles « par défaut » puisque l'expression des caractères sexuels secondaires « mâle » est due à la production de l'HA (revu dans Ford, 2008 ; Ventura *et al.*, 2011). Il est important de souligner que les crustacés ont développé des stratégies de différenciation sexuelle et de maintien des caractères sexuels qui leur sont propres (*i.e.*, sous contrôle de la GA) et qui contrastent fortement avec les stratégies « *vertébrés* », celles-ci étant basées sur le maintien d'un déséquilibre des teneurs en vertebrostéroïdes sexuels mâle et femelle (Norris & Carr, 2006).

### 1.1.3.2. Les hormones vertebrostéroïdes

De nombreuses hormones vertebrostéroïdes ont été identifiées chez les invertébrés et en particulier celles ayant un rôle fonctionnel dans les processus de reproduction (androgènes, oestrogènes et progestines). La revue de Janer & Porte (2007) fait le point sur les études ayant détecté ces hormones chez plusieurs grands groupes d'invertébrés (échinodermes, mollusques et crustacés) en précisant les quantités mesurées ainsi que les matrices biologiques testées (organisme entier, organe et/ou fluide corporel). Cependant, la présence de ces vertebrostéroïdes chez un organisme ne constitue en rien une preuve suffisante pour savoir si ces molécules ont un rôle hormonal (Lafont & Mathieu, 2007). En effet, la présence de ces vertebrostéroïdes pourrait provenir de la nourriture, principalement au travers des plantes qui représentent une source environnementale de molécules analogues aux vertebrostéroïdes (Milanesi *et al.*, 2001). Afin d'évaluer si ces molécules jouent un rôle physiologique, il semble fondamental de vérifier [1] l'évolution des teneurs en lien avec les processus physiologiques, [2] la présence des enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse de stéroïdes et/ou [3] la présence de récepteurs spécifiques (nucléaires ou membranaires) :

- [1] Plusieurs études ont montré la présence (et l'absence) d'effets de l'exposition à des vertebrostéroïdes sexuels sur les processus physiologiques en lien avec le métabolisme des hormones sexuelles, la reproduction (ovogenèse et vitellogenèse) et le développement embryonnaire (revu dans Mazurová *et al.*, 2008 ; Nagaraju, 2011 ; Subramoniam, 2011). Malgré les nombreuses études rapportant la présence de vertebrostéroïdes et leurs effets potentiels (bien qu'ambigus), les mécanismes d'action sous-jacents sont peu étudiés et caractérisés chez les crustacés (et les protostomiens en général). Toutefois, le rôle de régulation des hormones vertebrostéroïdes n'apparaît pas comme une évidence dans la reproduction des crustacés. Par exemple, les niveaux de testostérone, de progestérone et d'oestradiol ne varient pas significativement au cours du cycle ovarien chez les décapodes (revu dans Mazurová *et al.*, 2008).
- [2] Chez les lophotrochozoaires (*e.g.*, mollusques) et les deuterostomiens (*e.g.*, échinodermes et vertébrés), les étapes clés de la stéroïdogénèse ont été bien décrites et montrent la présence

des enzymes requises pour la synthèse *de novo* de la progestérone, la testostérone et l'oestradiol à partir du cholestérol (revu dans Janer & Porte, 2007 ; Lafont & Mathieu, 2007). En revanche, chez les crustacés, seules quelques étapes de la stéroïdogénèse ont pu être identifiées (Janer & Porte, 2007). Ceci pourrait être une première indication que les crustacés ne synthétisent pas activement les vertebrostéroïdes.

- [3] Chez les invertébrés protostomiens, les récepteurs à l'oestrogène semblent avoir évolué seulement chez les lophotrochozoaires (Baker & Chandsawangbhuwana, 2008 dans Hannas, 2011). Le récepteur à l'oestrogène des lophotrochozoaires ne semble pas fixer l'oestrogène (Kajiwara *et al.*, 2006 ; Keay *et al.*, 2006) ; toutefois l'oestrogène pourrait agir par des voies non génomiques (Janer & Porte, 2007). Chez les crustacés, le récepteur à l'oestrogène n'a pas encore été identifié (*e.g.*, génome de la daphnie, Thomson *et al.*, 2009) et les oestrogènes n'ont pas de fonction reconnue chez les insectes (De Loof & Huybrechts, 1998 dans Hannas, 2011).

Bien que le rôle des vertebrostéroïdes soit encore débattu chez les invertébrés lophotrochozoaires et deuterostomiens, de nombreux éléments semblent confirmer que les vertebrostéroïdes jouent un rôle dans la régulation endocrinienne de mécanismes physiologiques tels que la reproduction et la différenciation sexuelle (LeBlanc *et al.*, 1999 ; Janer & Porte, 2007 *et littérature citée*). En revanche, chez les ecdysozoaires, beaucoup d'éléments tendent à confirmer qu'ils ont une régulation endocrinienne contrastée et bien distincte des lophotrochozoaires et des deuterostomiens. Malgré le fait que la présence d'hormones vertebrostéroïdes chez les crustacés soit avérée et que leurs effets sur la reproduction aient été montrés dans certaines études, rien n'indique qu'elles aient les mêmes mécanismes d'action et de régulation que chez les vertébrés (Janer & Porte, 2007). Enfin, même si le débat sur le rôle des vertebrostéroïdes reste ouvert, les connaissances de la régulation des mécanismes physiologiques tels que la mue, la différenciation sexuelle et la gamétogenèse repose d'avantage sur l'action des ecdystéroïdes, des terpénoïdes et des neuro-hormones associée à des récepteurs nucléaires spécifiques tels que le récepteur EcR. La partie suivante propose de décrire succinctement les mécanismes de contrôle de ces processus physiologiques chez les crustacés (la mue, la différenciation sexuelle et la gamétogenèse).

### 1.1.3.3. Régulation hormonale des processus physiologiques

#### 1.1.3.3.1. La mue

Les arthropodes possèdent un exosquelette rigide et inextensible dont ils doivent régulièrement se défaire afin de pouvoir croître (*i.e.*, mue de croissance) ou changer de forme (*i.e.*, mue de métamorphose chez les insectes et les crustacés décapodes). Ces organismes ont une croissance discontinue, rythmée

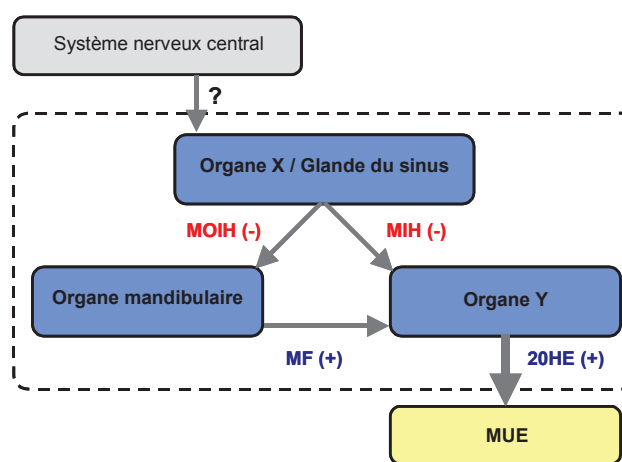
par une succession de mues au cours desquelles ils renouvellent leur cuticule. Le cycle d'(inter-)mue chez les crustacés a été défini pour la première fois comme une série de transformations réalisées dans un intervalle de temps qui sépare deux mues (Drach, 1939). Quatre grandes étapes peuvent être distinguées : [1] la post-mue est une période durant laquelle l'organisme qui vient de muer croît, avant d'augmenter la rigidité de sa cuticule qui n'est alors composée que d'une matrice de chitine molle, flexible et transparente ; [2] l'inter-mue correspond à la période de stabilité tégumentaire ; [3] la pré-mue débute par la séparation entre l'épiderme et l'ancienne cuticule (*i.e.*, l'apolyse). L'organisme sécrète ensuite une nouvelle cuticule afin de remplacer l'ancienne et aboutit à [4] l'exuviation qui est l'événement final du cycle de mue correspondant strictement au moment du rejet de l'ancienne cuticule (Drach & Tchernigovtzeff, 1967 ; Lachaise *et al.*, 1993 ; Hyne, 2011).

Le cycle de mue a une place prépondérante dans la reproduction de la plupart des groupes de crustacés et particulièrement chez les Péracarides (*e.g.*, amphipodes, isopodes et mysidacés). Chez ces derniers, la maturation des ovocytes dans les gonades se déroule simultanément avec le développement des embryons dans la poche marsupiale externe (marsupium) ; ces deux événements sont fortement coordonnés avec le cycle de mue et nécessitent une parfaite synchronisation (Hyne, 2011). D'une part, la coordination de l'exuviation avec le cycle de maturation des ovocytes (ovogenèse) facilite le passage des oeufs dans le marsupium via l'oviducte puisque le nouvel exosquelette est suffisamment flexible pour permettre la ponte (Hyne, 2011). L'ovogenèse est un processus reproductif au cours duquel les ovocytes grossissent à cause de la production et de l'accumulation de Vg dans les oeufs (Charniaux-cotton, 1985). Les cycles ovariens et de reproduction sont étroitement liés avec le cycle de mue et l'accouplement parce que la capacité des femelles à ovuler et à s'accoupler est restreinte à la période suivant l'exuviation (Hyne, 2011 ; Subramoniam, 2000, 2011). D'autre part, l'intégralité du développement embryo-larvaire jusqu'à l'éclosion des juvéniles (embryogenèse), qui se déroule dans le marsupium, est également liée avec le cycle de mue. En effet, la mue et la ponte des femelles interviennent seulement après l'éclosion des embryons dans le marsupium (Subramoniam, 2000). Enfin, il est impossible pour une femelle d'assurer le développement des embryons à terme si elle doit muer et pondre entre temps (Subramoniam, 2000).

La **Figure 1.8** (ci-contre) propose un schéma récapitulatif des cascades hormonales mises en oeuvre dans le cadre du contrôle endocrinien de la mue.

Chez les arthropodes, le cycle de mue est sous le contrôle direct des ecdystéroïdes sécrétés par l'OY (Lachaise *et al.*, 1993 ; LeBlanc *et al.*, 1999). De façon générale, les niveaux d'ecdystéroïdes chez les crustacés sont faibles durant la période de poste-mue et d'inter-mue tandis que, pendant la période de pré-mue, les concentrations hémolymphatiques augmentent et atteignent un pic juste avant l'exuviation, initiant ainsi les processus de préparation à la mue (*i.e.*, l'apolyse et la production d'une nouvelle cuticule) (revu dans Mykles, 2011). Cette augmentation des teneurs en ecdystéroïdes est suivie par une diminution rapide qui déclenche l'exuviation.

La sécrétion d'ecdysone par l'OY est sous le contrôle négatif d'un neuropeptide sécrété par le complexe OX/GS, l'hormone inhibitrice de la mue (MIH) (revu par Lachaise *et al.*, 1993). La concentration de MIH circulante reste constante au cours du cycle de mue, excepté un fort déclin durant les premières phases de la pré-mue (Nakatsuji & Sonobe, 2004) impliquant la synthèse et l'augmentation de 20-hydroxyecdysone dans l'hémolymphe. L'ablation des pédoncules oculaires chez les décapodes ou la cautérisation de la partie médiane du protocérébron chez les isopodes (l'équivalent de l'OX des décapodes), induit une augmentation des teneurs en ecdystéroïdes hémolymphatiques entraînant une exuviation précoce. Inversement, l'administration d'extraits de glande du sinus ou de MIH purifiée inhibe la sécrétion d'ecdystéroïdes par l'OY (revu par Lachaise *et al.*, 1993).



**Figure 1.8.** Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule les processus de la mue chez les crustacés (modifié de Xuereb, 2009a et Hyne, 2011).

(+) indique un contrôle positif, (-) un contrôle négatif et (?) une action suspectée mais pas encore clairement établie. 20HE : 20-hydroxyecdysone ; MF : méthyle-farnesoate ; MIH : hormone inhibitrice de la mue ; MOIH : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire.

Bien que controversés, certains travaux suggèrent l'existence d'une neuro-hormone stimulatrice : l'hormone stimulatrice de l'OY (YSH, «Y-organe stimulating Hormone») chez les amphipodes et les isopodes (Blanchet-Tournier, 1980 *et littérature associée*). Cette hormone agirait positivement sur l'OY, stimulant la sécrétion de 20-hydroxyecdysone. En effet, certains auteurs ont constaté que la destruction de la partie médiane du protocérébron se traduisait, chez certaines espèces d'amphipodes et d'isopodes, par un allongement du cycle de mue (Blanchet-Tournier, 1980 *et littérature associée*).

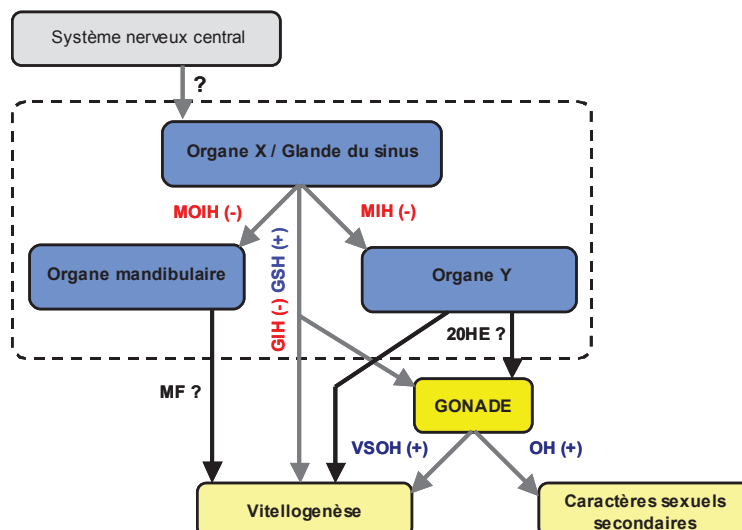
Plusieurs études tendent à prouver que le cycle de mue est également sous le contrôle positif de l'OM chez certains crustacés (revu par Homola & Chang, 1997 ; Nagaraju *et al.*, 2003). En effet, le méthyle-farnesoate (MF) a été utilisé pour induire, lors d'expérimentations *in vitro*, la sécrétion d'ecdysone par l'OY. A l'instar de l'ecdysone, les niveaux hémolymphatiques de MF fluctuent durant le cycle de mue. Les concentrations maximales sont généralement enregistrées durant les premières phases de la pré-mue,

précédant le pic d'ecdystéroïde. Les niveaux les plus bas coïncident avec les derniers stades de pré-mue, peu avant l'exuviation (Mykles, 2011). L'administration de MF entraîne une accélération des phénomènes de mue chez un grand nombre d'espèces (revu dans Nagaraju, 2007). Néanmoins, l'implication du MF dans le contrôle du cycle de mue peut varier d'une espèce à l'autre : par exemple, chez les femelles adulte *Homarus americanus*, l'ablation de l'organe mandibulaire semble ne pas avoir de répercussions sur le bon déroulement du cycle de mue (Byard, 1975). Des travaux complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer l'implication du MF dans la régulation des mécanismes physiologiques tels que la mue.

Au même titre que pour l'OY, l'activité de synthèse et de sécrétion de l'OM est négativement régulée par un neuropeptide sécrété au niveau du complexe OX/GS, l'hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire (MOIH) (revu par Homola & Chang, 1997 ; Borst *et al.*, 2001 ; Nagaraju *et al.*, 2003 ; Nagaraju, 2007). Cependant, les fluctuations des concentrations *in vivo* de MOIH circulante sont difficiles à déterminer et restent à étudier pour mieux comprendre son rôle physiologique (Nagaraju, 2007).

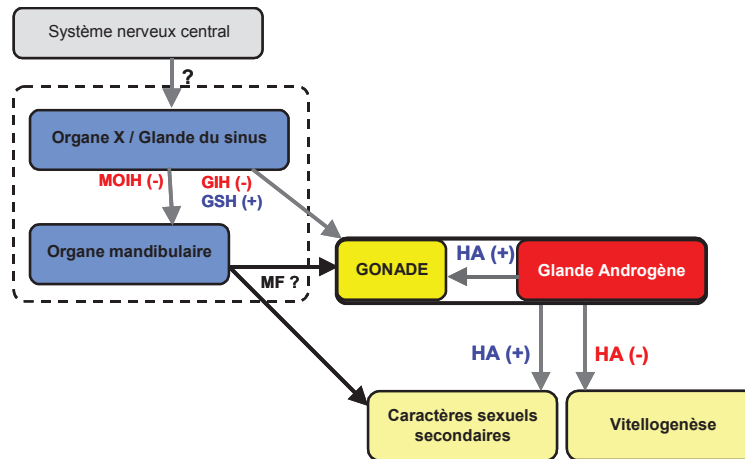
#### 1.1.3.3.2. La différenciation sexuelle et la gamétogenèse

Les deux figures suivantes proposent un schéma récapitulatif des cascades hormonales mises en oeuvre dans le cadre du contrôle endocrinien de la différenciation sexuelle et de la gamétogenèse (détaillées ci-après) chez la femelle (**Figure 1.9**) et le mâle (**Figure 1.10**). Ces schémas correspondent à une synthèse des récentes revues sur la régulation endocrinienne de ces processus physiologiques chez les crustacés (e.g., Mazurová *et al.*, 2008 ; Hyne, 2011 ; Subramoniam, 2011 ; Ventura *et al.*, 2011 ; Webster *et al.*, 2012).



**Figure 1.9.** Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule la différenciation et la gamétogenèse chez les crustacés malacostracés femelles (modifié de Mazurová *et al.*, 2008 ; Xuereb, 2009b ; Hyne, 2011 ; Subramoniam, 2011).

(+) indique un contrôle positif, (-) un contrôle négatif et (?) une action suspectée, mais pas encore clairement établie. GIH : hormone gonado-inhibitrice ; GSH : hormone gonado-stimulatrice ; MF : méthyle-farnesoate ; MIH : hormone inhibitrice de la mue ; MOIH : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire ; OH : hormone ovarienne ; VSOH : hormone ovarienne stimulatrice de la vitellogénèse ; 20HE : 20-hydroxyecdysone



**Figure 1.10.** Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule la différenciation et la gamétogenèse chez les crustacés malacostracés mâles (modifié de Mazurová *et al.*, 2008 ; Xuereb, 2009b ; Hyne, 2011 ; Subramoniam, 2011).

Même légende que la Figure 1.9. ; HA : hormone androgène.

#### 1.1.3.3.2.1. La différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires

Les crustacés malacostracés sont principalement gonochoriques. A l'issue du développement embryon-larvaire, les juvéniles sont sexuellement indifférenciés. Les caractères sexuels primaires (*i.e.*, ovaires ou testicules) et secondaires (*i.e.*, caractères morphologiques externes) se développent au cours d'une succession de mues, selon une chronologie bien précise. Le contrôle hormonal de la différenciation sexuelle des crustacés malacostracés (revu par Charniaux-Cotton, 1965 ; Charniaux-Cotton & Payen, 1988) a été étudié pour la première fois chez l'amphipode *Orchestia gamarella* (Charniaux-Cotton, 1954a, 1954b, 1955). A l'origine de la différenciation sexuelle se trouve un organe clef, la glande androgène (GA) (*cf.* section 1.1.3.1.4 - Les glandes androgènes).

Chez les femelles, en l'absence de GA, les gonades se différencient spontanément en ovaires. En revanche, la formation des caractères sexuels secondaires permanents (*e.g.*, les oostégites) ou temporaires (*e.g.*, les longues soies bordant les oostégites durant les périodes de reproduction) chez les amphipodes, est régulée par des hormones ovariennes (OH), sécrétées par le follicule (Charniaux-Cotton, 1955). Des observations identiques ont été rapportées chez les isopodes ; en revanche, ces mécanismes n'ont pratiquement pas été étudiés chez les décapodes. De plus, la nature chimique de ces hormones ovariennes n'est actuellement pas connue.



Chez les organismes génétiquement mâles, la GA se développe et se maintient sous l'action positive d'une neuro-hormone gonado-stimulatrice (GSH- $\sigma^7$ ), également appelée hormone "génitalotrope mâle", sécrétée au niveau du proptocérébron. La GA libère l'HA qui induit la différenciation du testicule ainsi que des caractères sexuels secondaires mâles et réprime la synthèse de Vg.

Certains éléments suggèrent que les terpénoïdes pourraient également être impliqués dans les mécanismes de différenciation sexuelle. Chez les crabes araignées (*Libinia emarginata*), l'organe mandibulaire est plus développé et synthétise d'avantage de méthyle-farnesoate (MF) chez les mâles adultes que chez les mâles sexuellement immatures (Sagi *et al.*, 1993). Il a également été montré, chez d'autres décapodes, que l'injection de MF accélère le développement des testicules (Nagaraju *et al.*, 2003 ; Reddy *et al.*, 2004). En outre, une autre étude a rapporté que la GA du crabe *Carcinus maenas* est capable de synthétiser des terpénoïdes tels que le farnesylacétone et l'hexahydrofarnésylacétone, dont la structure est très proche de celle du MF (Férézou *et al.*, 1978). Enfin, plusieurs auteurs ont montré que, chez différentes espèces de daphnies, l'exposition de femelles au MF ou à des composés analogues, durant leur dernière phase de maturation ovarienne, entraîne une production anormale de jeunes mâles et favorise l'apparition de gynandromorphisme, contrairement aux organismes non traités qui ne produisaient que des femelles (Olmstead & LeBlanc, 2001a ; Olmstead & Leblanc, 2002, 2003 ; Tatarazako *et al.*, 2003 ; Rider *et al.*, 2005 ; Olmstead & LeBlanc, 2007).

#### 1.1.3.3.2.2. La gamétogenèse

Chez les femelles malacostracés, l'ovogenèse se déroule en deux étapes : la prévitellogenèse et la vitellogenèse secondaire (Charniaux-Cotton, 1973). La prévitellogenèse, également appelée vitellogenèse primaire, correspond au passage des ovogonies à l'état d'ovocytes primaires (*i.e.*, première phase de la méiose), avec notamment la mise en place du tissu folliculaire indispensable à l'accumulation du vitellus. La vitellogenèse secondaire est définie comme l'accumulation par l'ovocyte d'enclaves lipidiques et protéiques qui formeront à terme, le vitellus, vital pour les besoins nutritionnels des embryons en développement. La vitelline, une caroténo-lipo-protéine, est la composante majeure du vitellus.

La prévitellogenèse est un phénomène qui se déroule en continu et qui ne nécessite probablement aucun contrôle (Charniaux-Cotton, 1973). En revanche, la vitellogenèse secondaire qui n'a lieu que durant les périodes de reproduction, et qui doit être synchronisée avec le cycle de mue, est sous le contrôle de mécanismes hormonaux complexes (revu par Charniaux-Cotton & Payen, 1988 ; Fingerman *et al.*, 1998 ; LeBlanc & McLachlan, 1999).

En fonction des conditions environnementales, la libération de neuropeptides stimulateurs ou inhibiteurs contrôle le démarrage de la Vg. Durant les périodes de repos sexuel, celle-ci est inhibée par une neuro-hormone gonado-inhibitrice, l'hormone d'inhibition de la gonade ( « *Gonado-Inhibiting*

Hormone », GIH), également dénommée hormone d'inhibition de la vitellogenèse (« *Vitellogenesis-Inhibiting Hormone* », VIH). La GIH, synthétisée par le complexe OX / GS, inhibe la synthèse de la Vg (Tsutsui *et al.*, 2005 ; Ohira *et al.*, 2006) et bloque son interaction avec les récepteurs membranaires présents à la surface de l'ovocyte, empêchant ainsi l'endocytose (Charniaux-Cotton & Payen, 1988). A l'inverse, certaines études menées chez les décapodes suggèrent l'existence d'une neuro-hormone gonado-stimulatrice (GSH) produite par le ganglion thoracique qui initierait la vitellogenèse.

Il n'a pas été encore bien établi si les neuro-hormones exerçaient un contrôle direct et/ou indirect sur les processus de vitellogenèse. Chez les amphipodes, tout porte à croire que ce contrôle s'effectue par le biais d'une hormone ovarienne stimulatrice de la vitellogenèse (VSOH) (Charniaux-Cotton, 1954b). En effet, chez *Orchestia gammarella*, l'ablation des ovaires lors de la vitellogenèse secondaire provoque un arrêt de synthèse de Vg après quelques jours. Chez ces mêmes femelles, la synthèse de Vg est restaurée par la réimplantation d'un ovaire en vitellogenèse secondaire. Toutefois, la VSOH pourrait être une spécificité des amphipodes car le contrôle hormonal de la synthèse de Vg par l'ovaire n'a pas été caractérisé chez les décapodes. En effet, chez les décapodes, le méthyle-farnesoate (MF) a été décrit comme une hormone stimulatrice de la synthèse de Vg et de la maturation ovarienne (revu par Nagaraju *et al.*, 2003). Ainsi, il a été montré [1] que l'organe mandibulaire est plus actif et sécrète plus de MF durant le développement et la maturation des ovaires, [2] que l'implantation d'organe mandibulaire de femelles sexuellement actives stimule la croissance ovarienne chez les femelles immatures, [3] que l'administration de MF *in vivo* induit la synthèse de Vg et stimule la maturation des ovocytes, et [4] que le MF stimule la croissance d'ovocytes dans des ovaires cultivés *in vitro*.

Les ecdystéroïdes jouent également un rôle important dans le contrôle de la maturation ovarienne (revu par Charniaux-Cotton, 1973 ; Subramoniam, 2000). Diverses données permettent de penser que les faibles niveaux d'ecdystéroïdes observables en fin de pré-mue et début de post-mue sont un signal nécessaire au démarrage de la vitellogenèse, favorisant ainsi sa synchronisation avec le cycle de mue. Par exemple, Blanchet-Tournier (1980), rapporte que, chez l'amphipode *Orchestia gammarella*, l'injection de 20-hydroxyecdysone chez des femelles venant juste de muer empêche la nouvelle génération d'ovocytes d'entrer en vitellogenèse ; de même que la cautérisation de l'organe-Y inhibe la synthèse de Vg, ainsi que son incorporation au sein des ovocytes.

Chez les mâles malacostracés, l'activité spermatogénétique est régulée par le niveau d'hormone androgène sécrétée (Charniaux-Cotton & Payen, 1988). Durant la saison de reproduction, la glande androgène (GA) est bien développée et la spermatogénèse est intense. Durant les périodes de repos sexuel, la GA est plus petite et l'activité spermatogénétique du testicule est réduite. Il est à noter, qu'à cette occasion, la présence de cellules gonadiques femelles dans l'extrémité antérieure du testicule n'est pas rare.



## 1.2. PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : EFFETS & OUTILS DE DIAGNOSTIC

De façon générale, les études menées sur les PE dans l'environnement se focalisent plus particulièrement sur la régulation hormonale en lien avec la reproduction des organismes, étant donné son rôle crucial dans le maintien des populations. L'étude de la biodisponibilité et de l'impact des PE sur les vertébrés aquatiques, en particulier le poisson, a fait l'objet de nombreux projets et publications. En revanche, bien que les invertébrés représentent plus de 95% des espèces animales, peu d'études et par conséquent peu d'outils sont actuellement disponibles pour évaluer l'exposition et les effets des PE chez ces espèces. Pourtant, plusieurs travaux montrent que les crustacés semblent être la cible de PE. Cependant, tenant compte de la particularité de leur régulation hormonale, l'étude de l'impact des PE chez les invertébrés ne peut pas se contenter des informations obtenues à partir des travaux réalisés chez les vertébrés. Cette partie a pour objectif de rendre compte des avancées scientifiques concernant l'étude des PE chez les invertébrés, et plus généralement chez les crustacés, ainsi que les outils disponibles pour mesurer leurs effets.

### 1.2.1. L'étude des perturbateurs endocriniens chez les crustacés

L'étude des perturbations endocriniennes chez les crustacés s'articule autour de deux axes : [1] l'évaluation du risque environnemental que représentent les composés reconnus comme PE chez les vertébrés (*i.e.*, vertébrostéroïdes sexuels et leurs analogues de synthèse) et [2] l'étude de composés spécifiquement conçus pour interférer avec la régulation hormonale des insectes (*i.e.*, insecticides régulateurs de croissance), ceci dans le but d'évaluer leurs effets chez les crustacés, espèces non cibles qui, au même titre que les insectes, régulent leurs actions physiologiques via des ecdystéroïdes et des terpénoïdes. C'est également dans le but de faire progresser la compréhension de leur système hormonal et mieux cerner les mécanismes de perturbation endocrinienne.

#### 1.2.1.1. Perturbateurs endocriniens avérés chez les vertébrés

Chez les crustacés, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'impact de PE avérés chez les vertébrés ; ceux-ci incluent des hormones naturelles (androgènes, oestrogènes et progestines) et leurs analogues de synthèse (*e.g.*, 17 $\alpha$ -éthynylestradiol, un dérivé de synthèse de l'estradiol présent dans les pilules contraceptives), des polluants organiques (*e.g.*, HAP, PCB, plastifiants, alkylphénols, tensioactifs, pesticides, etc.) ou encore des métaux. Quelques exemples de ces travaux sont présentés dans le **Tableau 1.1** (commenté plus bas dans la section 1.2.2). La grande majorité de ces études s'est focalisée sur l'évaluation de l'impact de ces substances sur des réponses individuelles que sont la croissance, la reproduction ou la mue chez plusieurs groupes de crustacés, pour lesquels des bioessais chroniques ou standardisés sont disponibles. Ces études montrent que ces substances peuvent impacter : [1] le

développement embryonnaire et la croissance des juvéniles (*e.g.*, chez les copépodes : Brown *et al.*, 2003 ; Wollenberger *et al.*, 2003 ; Chandler *et al.*, 2004 ; Forget-Leray *et al.*, 2005 ; Wollenberger *et al.*, 2005 ; chez les cladocères : LeBlanc & McLachlan, 1999 ; LeBlanc *et al.*, 2000 ; Mu & Leblanc, 2002b, 2002a ; Zhang *et al.*, 2003 ; Mu & LeBlanc, 2004 ; chez les cyrripèdes : Billinghamurst *et al.*, 1998 ; Billinghamurst *et al.*, 2001 ; et chez les amphipodes : Blockwell *et al.*, 1996a ; Sundelin & Eriksson, 1998 ; Blockwell *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 1999), [2] la fécondité des femelles et la production de jeunes (*e.g.*, chez les copépodes Bejarano & Chandler, 2003 ; Brown *et al.*, 2003 ; Chandler *et al.*, 2004 ; Wollenberger, 2005 ; chez les cladocères : Baldwin *et al.*, 1995 ; Parks & LeBlanc, 1996 ; Wu *et al.*, 2001 ; Tatarazako *et al.*, 2002 ; et chez les amphipodes : Blockwell *et al.*, 1999 ; Sundelin *et al.*, 2000), et [3] dans une moindre mesure sur la durée des périodes de mue et la fréquence d'exuviation (*e.g.*, chez les cladocères : Baldwin *et al.*, 1995 ; Zou & Fingerman, 1997a, 1997b ; Baer & Owens, 1999 ; LeBlanc & McLachlan, 1999 ; Mu & Leblanc, 2002b, 2002a ; et les décapodes : Reddy *et al.*, 1982 ; Reddy & Rao, 1987 ; Greco *et al.*, 2001 ; Snyder & Mulder, 2001).

Dans un contexte d'évaluation du risque, ces études sont pertinentes pour évaluer la toxicité de ces substances pour un large nombre d'espèces vivant dans les milieux aquatiques. Cependant, l'apparition d'un effet nécessite dans la plupart des études de fortes concentrations d'exposition ; ceci relève plutôt d'une toxicité générique de ces substances plutôt que d'un mécanisme de perturbation endocrinienne (LeBlanc, 2007). De plus, bien que ces travaux indiquent que les réponses des crustacés peuvent être perturbées suite à l'exposition à des vertébrostéroïdes, elles n'apportent pas d'informations sur [1] le potentiel de ces hormones à perturber spécifiquement la fonction endocrinienne des crustacés, [2] la modulation de la régulation hormonale en lien avec les effets observés et [3] le rôle joué par les hormones vertébrostéroïdes dans la régulation endocrinienne des crustacés. Enfin, le manque de support mécanistique sur la signalisation des oestrogènes couplé à l'absence du récepteur à l'oestrogène chez les crustacés (Thornton, 2003) tend à montrer que cette voie de signalisation n'est pas pertinente pour ce groupe d'espèces.

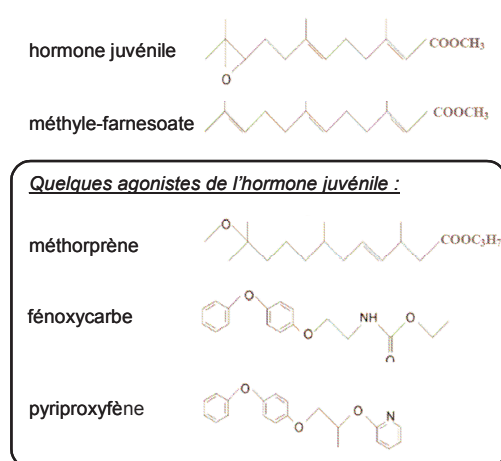
#### 1.2.1.2. Insecticides régulateurs de croissance

Les ecdystéroïdes et les terpénoïdes représentent deux classes d'hormones qui paraissent avoir un rôle crucial dans la régulation du développement, de la croissance et de la reproduction des crustacés (deFur *et al.*, 1999 ; Subramoniam, 2000 ; LeBlanc, 2007 ; Mazurová *et al.*, 2008). Certaines substances de synthèse sont capables de mimer l'action de ces hormones et peuvent par conséquent être identifiées comme des PE capables de perturber les processus physiologiques (Verslycke *et al.*, 2007). Ceci est illustré chez les crustacés par l'impact de certains IRC qui, à l'origine, sont développés de façon à interférer spécifiquement avec les systèmes juvéniles et ecdystéroïdes des insectes nuisibles (recensement des insecticides dans Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003 ; Oetken *et al.*, 2004a ; McKenney, 2005). Il existe

deux grandes classes d'IRC : d'une part, les analogues de l'hormone juvénile (*i.e.*, insecticides juvénoïdes) qui sont de loin les plus répandus et d'autre part, les analogues de l'ecdystéroïde.

#### □ les juvénoïdes

Les juvénoïdes sont capables de perturber le développement embryonnaire et d'interférer avec les mues de métamorphose (LeBlanc *et al.*, 1999). Considérant que le méthyle-farnesoate chez les crustacés est l'analogue de l'hormone juvénile des insectes, les juvénoïdes ont été considérés comme des agonistes du méthyle-farnesoate (**Figure 1.11**). De nombreuses études *in vivo* de laboratoire rapportent les effets des juvénoïdes tels que le méthoprène, le pyriproxifène ou encore le fénoxycarbe, chez les crustacés, notamment chez les décapodes et les cladocères. Les insecticides juvénoïdes altèrent le développement embryo-larvaire et/ou la mue chez de nombreuses espèces (*Daphnia magna* : Olmstead & LeBlanc, 2001b ; *Mysidopsis bahia* : McKenney & Matthews, 1990 ; McKenney & Celestial, 1993 ; *Neomysis integer* : Ghekiere *et al.*, 2006a ; *Rhitropanopeneus harrisii* : Celestial & McKenney, 1994 ; Cripe *et al.*, 2003 ; Tuberty & McKenney, 2005 ; *Palaemonetes pugio* : McKenney *et al.*, 2004 ; Tuberty & McKenney, 2005).



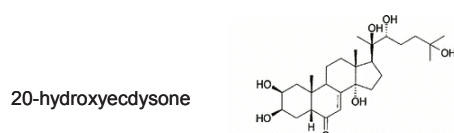
**Figure 1.11.** Structure chimique de l'hormone juvénile des insectes, du méthyle-farnesoate et de trois insecticides juvénoïdes ( méthoprène, fénoxycarbe et pyriproxifène) (McKenney, 2005).

Il a également été rapporté que les insecticides juvénoïdes pouvaient perturber la reproduction chez les femelles. Ces composés perturbent l'ovogenèse (*Libinia emarginata* : Hinsch, 1981), entraînent des inhibitions de la vitellogenèse (*Daphnia magna* : Tokishita *et al.*, 2006 ; *Neomysis Integer* : Ghekiere *et al.*, 2006b ; *Callinectes sapidus* : Lee & Noone, 1995 ; *Rhitropanopeneus harrisii* : Payen & Costlow, 1977) et entraînent des retards dans l'âge de première ponte et des diminutions de la production de jeunes (*Daphnia carinata* : Trayler & Davis, 1996 ; *Daphnia magna* : Olmstead & LeBlanc, 2001b ; *Americamysis bahia* : McKenney & Celestial, 1996 ; McKenney, 2005). Payen et Costlow (1977) ont observé une stimulation de la spermatogenèse chez des crabes mâles *Rhitropanopeneus harrisii* exposés au

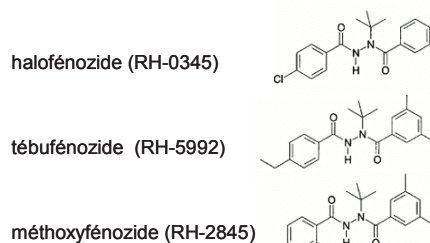
méthoprene. Enfin, au même titre que le méthyle-farnesoate, les insecticides juvénoides ont été montrés comme étant capables d'induire la production de mâles selon une relation dose-réponse chez les daphnies (Olmstead & LeBlanc, 2003 ; Oda *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005). Ces travaux constituent un faisceau de preuves sur le rôle du MF dans la régulation endocrinienne des crustacés dits inférieurs, et mettent en évidence la nécessité d'évaluer le risque « PE » de ce type de composés sur les crustacés (*i.e.*, des espèces non cibles).

#### □ les analogues de l'ecdystéroïde

Les insecticides mimétiques de l'ecdystéroïde ont reçu moins d'attention que les juvénoides. Par exemple, certains insecticides (méthoxyfénazole, halofénazole, tébufénazole) ont été conçus pour agir comme des agonistes de la 20HE et par conséquent pour perturber les mues de métamorphose des insectes (**Figure 1.12** ; LeBlanc, 2007). Ils interagissent spécifiquement avec le récepteur de l'hormone ecdystéroïde (le récepteur EcR), ce qui rend l'utilisation de ces composés particulièrement pertinente pour étudier les perturbations endocriniennes chez les crustacés (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003). Par exemple, chez le homard *Homarus americanus*, le récepteur EcR a une plus grande affinité pour le tébufénazole que pour certains PE classiquement étudiés comme le bisphénol A, les phtalates ou encore les PCB (Tarrant *et al.*, 2011). Quelques travaux rapportent néanmoins des effets toxiques de ces composés chez les crustacés. Le tébufénazole accélère le cycle d'inter-mue chez les larves du crabe *Rhithropanopeus harrisi* et favorise la fixation ainsi que la métamorphose des larves cyprides de la bernacle *Balanus amphitrite* (Clare *et al.*, 1992). Ces résultats suggèrent que des composés chimiques présentant une activité agoniste de l'ecdysone chez les insectes peuvent stimuler les processus physiologiques régulés par l'ecdysone chez les crustacés.



#### Quelques agonistes de la 20-hydroxyecdysone :



**Figure 1.12.** Structure chimique de l'hormone de mue (20-hydroxyecdysone) et de trois exemples d'insecticides analogues de l'ecdystéroïde : l'halofénazole, le tébufénazole et le méthoxyfénazole (Dhadialla *et al.*, 1998).

## 1.2.2. Marqueurs pour évaluer l'impact PE de composés chez les crustacés

La majorité des travaux visant à évaluer l'impact des PE chez les crustacés se focalise sur des réponses individuelles et souligne leur intérêt dans une démarche d'évaluation des risques (**Tableau 1.1**). Cependant, ces réponses permettent rarement de statuer sur la capacité qu'une substance a de perturber le système endocrinien chez ces organismes, excepté peut-être pour les composés spécifiquement conçus à cet effet (*i.e.*, IRC). Par exemple, la réduction de la fécondité ou encore la perturbation du développement embryonnaire et de la mue peuvent être la conséquence d'une grande variété de stress (LeBlanc, 2007). Les réponses individuelles peuvent être induites par une perturbation de la régulation hormonale, mais elles peuvent également résulter d'autres mécanismes de toxicité tels que : [1] la modulation de l'allocation énergétique (*e.g.*, une réduction de l'alimentation et/ou une augmentation des dépenses énergétiques), [2] la perturbation du système nerveux et/ou [3] le transfert d'anomalies génétiques suite à une exposition à des composés génotoxiques (Lacaze *et al.*, 2011c). Il est donc difficile, en se basant sur ces observations, de décrire précisément les mécanismes de toxicité mis en jeu, mais surtout de confirmer que les effets observés résultent bien d'une perturbation de la régulation hormonale.

**Tableau 1.1.** Liste non-exhaustive d'études de laboratoire rapportant les effets de PE chez les crustacés.

20HE : 20-hydroxyecdysone ; AP : alkylphénol ; BaP : Benzo(a)pyrène ; BDE : Brominated diphenyl ether ; BPA : Bisphénol A ; CY : Cyprotérone acétate ; DCA : 3,4 Dichloroaniline ; DEHP : Di(2-éthylhexyl)phthalate ; DEP : Diéthyl phthalate ; DES : Diéthylstilbestrol ; E1 : estrone ; E2 : 17 $\beta$ -estradiol ; EE2 : 17 $\alpha$ -éthynyl-estradiol ; HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ; HJ : hormone juvénile III ; ICI : Industries Chimiques Impériales ; MF : méthyle-farnesoate ; NP: Nonylphénol ; NPEO : Nonyphénol éthoxylate ; OCDF : Octachlorodibenzofuran ; p,p'-DDE : 1,1-Dichloro-2,2-bis(4-chlorophényl)éthylène ; PCB : polychlorobiphényle ; PonA : Ponasterone A ; RH : Rohm et Haas Co. ; TBBPA : Tétrabromobisphénol A ; TBP : 2, 4, 6- Tribromophénol ; TBT : tributylétain ; TCDD : 2, 3, 7, 8-Tétrachlorodibenzo-p-dixin.

Espèces	Composés/sites	Effets et concentrations	Références
<b>Décapodes</b>			
<i>Balanus amphitrite</i> (larves cyprides)	E2 (a), NP (b)	Inhibition de la fixation des larves, 0.01-10 $\mu$ g/L (a, b)	Billinghurst <i>et al.</i> , 1998
<i>Balanus amphitrite</i> (larves cyprides)	RH 5849	Induction de la fixation et de la métamorphose des larves, 10 000 $\mu$ g/L	Clare <i>et al.</i> , 1992
<i>Chasmagnathus granulata</i> (juvéniles)	Cd	Réduction de la fréquence des mues, 10-50 $\mu$ g/L	Greco <i>et al.</i> , 2001
<i>Elminus modestus</i> (larves)	E2 (a), NP (b)	Réduction de la croissance, 10 $\mu$ g/L (a); inhibition du développement larvaire, 0.1-10 $\mu$ g/L (b)	Billinghurst <i>et al.</i> , 2001
<i>Homarus americanus</i> (larves)	Heptachlore	Réduction de la fréquence des mues (liée à une perturbation des concentrations d'ecdystéroïdes), 0.5 mg/organisme (poids 30 g)	Snyder & Mulder, 2001
<i>Oziotelphusa senex senex</i> (adultes)	Lindane	Inhibition de la mue, 1 $\mu$ g/L	Reddy <i>et al.</i> , 1982
<i>Palaemonetes pugio</i> (larves)	Méthoprène	Inhibition de la métamorphose, 100-1 000 $\mu$ g/L	Kreutzweiser <i>et al.</i> , 1994



## CHAPITRE I

<i>Penaeus monodon</i>	Lindane, phosphamidon	Inhibition de la mue	Reddy & Rao, 1987
<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	Fénoxycarbe	Inhibition du développement, 48 µg/L; inhibition de la croissance, 100 000 µg/L	Cripe <i>et al.</i> , 2003 Nates & McKenney, 2000
<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	RH 5849	Accélération de la mue, 100-1 000 µg/L	Clare <i>et al.</i> , 1992
<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	Méthoprène	Inhibition du développement larvaire, 100 µg/L	Celestial & McKenney, 1994
<i>Uca pugilator</i> (adultes)	Aroclor 1242 (a), OCDF (b)	Inhibition de la mue, 8 µg/L (a), 1.6 ng/L (b)	Fingerman, 1997
<i>Uca pugilator</i> (juvéniles)	Diflubezuron	Réduction de la fréquence de mue, 20-200 µg/L	Cunningham & Myers, 1987

### Copépodes

<i>Acartia tonsa</i> (œufs-juvéniles)	TBT	Inhibition du développement larvaire, EC10=1 ng/L, EC50=3 ng/L	Kusk & Petersen, 1997
<i>Acartia tonsa</i>	Diflubenzuron	Réduction de la viabilité des œufs, altération du développement embryon-larvaire, 1-10 µg/L ; Réduction de la fécondité, 100 µg/L	Tester & Costlow, 1981
<i>Acartia tonsa</i> (œufs-juvéniles)	E2 (a), E1 (b), testostérone (c), HJ (d), flutamide (e), tamoxifène (f), hydroxyflutamide (g), EE2 (h), AP (i), BPA (j), NPEO (k), DEHP (l)	Inhibition du développement larvaire, EC10 (µg/L) : 370 (a), 250 (b), 740 (c), 17 (d), 135 (e), 8.7 (f), 5.3 (g), 46 (h), 5.2 (i), 100 (j), 22 (k), 5 000 (l), EC50 (µg/L) : 720 (a), 410 (b), 1 500 (c), 100 (d), 480 (e), 49 (f), 1 400 (g), 88 (h), 13 (i), 550 (j), 150 (k), 10 000 (l)	Andersen <i>et al.</i> , 2001
<i>Acartia tonsa</i> (œufs-juvéniles)	PonA (a), méthoprène (b), fenoxycarb (c), p,p'-DDE (d), CY (e), vinclozin (f), DES (g), ICI 182 (h), NP-acetate (i)	Stimulation du développement larvaire, 6-16 µg/L (a) ; inhibition du développement larvaire, EC10 (µg/L) : 166 (b), 3 (c), 0.1 (d), 80 (e), 630 (f), 20 (g), 1 650 (h), 700 (i), EC50 (µg/L) : 226 (b), 27 (c), 2 (d), 156 (e), 3 530 (f), 30 (g), 1 980 (h), 3 600 (i)	Wollenberger, 2005
<i>Acartia tonsa</i> (œufs-juvéniles)	Muscs de synthèse : cétone (a), galaxolide (b), tonalide (c), celestolide (d)	Inhibition du développement larvaire, EC10 (µg/L) : 10 (a), 37 (b), 7 (c), 36 (d), EC50 (µg/L) : 66 (a), 59 (b), 26 (c), 160 (d)	Wollenberger <i>et al.</i> , 2003
<i>Acartia tonsa</i> (œufs-juvéniles)	BDE-28 (a), BDE-47 (b), BDE-99 (c), BDE-100 (d), TBP (e), TBBPA (f)	Inhibition du développement larvaire, EC10 (µg/L) : 4.6 (a), 2.4 (b), 0.39 (c), 0.02 (d), 270 (e), 13 (f), EC50 (µg/L) : 12.8 (a), 12.5 (b), 4.2 (c), 1.2 (d), 811 (e), 125 (f)	Wollenberger <i>et al.</i> , 2005
<i>Acartia tonsa</i> (adulte)	20HE (a), HJ (b), E2 (c), P (d), testostérone (e), methyl-testostérone (f), NPEO (g), DCA (i), BPA (h), TBBPA (i)	Réduction du nombre d'œufs produits par femelles, EC10 (µg/L) : 100 (a), 3 (b), 270 (c), 42 (d), 30 (e), 460 (f), 265 (g), 734 (h), 21 (i), 112 (j), EC50 (µg/L) : 650 (a), 980	Wollenberger, 2005
<i>Acartia tonsa</i> (œufs-adultes)	E2 (a), BPA (b)	Accélération de la maturation sexuelle des femelles, 23 µg/L (a), 20 mg/L (b)	Andersen <i>et al.</i> , 1999
<i>Amphiascus tenuiremis</i> (cycle de vie)	Fipronil	Forte inhibition de la reproduction, et retard du développement embryon-larvaire, 0.22 µg/L	Cary <i>et al.</i> , 2004 Chandler <i>et al.</i> , 2004
<i>Amphiascus tenuiremis</i> (multigénération)	Atrazine	declin de la reproduction en génération F1, 25 et 250 µg/L	Bejarano & Chandler, 2003
<i>Bryocamptus zschokkei</i> (cycle de vie)	Lindane	Retard du développement embryon-larvaire, 100 µg/L ; Réduction du nombre d'œufs produits par femelles et de la viabilité des progénitures, 32 µg/L	Brown <i>et al.</i> , 2003
<i>Eurytemora affinis</i>	E2 (a), BaP (b), NP (c), DEHP (d), atrazine (e)	Inhibition du développement larvaire, pas d'influence sur la fécondité, 6 µg/L (a), 12 µg/L (b), 7 µg/L (c), 109 µg/L (d), 25 µg/L (e)	Forget-Leray <i>et al.</i> , 2005
<i>Nitocra spinipes</i> (juvéniles-adultes)	DES	Réduction du % de femelles gravides, 30 µg/L	Breitholtz & Bengtsson, 2001
<i>Nitocra spinipes</i> (cycle de vie)	BDE-47 (a), BDE-99 (b)	Inhibition du développement larvaire, 13 µg/L (a) et 30 µg/L (b)	Breitholtz & Wollenberger, 2003
<i>Nitocra spinipes</i> (cycle de vie)	Muscs de synthèse : cétone (a), galaxolide (b), tonalide (c)	Inhibition du développement larvaire, 30 µg/L (a), 20 µg/L (b), 100 µg/L (c)	Breitholtz <i>et al.</i> , 2003
<i>Tisbe battagliai</i> (cycle de vie)	20HE (a), DES (b)	Réduction de la reproduction, 27 µg/L (a) ; femelles sexuellement inactives, 86.5 µg/L (a) et 100 µg/L (b)	Hutchinson <i>et al.</i> , 1999
<i>Tigriopus japonicus</i> (multigénération)	E2 (a), BPA (b), NP (c), AP (d)	Retard dans le déroulement du stade larvaire nauplius (génération F1 plus sensible), 1 µg/L (a), 100-1000 µg/L (b), 1-10 µg/L (c), 0.1-10 µg/L (d)	Marcial <i>et al.</i> , 2003

Cladocères			
<i>Ceriodaphnia dubia</i> (adultes)	Styrène (a), $\alpha$ -ecdysone (b), B-ecdysone (c), cyasterone (d), PonA (e), E1 (f), testotérone (g), NP (h), BaP (i)	Diminution de la reproduction, 0.04-1.7 $\mu\text{g/L}$ (a), 0.1 $\mu\text{g/L}$ (b), 0.36 $\mu\text{g/L}$ (c), 0.26 $\mu\text{g/L}$ (d), 1.05 $\mu\text{g/L}$ (e), > 10 000 $\mu\text{g/L}$ (f), 2 800 $\mu\text{g/L}$ (g), 280 $\mu\text{g/L}$ (h), 4 000 $\mu\text{g/L}$ (i)	Tatarazako <i>et al.</i> , 2002
<i>Daphnia carmita</i> (cycle de vie)	Pyriproxifène	Arrêt de la croissance et réduction de la reproduction (80%), 0.01 $\mu\text{g/L}$	Trayler & Davis, 1996
<i>Daphnia magna</i>	Pentachlorophenol	Réduction de la fécondité, 120-500 $\mu\text{g/L}$	Allen <i>et al.</i> , 1999 Parks & LeBlanc, 1996
<i>Daphnia magna</i>	Metoxychlor	Réduction de la fréquence des mues, 1 $\mu\text{g/L}$	Baer & Owens, 1999
<i>Daphnia magna</i> (multigénération)	20HE (a), PoA (b)	Observation d'exuviations incomplètes, 31-125 $\mu\text{g/L}$ (a) ; Observation d'exuviations incomplètes et réduction de la fécondité en génération F1, 1.6-13 $\mu\text{g/L}$ (b)	Baldwin <i>et al.</i> , 2001
<i>Daphnia magna</i> (adultes)	NP	Réduction de la fécondité, 100 $\mu\text{g/L}$	Baldwin <i>et al.</i> , 1997
<i>Daphnia magna</i> (multigénération)	DES	Réduction de la fréquence des mues en génération F0, et diminution de la fécondité en génération F1, 500 $\mu\text{g/L}$	Baldwin <i>et al.</i> , 1995
<i>Daphnia magna</i> (adultes)	DEHP	Réduction de la fécondité, 800 $\mu\text{g/L}$	Knowles <i>et al.</i> , 1987
<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes)	CY	Réduction de la croissance (indépendamment de la mue), 0.5-2 mg/L ; réduction de la fréquence des mues, 2 mg/L ; réduction de la taille des pontes (due à une réduction de la taille des organismes), 1 et 2 mg/L	LeBlanc & McLachlan, 1999
<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes-embryons)	NP (a), testostérone (b)	Anormalité du développement embryonnaire, 100 et 200 $\mu\text{g/L}$ (a), 1 200 - 5 800 $\mu\text{g/L}$ (b) ; augmentation de la fécondité, 100 et 200 $\mu\text{g/L}$ (a)	LeBlanc & McLachlan, 2000
<i>Daphnia magna</i> (ontogénèse)	Fénarimol (a), testostérone (b)	Anormalité du développement embryonnaire, 1 300 $\mu\text{g/L}$ (a), 3 500 $\mu\text{g/L}$ (b)	Mu & LeBlanc, 2004
<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes-embryons)	Fénarimol	Retard de mue, anomalité du développement embryo-larvaire et réduction de la fécondité (corrélée à une diminution des concentrations d'ecdysone in vivo), 30-1000 $\mu\text{g/L}$	Mu & LeBlanc, 2002b
<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes-embryons)	Testostérone	Réduction de la fécondité, 2 300 mg/L ; Retard de mue, anomalité du développement embryo-larvaire, 7 200 $\mu\text{g/L}$	Mu & LeBlanc, 2002a
<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes)	Méthoprène	Réduction des taux de croissance et de fécondité, retard de maturation sexuelle, 1.6-16 $\mu\text{g/L}$ ; Réduction de la fréquence des mues, 0.06 $\mu\text{g/L}$	Olmstead & LeBlanc, 2001a
<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes)	Méthoprène	Stimulation de la production de mâles, 62-50 $\mu\text{g/L}$	Olmstead & LeBlanc, 2001b
<i>Daphnia magna</i>	MF (a), pyriproxifène (b)	Stimulation de la production de mâles, 0.8-800 nM (a), 0.3 nM (b)	Olmstead & LeBlanc, 2003
<i>Daphnia magna</i>	Pyriproxifène (a), fénoxycarbe (b), MF (c), HJ (d), méthoprène (e)	Réduction de la reproduction, sexe ratio dominé par les mâles, 0.33 $\mu\text{g/L}$ (a, b), 3.7 $\mu\text{g/L}$ (c), 330 $\mu\text{g/L}$ (d), 1 300 $\mu\text{g/L}$ (e)	Tatarazako <i>et al.</i> , 2003
<i>Daphnia magna</i>	TCDD	Réduction de la fécondité, 0.1-1 ng/L	Wu <i>et al.</i> , 2001
<i>Daphnia magna</i> (cycle de vie)	4-NP	Arrêt du développement embryo-larvaire, 800-1 000 $\mu\text{g/L}$ ; malformation des néonates, 50-200 $\mu\text{g/L}$ ; diminution de la fécondité, 12-50 $\mu\text{g/L}$	Zhang <i>et al.</i> , 2003
<i>Daphnia magna</i> (juvéniles)	Endosulfane (a), DES (b)	Inhibition de la mue, 1 000-1 500 $\mu\text{g/L}$ (a), 100-200 $\mu\text{g/L}$ (b)	Zou & Fingerman, 1997a
<i>Daphnia magna</i>	PCB 29 (a), aroclore 1242 (b), DEP (c)	Prolongation des périodes d'inter mue, 200 $\mu\text{g/L}$ (a), 50-100 $\mu\text{g/L}$ (b), 22 400 $\mu\text{g/L}$ (c)	Zou & Fingerman, 1997a
<i>Daphnia pulex</i>	Diuron	Diminution de la reproduction, LOEC = 7 700 $\mu\text{g/L}$	Nebeker & Schuytema, 1998
<i>Daphnia pulicaria</i> (adultes)	Atrazine	Augmentation de la production de mâles, 0.5-10 $\mu\text{g/L}$	Dodson <i>et al.</i> , 1999
<i>Moina macrocopa</i> (néonates-adultes)	Méthoprène	Réduction de la fécondité, 50-500 $\mu\text{g/L}$	Chu <i>et al.</i> , 1997

Amphipodes			
<i>Corophium volutator</i>	NP	Réduction de la croissance, augmentation de la fertilité des femelles, >10 µg/L	Brown <i>et al.</i> , 1999
<i>Gammarus pulex</i> (juvéniles)	Lindane	Réduction de la croissance (du poids), 6.1 µg/L	Blockwell <i>et al.</i> , 1996a
<i>Hyalella azteca</i> (adultes)	Lindane	Réduction de la croissance et de la taille des populations, réduction du nombre de femelles gravides, 13.5 µg/L	Blockwell <i>et al.</i> , 1999
<i>Leptocheirus plumulosus</i> (juvéniles- adultes)	Sédiments contaminés	Diminution de la reproduction	Zulkosky <i>et al.</i> , 2002
<i>Monoporeia affinis</i>	Sédiments contaminés (métaux, PCB, HAP)	Retard ou arrêt de la maturation sexuelle	Sundelin <i>et al.</i> , 2000
Mysidacés			
<i>Mysidopsis bahia</i> (cycle de vie)	Méthoprene	Réduction de la reproduction, 2 µg/L; réduction de la croissance (du poids), 62 µg/L	McKenney & Celestial, 1996

Il est surprenant de constater, comme le soulignent les dernières synthèses bibliographiques (LeBlanc, 2007 ; Rodriguez *et al.*, 2007 ; Mazurová *et al.*, 2008), qu'il n'existe quasiment pas d'outils permettant de caractériser spécifiquement une perturbation endocrinienne chez ces organismes. Le dosage de la synthèse et/ou des concentrations circulantes en hormones, la quantification de leurs récepteurs spécifiques, ainsi que le dosage de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme de ces hormones (notamment en ce qui concerne les ecdystéroïdes et les sesquiterpénoïdes) constitueraient des biomarqueurs de choix pour évaluer le potentiel PE de composés et/ou d'échantillons de milieux. Toutefois, ce savoir-faire, quand il existe, a été développé dans le cadre d'études d'endocrinologie chez des crustacés décapodes (Lye *et al.*, 2005 ; Lye *et al.*, 2008). En ce qui concerne les espèces d'intérêt en écotoxicologie aquatique (amphipodes, mysidacés, copépodes, cladocères), l'utilisation de ces biomarqueurs se confronte encore à plusieurs limites (*i*) analytiques, avec des quantités d'échantillons extrêmement faibles et (*ii*) biologiques comme le manque de connaissances fondamentales sur le fonctionnement du système endocrinien et la disponibilité de critères précis permettant de décrire et de connaître de façon fiable le cycle de vie (mue et reproduction) chez ces espèces.

Comme souligné par LeBlanc (2007), l'intersexualité, les dysfonctionnements de la mue (*i.e.*, les retards de mue ainsi que les mues précoces et incomplètes) et le sexe-ratio sont aujourd'hui des réponses individuelles les plus pertinentes et les plus utilisées pour évaluer l'impact de PE chez les crustacés. Ces biomarqueurs candidats sont pertinents pour évaluer l'exposition à des PE parce que [1] ils sont directement liés à une signalisation endocrinienne perturbée (par la voie de l'HA, de l'ecdystéroïde ou du MF), [2] ils peuvent être facilement discernés au sein des populations naturelles et [3] ils sont relativement rares dans les populations contrôles.

La mesure de la Vg est aujourd'hui le biomarqueur spécifique d'une exposition aux PE le plus étudié et développé chez les invertébrés (revu dans LeBlanc, 2007 ; Rodriguez *et al.*, 2007 ; Matozzo *et al.*, 2008 ; Mazurová *et al.*, 2008). En effet, l'induction de Vg chez les poissons mâles s'est imposée comme une

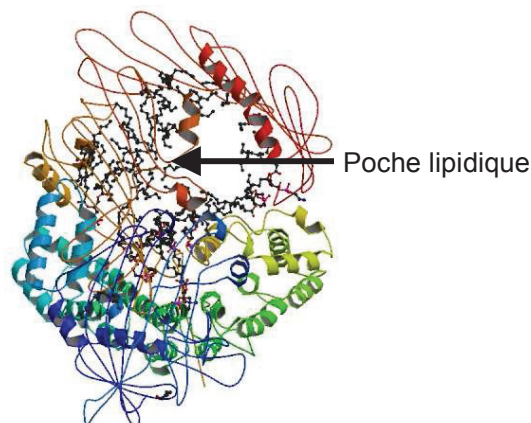
référence absolue pour évaluer l'exposition à des PE oestrogéniques (Sumpter & Jobling, 1995) ; ceci a ainsi encouragé les écotoxicologues à développer ce type d'outil chez les invertébrés.

La partie suivante propose un bref état de l'art sur les généralités de la Vg et sur son utilisation comme biomarqueur de la perturbation endocrinienne chez les invertébrés, et notamment les crustacés.

### 1.2.3. Développement de marqueurs sub-individuels : la mesure de la vitellogénine

#### 1.2.3.1. Généralités sur la vitellogénine

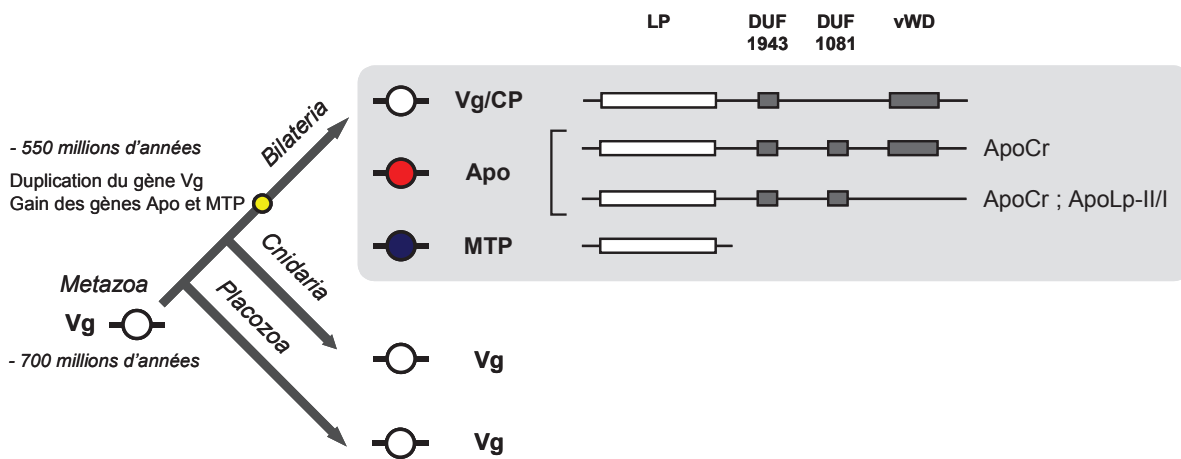
La Vg est une des lipoprotéines de la super-famille des transporteurs lipidiques (LLTP) incluant également les protéines de coagulation (CP), la sous-unité cytosolique de la protéine de transfert de triglycéride microsomale (MTP) et les apolipoprotéines (Apo). Les apolipoprotéines peuvent être elles-mêmes sous-divisées en l'apolipoprotéine B des vertébrés (ApoB), l'apolipoprotéine des crustacés (ApoCr) et le précurseur I/II de l'apolipoprotéine des insectes (ApoLp-II/I) (Babin *et al.*, 1999 ; Avarre *et al.*, 2007 ; Babin, 2008 ; Hayward *et al.*, 2010). Les lipoprotéines de la super-famille des LLTP forment une poche lipidique (**Figure 1.13**) permettant, par exemple, à la vitellogénine d'y charger des lipides (revu dans Raag *et al.*, 1988 ; Banaszak *et al.*, 1991 ; Sharrock *et al.*, 1992 ; Anderson *et al.*, 1998 ; Avarre *et al.*, 2007). Les fonctions de ces LLTP sont aujourd'hui relativement bien connues chez les animaux (principalement pour les arthropodes et les vertébrés). Par exemple, chez l'Homme : l'ApoB est responsable du transport du cholestérol et est directement liée à des problèmes cardiovasculaires ; la MTP a un rôle important dans la transformation des lipoprotéines et des mutations peuvent causer une A-beta-lipoprotéïnémie ou « syndrome de Bassen-Kornzweig ».



**Figure 1.13. Structure moléculaire bi-dimensionnelle de la vitellogénine et localisation de la poche lipidique**

Le gène Vg est le plus ancien gène des LLTP puisqu'il est le seul à avoir été identifié chez le dernier ancêtre commun connu de la majorité des espèces animales (*i.e.*, environ - 700 millions d'années). Les

duplications du gène Vg semblent s'être produites chez le dernier ancêtre commun connu des bilatériens (*i.e.*, environ – 550 millions d'années), donnant naissance aux gènes Apo et MTP (**Figure 1.14**). Les LLTP ont été maintenues chez les animaux à cause d'une forte pression de sélection sur ces gènes qui sont fortement impliqués dans le développement, le métabolisme et/ou la reproduction (Hayward *et al.*, 2010). D'une manière générale, la Vg est impliquée dans le processus de vitellogenèse des espèces animales ovipares (e.g., vertébrés, insectes, mollusques et certains crustacés). Néanmoins, la fonction « protéine de réserve dans les oeufs » peut être assurée par d'autres protéines de la famille des LLTP ou par d'autres protéines sans lien de parenté phylogénétique avec la Vg (Sappington *et al.*, 2002 ; Sappington, 2002 ; Smolenaars *et al.*, 2007). Chez les décapodes, la protéine orthologue de la Vg joue un rôle dans la coagulation, tandis que la protéine de réserve de l'oeuf est produite par un gène paralogue de la Vg appartenant à la sous-famille des Apo : l'ApoCr (Avarre *et al.*, 2007).



**Figure 1.14. Evolution et structure des transporteurs lipidiques (LLTP) chez les métazoaires (modifié de Hayward *et al.*, 2010)**

*Apo* : apoloprotéine ; *ApoCr* : apolipocrustacéine ; *ApoLp-II/I* : apolipophorine II/I ; *CP* : « clotting protein » ; *MTP* : « microsomal triglyceride transfer protein » ; *Vg* : vitellogénine ; *vWD* : domaine von Willebrand ; *LP* : lipoprotéine ; *DUF* : domaine à la fonction inconnue

Au sein de la super-famille des LLTP, la Vg ou la protéine ayant la fonction de la Vg (c.a.d. les protéines « *Vg-like* » dans le cas des décapodes par exemple) ont été largement caractérisées à cause de leur rôle central dans le processus de vitellogenèse chez les bilatériens ovipares et ovovivipares, incluant de nombreuses espèces deuterostomiens et protostomiens (Wallace *et al.*, 1967 ; Wilder *et al.*, 2002). Le processus de vitellogenèse se caractérise par une production importante de Vg (précurseur protéique du vitellus). Son accumulation dans les œufs comme protéine de réserve (*i.e.*, vitellus) fournira les ressources énergétiques nécessaires au développement normal des embryons.

Chez les crustacés, la caractérisation moléculaire des protéines de réserve de l'œuf ainsi que les mécanismes impliqués dans la régulation de sa production ont été bien décrits chez de nombreuses espèces de décapodes (revu dans Subramoniam, 2011). Pour les crustacés de plus petite taille (e.g.,

amphipode, isopode, copépode), même si la Vg a été caractérisée chez plusieurs espèces, on note toutefois moins d'avancées en terme de fonction en comparaison au seul groupe des décapodes.

Chez les décapodes, les deux principaux organes impliqués dans la synthèse de la Vg sont les ovaires et l'hépatopancréas (revu dans Subramoniam, 2011). Chez les isopodes et les amphipodes, la synthèse de la Vg semble avoir lieu dans le corps gras, comme chez les insectes (Junera & Croisille, 1980 ; Suzuki *et al.*, 1990). La production extra-ovarienne de Vg est transportée par l'hémolymphe jusqu'aux ovaires puis, de façon analogue aux insectes (Raikhel & Dhadialla, 1992), est incorporée dans les ovocytes par un mécanisme d'endocytose (micropinocytose) contrôlé par des récepteurs spécifiques à la Vg (Subramoniam, 2011). Chez les crustacés, les protéines de l'œuf issues de la dégradation de la Vg, comprennent des lipoprotéines conjuguées à des glucides, des phosphates et des pigments caroténoïdes (Subramoniam, 2011).

### 1.2.3.2. Méthodologies disponibles pour la mesure de vitellogénine

#### 1.2.3.2.1. Méthode d'immunoagglutination : ELISA

La mesure de la Vg est classiquement effectuée au moyen de méthodes protéiques (Western blot ou l'ELISA), basées sur l'utilisation d'anticorps spécifiques (**Tableau 1.2**). Cependant, l'application de ces techniques reste limitée chez les crustacés en raison des niveaux de conservation modérés de la structure génétique et protéique de la Vg au cours de l'évolution, et par conséquent de la difficulté d'utiliser les anticorps développés chez les vertébrés. Cela implique de purifier et de caractériser la Vg pour chaque espèce d'intérêt, afin de s'assurer de la réactivité des anti-corps utilisés, ou dans le but d'en développer de nouveaux. Ces méthodes de quantification ont été principalement développées chez des espèces de décapodes (**Tableau 1.2**). En effet, ce type d'approche chez les crustacés de petite taille (*e.g.*, amphipodes, copépodes, isopodes, etc.) est plus rare parce qu'il est plus compliqué de produire des anticorps chez ces espèces (*e.g.*, récupération de tissus d'intérêt en quantité suffisante). Etant donné la faible transférabilité des anticorps entre espèces, la généralisation de la méthode ELISA est par ailleurs une approche longue et fastidieuse puisqu'elle nécessite de développer un anticorps quasiment systématiquement pour chaque espèce ou groupe d'espèces.

**Tableau 1.2. Espèces de crustacés et de mollusques chez lesquelles des techniques de dosage de la vitellogénine par immuno-essais ont été validées**

Espèces	Références
<b>Mollusques</b>	
<u>Bivalves</u>	
<i>Crassostrea gigas</i>	Li <i>et al.</i> , 1998
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Osada <i>et al.</i> , 2003

Crustacés	
<u>Décapodes</u>	
<i>Carcinus maenas</i>	Martín-Díaz <i>et al.</i> , 2005
<i>Cherax quadricarinatus</i>	Sagi <i>et al.</i> , 1999
<i>Eriocheir sinensis</i>	Chen <i>et al.</i> , 2004
<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	Auttarat <i>et al.</i> , 2006
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	Lee <i>et al.</i> , 1997
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	Tahara <i>et al.</i> , 2005
<i>Palaemon elegans</i>	Sanders <i>et al.</i> , 2005
<i>Palamonetes pugio</i>	Oberdorster <i>et al.</i> , 2000
<i>Penaeus monodon</i>	Vincent <i>et al.</i> , 2001
<i>Sicyonia ingentis</i>	Tsukimura <i>et al.</i> , 2000
<u>Mysides</u>	
<i>Neomysis integer</i>	Ghekiere <i>et al.</i> , 2004
<u>Amphipodes</u>	
<i>Leptocheirus plumulosus</i>	Volz <i>et al.</i> , 2002b
<u>Copépodes</u>	
<i>Amphiascus tenuiremis</i>	Volz & Chandler, 2004
<u>Cirripèdes</u>	
<i>Balanus amphitrite</i>	Billingham <i>et al.</i> , 2000

#### 1.2.3.2.2. Méthode indirecte ALP

Une méthode alternative reposant sur le dosage des phosphates alkali-labiles (PAL ; marqueurs indirects de la Vg), a été proposée par Gagné & Blaise (2000). Cette méthode a été principalement développée chez des espèces de mollusques bivalves et, dans une bien moindre mesure, chez certains crustacés (**Tableau 1.3**) Cette méthode est facilement applicable car elle ne nécessite pas de caractérisation complète de la protéine ou du gène codant pour celle-ci. Elle a été largement utilisée aussi bien en laboratoire que sur le terrain (revu dans Matozzo *et al.*, 2008). Cependant, certaines précautions doivent être prises lors de son utilisation, particulièrement chez les crustacés, chez qui il existe d'autres sources importantes de phosphates pouvant affecter les mesures (Volz *et al.*, 2002a).

**Tableau 1.3. Espèces de crustacés et de mollusques chez lesquelles des techniques de dosage de la vitellogénine par la méthode ALP ont été validées**

Espèces	Références
<b>Crustacés</b>	
<u>Branchiopodes</u>	
<i>Artemia franciscana</i>	Gagné & Blaise, 2004
<u>Décapodes</u>	
<i>Carcinus aestuarii</i>	Ricciardi <i>et al.</i> , 2010
<i>Farfantepenaeus duorarum</i>	Zapata-Perez <i>et al.</i> , 2005
<i>Neocaridina denticulata</i>	Huang <i>et al.</i> , 2006
<u>Amphipodes</u>	
<i>Gammarus sp.</i>	Gagné <i>et al.</i> , 2005

<b>Mollusques</b>	
<u>Bivalves</u>	
<i>Argopecten gibbus</i>	Quinn <i>et al.</i> , 2005
<i>Cerastoderma glaucum</i>	Marin <i>et al.</i> , 2008
<i>Dreissena polymorpha</i>	Quinn <i>et al.</i> , 2011
<i>Elliptio complanata</i>	Gagné <i>et al.</i> , 2011
<i>Mya arenaria</i>	Blaise <i>et al.</i> , 1999
<i>Mytilus edulis</i>	Ciocan <i>et al.</i> , 2010
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Ricciardi <i>et al.</i> , 2008
<i>Tapes philippinarum</i>	Matozzo <i>et al.</i> , 2012
<u>Gastéropodes</u>	
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	Gagnaire <i>et al.</i> , 2009
<i>Valvata piscinalis</i>	Gagnaire <i>et al.</i> , 2009

### 1.2.3.2.3. Méthodes génomiques

Enfin, les méthodes basées sur la quantification des transcrits (expression du gène en ARN messagers) au moyen de techniques de génomiques (e.g., RT-PCR en temps réel, RT-PCR semi quantitative ou “*MicroArrays*”) constituent une autre approche d’intérêt. La détection et la quantification des ARNm requièrent très peu de matériel et bénéficient de la souplesse et de la sensibilité des méthodes basées sur le principe de la PCR. Cependant, elles restent dépendantes des informations disponibles sur le séquençage du génome de l’espèce étudiée et nécessitent de disposer d’au moins un fragment de la séquence codante du gène d’intérêt. A l’heure actuelle, le génome de très peu d’espèces de crustacés a été séquencé. La séquence codante du gène de la Vg a essentiellement été caractérisée chez des espèces de décapodes marins, mais également chez des copépodes, chez l’amphipode *Gammarus pulex*, chez l’isopode *Armandillidium vulgare*, ainsi que chez *Daphnia magna*. Quelques séquences de Vg sont également disponibles chez des espèces de mollusques bivalves et gastéropodes (**Tableau 1.4**). Chez les crustacés et d’une manière générale chez les invertébrés, les séquences de certains gènes dont ceux codant pour la ou les Vg, n’ont été que partiellement conservées tout au long de l’évolution, rendant difficile le passage d’une espèce à une autre puisque les amorces définies pour une espèce ne sont pas systématiquement transférables entre espèces ou groupes d’espèces. Cette faible conservation au cours de l’évolution implique également une diversité fonctionnelle des protéines. De plus, les techniques de génomiques ne sont pas les plus adaptées pour étudier le niveau fonctionnel (Nikinmaa & Rytönen, 2011); le dosage des ARNm n’étant pas directement représentatif des quantités de protéines exprimées par l’organisme.



**Tableau 1.4. Espèces de crustacés et de mollusques chez lesquelles la séquence codante du gène de la vitellogénine a été partiellement ou complètement caractérisée.**

Espèces	N° accession	Références
<b>Crustacés</b>		
<b>Décapodes</b>		
<i>Callinectes sapidus</i>	DQ314748	Zmora <i>et al.</i> , 2007
<i>Carcinus maenas</i>	GQ221850	Ding <i>et al.</i> , 2010
<i>Charybdis feriatus</i>	AY724676	Mak <i>et al.</i> , 2005
<i>Cherax albidus</i>	GQ420689	Coccia <i>et al.</i> , 2010
<i>Cherax quadricarinatus</i>	AY559062	Serrano-Pinto <i>et al.</i> , 2004
	AY563002	Serrano-Pinto <i>et al.</i> , 2004
	AF306784	Abdu <i>et al.</i> , 2002
<i>Eriocheir sinensis</i>	AY910692	Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	DQ354690	Xie <i>et al.</i> , 2009
<i>Fenneropenaeus merguensis</i>	AY499620	Phiriyangkul & Utarabhand, 2006
<i>Homarus americanus</i>	EF422415	Tiu <i>et al.</i> , 2009
<i>Litopenaeus vannamei</i>	AY321153	Raviv <i>et al.</i> , 2006
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	AB056458	Okuno <i>et al.</i> , 2002
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB033719	Tsutsui <i>et al.</i> , 2000
	AB176641	Tsutsui <i>et al.</i> , 2005
<i>Metapenaeus ensis</i>	AF548363	Tsang <i>et al.</i> , 2003
	AY166874	Tsang <i>et al.</i> , 2003
	AY166875	Tsang <i>et al.</i> , 2003
<i>Pandalus hypsinotus</i>	AB117524	Tsutsui <i>et al.</i> , 2004
<i>Penaeus monodon</i>	DQ288843	Tiu <i>et al.</i> , 2006b
<i>Penaeus semisulcatus</i>	AY051318	Avarre <i>et al.</i> , 2003
<i>Portunus trituberculatus</i>	DQ000638	Yang <i>et al.</i> , 2005
<i>Scylla serrata</i>	FJ812090	Chen <i>et al.</i> , non publié
<i>Uca princeps</i>	DQ449891	Garcia-Gasca & Hernandez-Cornejo, non publié
<i>Upogebia major</i>	AB365125	Kang <i>et al.</i> , 2008
<b>Copépodes</b>		
<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	EF490954	Dalvin <i>et al.</i> , 2011
	EF490955	Dalvin <i>et al.</i> , 2011
<i>Paracyclops nana</i>	GQ205415	Hwang <i>et al.</i> , 2010
	GQ205416	Hwang <i>et al.</i> , 2010
<i>Tigriopus japonicus</i>	EU416312	Lee <i>et al.</i> , 2008
	EU831281	Hwang <i>et al.</i> , 2009
<b>Amphipodes</b>		
<i>Gammarus pulex</i>	EH275398	Sambles <i>et al.</i> , non publié
<b>Branchiopodes</b>		
<i>Daphnia magna</i>	AB114859	Kato <i>et al.</i> , 2004a
	AB252738	Tokishita <i>et al.</i> , 2006
<b>Isopodes</b>		
<i>Armadillidium vulgare</i>	AB037247	Okuno <i>et al.</i> , 2000
<b>Mollusques</b>		
<b>Bivalves</b>		
<i>Argopecten purpuratus</i>	ES469346	Boutet <i>et al.</i> , 2008

<i>Chlamys farreri</i>	FJ516739	Zhang <i>et al.</i> , non publié
<i>Crassostrea gigas</i>	AB084783	Matsumoto <i>et al.</i> , 2003
<i>Crassostrea virginica</i>	CD647526	Peatman <i>et al.</i> , non publié
	BG624249	Jenny <i>et al.</i> , 2002
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	AB055960	Osada <i>et al.</i> , 2004
<i>Mytilus edulis</i>	AY679116	Puinean & Rotchell, 2006
<i>Pecten maximus</i>	AM943022	Mauriz <i>et al.</i> , non publié
<i>Saccostrea glomerata</i>	EU179754	Andersen <i>et al.</i> , non publié

**Gastéropodes**

<i>Aplysia californica</i>	EB300391	Moroz <i>et al.</i> , 2006
<i>Biomphalaria glabrata</i>	CO870309	Lockyer <i>et al.</i> , 2007
<i>Haliotis asinina</i>	CF805565	Amparyup <i>et al.</i> , 2010
<i>Haliotis discus hannai</i>	AB360714	Matsumoto <i>et al.</i> , 2008
<i>Haliotis rufescens</i>	GU122162	Gutierrez <i>et al.</i> , non publié

**1.2.3.2.4. Méthode alternative : la spectrométrie de masse**

La quantification de la Vg par LC-MS/MS a été très récemment développée chez plusieurs espèces de poissons (Zhang *et al.*, 2004 ; Wunschel *et al.*, 2005 ; Cohen *et al.*, 2006 ; Cohen *et al.*, 2009). Ces travaux proposent la LC-MS/MS comme une méthodologie alternative et pertinente pour la mesure de Vg chez les vertébrés. En effet, la chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS ou LC-MS/MS) s'est avérée être très compétitive aux dosages ELISA pour la mesure de biomarqueurs protéiques dans le domaine de la santé (Fortin *et al.*, 2009). Précisément, ces méthodes analytiques permettant l'identification et la quantification de peptides protéotypiques de 6 à 20 acides aminés (i.e., spécifiques de la protéine étudiée, revu dans van den Broek *et al.*, 2008), constituent aujourd'hui des outils de choix pour le développement de biomarqueurs protéiques en écotoxicologie. En effet, dans un contexte où les outils de génomique et de protéomique sont en plein développement, il est ainsi possible de tirer avantage des banques génomiques (Genbank : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> ; EMBL : <http://www.ebi.ac.uk/embl/> ) qui référencent les gènes et les protéines séquencés (cf. **Tableau 1.4**) afin de développer des essais LC-MS/MS pour le dosage de la Vg.

Par ailleurs, en comparaison aux méthodes de type RT-PCR ou ELISA, dont le transfert même entre espèces proches est souvent limité, l'utilisation de la LC-MS/MS doit permettre de développer des outils plus facilement transférables d'une espèce à l'autre. Ainsi, ces méthodes permettraient de lever les verrous scientifiques en lien avec les diversités phylogénétiques, notamment pour les crustacés de petite taille où la purification de la Vg n'est pas envisageable à des fins de production d'anticorps (ELISA).

### 1.2.3.3. Utilisation de la vitellogénine pour l'étude des perturbateurs endocriniens chez les invertébrés

L'induction de Vg chez les vertébrés, en particulier les poissons, est devenue la référence absolue comme biomarqueur d'exposition aux contaminants oestrogéniques (Sumpter & Jobling, 1995 ; Tyler *et al.*, 1996 ; Matthiessen & Sumpter, 1998). Ce succès a encouragé les écotoxicologues à développer et à utiliser la mesure de la Vg chez les invertébrés dans le but de diagnostiquer la présence de PE dans les milieux aquatiques. La revue de Matozzo et collaborateurs (2008) fait le point sur les études les plus récentes ayant utilisées le « biomarqueur Vg » chez plusieurs groupes d'invertébrés aquatiques (principalement les mollusques et les crustacés et, dans une moindre mesure, les insectes et les annélides). Les tableaux suivants présentent plusieurs études récentes menées en laboratoire et sur le terrain et ayant utilisées la mesure de la Vg comme biomarqueur d'exposition aux PE chez les mollusques (**Tableau 1.5**) et les crustacés (**Tableau 1.6**).

#### □ les mollusques

**Tableau 1.5. Etudes ayant rapporté des modulations de la synthèse de vitellogénine chez des mollusques suite à une exposition au laboratoire ou sur le terrain.**

AP : Alkylphénol ; E2 : 17 $\beta$ -estradiol ; EE2 : 17 $\alpha$ -éthynyl-estradiol ; ep. : effluent pétrolier ; HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; NP: Nonylphénol ; TBDE : TétrabromoDiphényléther. G : gonade ; GD : glande digestive ; HL : hémolymph.

Espèces	Type	Composés	Effet [Concentrations]	Méthodes	Matrices	Références
<b>Femelles</b>						
<i>Anodonta cygnea</i>	labo	E2	pas d'effet	ALP	HL	Riffeser & Hock, 2002
<i>Cerastoderma glaucum</i>	labo	NP	↑ [0,0125 à 0,1 mg/L]	ALP	HL et GD	Marin <i>et al.</i> , 2008
<i>Crassostrea gigas</i>	labo	E2	↑ [50 $\mu$ g x 1 inj.]	ELISA	G	Li <i>et al.</i> , 1998
<i>Dreissena polymorpha</i>	labo	NP	↑ [500 $\mu$ g/L]	ALP	individu	Quinn <i>et al.</i> , 2006
<i>Elliptio complanata</i>	labo	pollution urbaine	↑	ALP	HL et GD	Gagné <i>et al.</i> , 2001b
<i>Mya arenaria</i>	labo	E2 NP	↑ [0,3 à 100 nmole/g] ↑ [2 à 500 nmole/g]	ALP	HL	Blaise <i>et al.</i> , 1999
<i>Mytilus edulis</i>	labo	E2 EE2	↑ [5 et 50 ng/L] ↑ [5 et 200 ng/L]	PCR	G	Ciocan <i>et al.</i> , 2010
<i>Mytilus edulis</i>	labo	pollution pétrolière	↑	ALP	G	Aarab <i>et al.</i> , 2004
<i>Mytilus edulis</i>	labo	E2	pas d'effet	PCR	G	Puinean <i>et al.</i> , 2006
<i>Mytilus edulis</i>	labo	effluent pétrolier (ep) ep + HAP + AP BPA DAP TBDE	↓ [0,5 $\mu$ g/L] pas d'effet pas d'effet ↓ [50 ng/L] pas d'effet	ALP	G	Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2006
<i>Mytilus edulis</i>	labo	E2	pas d'effet	ALP	HL	Riffeser & Hock, 2002
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	labo	NP	↑ [100 $\mu$ g/L]	ALP	GD	Ricciardi <i>et al.</i> , 2008

<i>Patinopecten yessoensis</i>	labo	E2	↑ [50 µg x 9 inj.]	ELISA	G	Osada <i>et al.</i> , 2003
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	labo	BPA AP TBT	↑ [1 µg/L] ↑ [1 µg/L] ↑ [5 à 500 ng/L]	ALP	individu	Gagnaire <i>et al.</i> , 2009
<i>Saccostrea glomerata</i>	labo	EE2	↑ [6,25 à 50 ng/L]	ALP	G	Andrew <i>et al.</i> , 2010
<i>Saccostrea glomerata</i>	labo	EE2 NP	↑ [50 ng/L] ↑ [100 µg/L]	ALP	G	Andrew <i>et al.</i> , 2008
<i>Tapes philippinarum</i>	labo	E2	↑ [5 à 1000 ng/L] ↑ [1000 ng/L] ↑ [5 ng/L]	ALP	HL et GD	Matozzo & Marin, 2008
<i>Tapes philippinarum</i>	labo	E2	↓ [25 ; 50 ; 100 ; 1000 ng/L] ↑ [50 ng/L]	ALP	HL et GD	Matozzo & Marin, 2008
<i>Tapes philippinarum</i>	labo	NP	pas d'effet	ALP	HL et GD	Matozzo & Marin, 2005
<i>Elliptio complanata</i>	terrain	pollution urbaine	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	G	Blaise <i>et al.</i> , 2003
<i>Elliptio complanata</i>	terrain	pollution urbaine	pas d'effet	ALP	G	Gagné <i>et al.</i> , 2011
<i>Elliptio complanata</i>	terrain	pollution urbaine	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	HL	Gagné <i>et al.</i> , 2001b
<i>Mya arenaria</i>	terrain	pollution multiple	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	HL	Blaise <i>et al.</i> , 1999
<i>Mya arenaria</i>	terrain	pollution portuaire	↓ site(s) contaminé(s)	ALP	G	Gagné <i>et al.</i> , 2002
<i>Mytilus edulis</i>	terrain	pollution métallique	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	G	Zorita <i>et al.</i> , 2006
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	terrain	pollution urbaine	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	HL	Pampanin <i>et al.</i> , 2005

**Mâles**

<i>Anodonta cygnea</i>	labo	E2	pas d'effet	ALP	HL	Riffeser & Hock, 2002
<i>Cerastoderma glaucum</i>	labo	NP	↑ [0,0125 à 0,1 mg/L]	ALP	HL et GD	Marin <i>et al.</i> , 2008
<i>Dreissena polymorpha</i>	labo	NP	pas d'effet	ALP	individu	Quinn <i>et al.</i> , 2006
<i>Elliptio complanata</i>	labo	pollution urbaine	↑	ALP	HL	Gagné <i>et al.</i> , 2001b
<i>Mytilus edulis</i>	labo	E2 EE2	↑ [50 ng/L] ↑ [5 à 200 ng/L]	PCR	G	Ciocan <i>et al.</i> , 2010
<i>Mytilus edulis</i>	labo	pollution pétrolière	↑	ALP	G	Aarab <i>et al.</i> , 2004
<i>Mytilus edulis</i>	labo	E2	pas d'effet	PCR	G	Puinean <i>et al.</i> , 2006
<i>Mytilus edulis</i>	labo	effluent pétrolier (ep) ep + HAP + AP BPA DAP TBDE	pas d'effet ↑ [0,5 + 0,1 + 0,1 µg/L] pas d'effet pas d'effet pas d'effet	ALP	G	Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2006
<i>Mytilus edulis</i>	labo	E2	pas d'effet	ALP	HL	Riffeser & Hock, 2002
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	labo	NP	↑ [100 µg/L]	ALP	GD	Ricciardi <i>et al.</i> , 2008
<i>Saccostrea glomerata</i>	labo	EE2	↑ [6,25 à 50 ng/L]	ALP	G	Andrew <i>et al.</i> , 2010
<i>Saccostrea glomerata</i>	labo	EE2 NP	↑ [50 ng/L] pas d'effet	ALP	G	Andrew <i>et al.</i> , 2008
<i>Tapes philippinarum</i>	labo	E2	↓ [100 ng/L]	ALP	HL et GD	Matozzo & Marin, 2008
<i>Tapes philippinarum</i>	labo	NP	↑ [0,1 ; 0,2 mg/L]	ALP	HL et GD	Matozzo & Marin, 2005
<i>Elliptio complanata</i>	terrain	pollution urbaine	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	G	Gagné <i>et al.</i> , 2011
<i>Elliptio complanata</i>	terrain	pollution urbaine	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	HL	Gagné <i>et al.</i> , 2001b

<i>Mytilus edulis</i>	terrain	pollution métallique	pas d'effet	ALP	G	Zorita <i>et al.</i> , 2006
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	terrain	pollution urbaine	↑ site(s) contaminé(s)	ALP	HL	Pampanin <i>et al.</i> , 2005
<b>Juveniles</b>						
<i>Elliptio complanata</i>	labo	NP E2	↑ [250 nmole x 1 inj.] ↑ [50 ; 250 nmole x 1 inj.]	ALP	HL	Gagné <i>et al.</i> , 2001a
<i>Cerastoderma glaucum</i>	labo	NP	↑ [0,0125 à 0,1 mg/L]	ALP	HL et GD	Marin <i>et al.</i> , 2008

Comme souligné par Matozzo et collaborateurs (2008), les études utilisant le biomarqueur Vg montrent que ce sont les bivalves qui ont été principalement utilisés comme espèce modèle, avec en particulier *Elliptio complanata*, *Mytilus edulis*, *Mya arenaria*, *Tapes philippinarum*, *Mytilus galloprovincialis* ou encore *Dreissena polymorpha*.

Ces études montrent que les expérimentations ont été majoritairement conduites au laboratoire. Quelques « études terrain » ont été réalisées à l'aide d'organismes autochtones (biomonitoring passif) ou transplantés (biomonitoring actif). Ces travaux tendent à montrer que la mesure de la Vg est un marqueur pertinent et sensible pour évaluer l'impact des PE dans les milieux aquatiques. D'autre part, les expérimentations en conditions contrôlées au laboratoire ont permis d'identifier certaines substances capables de moduler la synthèse de Vg : l'hormone oestrogène (17 $\beta$ -estradiol) et des analogues de synthèse comme le 17 $\alpha$ -éthinyloestradiol et le nonylphenol. Ces substances ont été largement étudiées et les réponses obtenues tendent à confirmer que la mesure de Vg chez les mollusques, et en particulier chez les bivalves, est un biomarqueur sensible et pertinent pour évaluer l'exposition de ces organismes à des contaminants oestrogéniques (revu dans Porte *et al.*, 2006 ; Matozzo *et al.*, 2008).

Bien que plusieurs méthodes soient disponibles (génomique : PCR quantitative ; protéique : ELISA et ALP), la méthode ALP proposée par Gagné & Blaise (2000) a été très largement utilisée pour mesurer les quantités de Vg chez les mollusques. On constate également que la majorité des études a privilégié la mesure de Vg dans des tissus spécifiques (gonade, glande digestive) ou l'hémolymphe plutôt que sur organisme en entier, pourtant moins contraignante à réaliser. Enfin, on constate que le biomarqueur Vg a été utilisé aussi bien chez les mâles que chez les femelles tandis que les juvéniles ont été très rarement appréhendés.

Pris ensemble, les résultats obtenus chez les mollusques, et principalement chez les bivalves, tendent à indiquer que la modulation de synthèse de Vg chez ces organismes est sensible à l'exposition de PE de type oestrogénique. Par exemple, Quinn et collaborateurs. (Quinn *et al.*, 2004) montrent dans leur étude une augmentation significative des teneurs en Vg chez le mâle et chez la femelle après exposition à des effluents, suggérant une perturbation endocrinienne. Néanmoins, on constate dans cette même étude que l'on retrouve des niveaux de Vg similaires entre les contrôles mâle et femelle. Ceci soulève une interrogation quant à la spécificité de la méthode utilisée (ALP) pour la mesure de Vg, censée être une

protéine femelle-spécifique. Matozzo et collaborateurs (2008) soulignent justement que les efforts devraient être portés sur le développement de méthodologies plus spécifiques, sensibles et reproductibles.

□ *les crustacés*

**Tableau 1.6. Etudes ayant rapporté des modulations de la synthèse de Vg chez des crustacés suite à une exposition au laboratoire ou sur le terrain.**

20HE : 20-hydroxyecdysone ; AF : Acide farnesoïque ; AP : Alkylphénol ; CY : Cyprotérone ; E1 : Estrone ; E2 : 17 $\beta$ -estradiol ; EE2 : 17 $\alpha$ -éthynyl-estradiol ; ep. : effluent pétrolier ; HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques ; MF : Méthyle-farnesoate ; P : Progéstérone ; PBO : Pipéronyle butoxide PonA ; Ponastérone A ; PZ : Propiconazole ; NP: Nonylphénol ; TBDE : TétrabromoDiphényléther. G : Gonade ; GD : Glande Digestive ; HL : Hémolymphhe ; HP : Hépatopancreas

Espèces	Type	Composés	Effet [Concentrations]	Méthodes	Matrices	Références
<b>Femelles</b>						
<i>Carcinus maenas</i>	labo	Cd Cu Zn	↑ [3 $\mu$ g/L] ↑ [15 $\mu$ g/L] ↑ [700 $\mu$ g/L]	ELISA	HL	Martin-Díaz <i>et al.</i> , 2005
<i>Cherax albidus</i>	labo	E2 P	↑ [10-7 mole/L x 8 inj.] ↑ [10-7 mole/L x 8 inj.]	PCR	HP	Coccia <i>et al.</i> , 2010
<i>Cherax albidus</i>	labo	E2 + P P	↑ [10-7 mole/L x 8 inj.] ↑ [10-7 mole/L x 8 inj.]	Western blot	HL	Coccia <i>et al.</i> , 2010
<i>Daphnia magna</i>	labo	PBO PonA CY 20HE	↑ [300 $\mu$ g/L] ↓ [232 $\mu$ g/L] ↓ [2100 $\mu$ g/L] ↓ [481 $\mu$ g/L]	PCR	Individu	Hannas <i>et al.</i> , 2011 Screening de 25 substances
<i>Daphnia magna</i>	labo	vérapamile tramadole	↓ [2,1 mg/L] ↓ [8,5 mg/L]	PCR	Individu	Le <i>et al.</i> , 2011
<i>Daphnia magna</i>	labo	Cd	↓ [1/10 de la CL50]	Microarray	Individu	Poynton <i>et al.</i> , 2007
<i>Daphnia magna</i>	labo	PZ	↓ [0,25 à 1 mg/L]	Microarray	Individu	Soetaert <i>et al.</i> , 2006
<i>Homarus americanus</i>	labo	AF MF 20HE	↑ [1, .3 nM et 13 nM] pas d'effet ↑ [0,67 nM]	PCR	HP	Tiu <i>et al.</i> , 2009
<i>Marsupenaeus japonicus</i>	labo	E2	↑ [3,6 à 3671 nM]	Western blot	G	Yano & Hoshino, 2006
<i>Neocaridina denticulata</i>	labo	chlordane lindane E2	↑ [1 et 10 ng/L] ↑ [0,1 et 1 $\mu$ g/L] ↑ [10 et 100 $\mu$ g/L]	ALP	HL	Huang <i>et al.</i> , 2006
<i>Neomysis integer</i>	labo	E1 méthoprène NP	↓ [1 $\mu$ g/L] ↓ [0, .01 à 100 $\mu$ g/L] ↑ [0, .01 $\mu$ g/L]	ELISA	Individu	Ghekiere <i>et al.</i> , 2006b
<i>Palaemonetes pugio</i>	labo	pyrène	↑ [63 $\mu$ g/L]	ID	HP	Oberdörster <i>et al.</i> , 2000
<i>Procambrus clarkii</i>	labo	Cd Zn	↑ [30 $\mu$ g/L] ↑ [3000 $\mu$ g/L]	ELISA	HL	Martin-Díaz <i>et al.</i> , 2006
<i>Sicyonia ingentis</i>	labo	MF	↓ [1 $\mu$ g x 3 inj.]	ELISA	HL	Paran <i>et al.</i> , 2010
<i>Gammarus sp.</i>	terrain	pollution portuaire	↑ ou ↓ site(s) contaminé(s)	ALP	Individu	Gagné <i>et al.</i> , 2005

Mâles							
<i>Carcinus aestuarii</i>	labo	NP	↑ [0 ,1 à 0 ,8]	ALP	G, GD et HP	Ricciardi <i>et al.</i> , 2008	
<i>Carcinus maenas</i>	labo	NP	pas d'effet	ELISA	HP	Lye <i>et al.</i> , 2008	
<i>Gammarus fossarum</i>	labo	CY NP	↑ [1000 µg/L] ↑ [0,05 µg/L]	PCR	Individu	Xuereb <i>et al.</i> , 2011a	
<i>Neocaridina denticulata</i>	labo	chlordan lindane	↑ [10 ng/L] pas d'effet	ALP	HL	Huang & Chen, 2004	
Juvéniles							
<i>Artemia franciscana</i>	labo	20HE effluent municipal	↑ [0 ,5 à 10 mM] ↑ [0 ,5 à 2 ,5 mM]	ALP	Individu	Gagné & Blaise, 2004	
<i>Balanus amphitrite</i>	labo	NP E2	↑ [1 µg/L] ↑ [1 µg/L]	Western blot	Individu	Billingham <i>et al.</i> , 2000	
<i>Daphnia magna</i>	labo	fénoxycarbe méthoprène MF pyriproxyfène	↓ [15,6 nM] ↓ [15,6 nM] ↓ [15,6 et 156 nM] ↓ [15,6 nM]	PCR	Individu	Tokishita <i>et al.</i> , 2006	
<i>Daphnia magna</i>	labo	fénoxycarbe	↓ [10 ng/L]	PCR	Individu	Kim <i>et al.</i> , 2011	
<i>Palaemon elegans</i>	labo	NP E2	↑ [0,2 à 20 µg/L] ↓ [0,2 à 20 µg/L]	ELISA	Individu	Sanders <i>et al.</i> , 2005	

Comme souligné par Matozzo et collaborateurs (2008), les études utilisant le biomarqueur Vg montrent, qu'après les bivalves, les crustacés ont été largement utilisés comme espèces modèles : les décapodes principalement, et dans une moindre mesure chez le cladocère *Daphnia magna*, le mysid *Neomysis integer*, l'amphipode *Gammarus fossarum* ou encore le copépode *Paracyclopsina nana*.

Ces études montrent que les expérimentations ont été conduites en majorité au laboratoire en conditions contrôlées, à l'exception de quelques « études terrain ». Les expérimentations au laboratoire ont permis d'identifier quelques substances capables de moduler la synthèse de Vg : principalement des pesticides, des vertébrostéroïdes et des hormones de crustacés. Ces substances ont été largement étudiées et les réponses obtenues tendent à confirmer que la mesure de la Vg chez les crustacés est un biomarqueur sensible et pertinent pour évaluer l'exposition de ces organismes à des contaminants oestrogéniques (Matozzo *et al.*, 2008 ; Porte *et al.*, 2006). A l'inverse, Hannas et collaborateurs (2011) ont contesté chez la daphnie l'utilisation de ce marqueur pour évaluer la présence de contaminants oestrogéniques ; rappelant que la perturbation des voies hormonales par des analogues à l'ecdystéroïde et au méthyle-farnesoate semble plus pertinente chez les crustacés.

Plusieurs méthodes sont disponibles pour la mesure de Vg chez les crustacés (génomique : PCR quantitative ; protéique : ELISA et ALP). On constate également que la mesure de Vg a été privilégiée

dans des tissus spécifiques (gonade, glande digestive et/ou hepatopancreas) ou l'hémolymphe chez les décapodes ; et sur organisme en entier, chez les crustacés de petite taille tels que les cladocères et les pécaricides. Enfin, on constate que le biomarqueur Vg a été utilisé aussi plus souvent chez les femelles que chez les juvéniles ou les mâles (revu dans Matozzo *et al.*, 2008)

L'ensemble des études menées chez les invertébrés permet de tirer trois enseignements quant à l'utilisation de la mesure de la Vg comme marqueur de perturbation endocrinienne. [1] Relativement peu d'études ont été menées sur le terrain. En effet, les expérimentations menées sont en majorité faites au laboratoire en conditions contrôlées sur des substances modèles (vertebrostéroïdes et IRC), et ceci afin d'en apprendre plus sur la régulation (ou la dérégulation) endocrinienne chez plusieurs groupes d'invertébrés (mollusques et crustacés). [2] Au niveau des méthodes utilisées pour mesurer la Vg, on remarque deux tendances avec : (i) la mesure ALP qui est largement utilisée chez les mollusques et (ii) les approches génomiques qui sont également utilisées chez les crustacés, tout comme les essais ELISA chez le groupe des décapodes qui possède la plus grande collection d'anticorps anti-Vg. Malgré sa facilité de développement (comme on l'a vu pour les mollusques), la méthode ALP a été moins souvent utilisée chez les crustacés en raison de son manque de fiabilité (Gagné *et al.*, 2005). [3] Les expérimentations ont été principalement effectuées chez la femelle. Pourtant, l'induction de Vg chez les mâles et les juvéniles est une utilisation plus pertinente du biomarqueur Vg pour évaluer l'exposition spécifique à des composés PE. En effet, la définition des niveaux de base et des variations naturelles de la Vg liés au cycle de vie concerne particulièrement les femelles chez qui, la synthèse de Vg est normalement présente et varie en fonction du cycle de reproduction. Par conséquent, lors d'utilisation d'organismes femelles, il est indispensable de pouvoir définir exactement dans quel stade de leur cycle de reproduction elles se trouvent, et ceci afin de pouvoir évaluer correctement si les teneurs en Vg observées sont normales ou non. Ceci implique l'existence de critères morphologiques et/ou physiologiques, ce qui n'est pas toujours le cas.

#### **1.2.4. Variabilité intrinsèque des biomarqueurs et obtention de valeurs de référence**

##### **1.2.4.1. Facteurs abiotiques**

De manière générale, les marqueurs présentent des variations saisonnières et spatiales. Les marqueurs de reproduction sont sujets à des variations saisonnières qui ont été soulignées sur des espèces utilisées pour des biotests *in situ* : des mollusques (Bodin *et al.*, 2004 ; Gust *et al.*, 2011), des échinodermes (Garmendia *et al.*, 2010) ou encore des crustacés (Costa & Costa, 1999 ; Maranhão & Marques, 2003 ; Castellani & Altunbaş, 2006). Les multiples facteurs environnementaux (*e.g.*, température, conductivité, oxygénation, salinité) sont en partie à l'origine de cette variabilité spatiale et temporelle de la réponse des biomarqueurs.



Chez les espèces aquatiques, la température de l'eau représente un des facteurs les plus influents. En effet, la plupart des espèces aquatiques sont ectothermes. Ainsi, les variations de température peuvent influencer de façon non négligeable l'activité métabolique des organismes. L'influence de la température a été démontrée sur de nombreux marqueurs (*i.e.*, sub-individuels et individuels) et pour une grande diversité d'espèces (*e.g.*, crustacés, mollusques, poissons). D'autres facteurs peuvent moduler la réponse des marqueurs : par exemple le pH (Felten & Guerold, 2001 ; Vidal *et al.*, 2002) ou encore l'oxygénation de l'eau (Vidal *et al.*, 2002 ; Wiklund & Sundelin, 2004) qui peuvent notablement influencer sur les réponses des biotests lors d'expérimentations *in situ*. Enfin, dans les milieux marins et saumâtres, la salinité est connue pour être un facteur notable expliquant la variabilité de nombreux marqueurs sub-individuels (Livingstone *et al.*, 2000 ; Mouneyrac *et al.*, 2001 ; Leung *et al.*, 2002 ; Damiens *et al.*, 2004 ; Martin-Diaz *et al.*, 2004 ; Werner, 2004 ; Pfeifer *et al.*, 2005 ; Menezes *et al.*, 2006 ; Moreira *et al.*, 2006 ; Cailleaud *et al.*, 2007 ; van den Heuvel-Greve *et al.*, 2007 ; Kalman *et al.*, 2010 ; Krell *et al.*, 2011) et individuels (Prato *et al.*, 2008 ; Kevrekidis *et al.*, 2009).

#### 1.2.4.2. Facteurs biotiques

Une autre partie de la variabilité de la réponse des marqueurs est imputable à l'influence de multiples facteurs biotiques : physiologiques (*e.g.*, taille, sexe, statuts énergétique et reproducteur) et écologiques (*e.g.*, parasitisme, compétition, prédation, inter-population). Concernant l'utilisation de la mesure de vitellogénine comme marqueur, le sexe est un facteur incontournable (*i.e.*, forte différence inter-sexe) qui résulte de la fonction « femelle-spécifique » de cette protéine de réserve de l'œuf. De nombreux marqueurs moléculaires, physiologiques, comportementaux ou encore les traits de vie peuvent être fortement corrélés à la taille (ou au poids) des organismes. Le niveau d'activité enzymatique mesuré, souvent utilisé comme marqueur, est clairement dépendant du poids de l'organisme analysé : par exemple, pour la mesure d'AchE chez le crustacé *Gammarus fossarum* (Xuereb *et al.*, 2009a) ou encore pour des mesures d'activités enzymatiques chez le mollusque *Scorbicularia plana* (Fossi Tankoua *et al.*, 2011). Un autre facteur potentiel est le statut reproducteur des organismes analysés qui peut influencer de façon significative la réponse de certains marqueurs : chez les crustacés par exemple, la métallothionéine (Mouneyrac *et al.*, 2001 ; Geffard *et al.*, 2002) ou encore la quantité de dommage à l'ADN (Lacaze *et al.*, 2011a).

Enfin, certains facteurs écologiques comme le parasitisme peuvent influencer notablement sur le taux d'alimentation (Fielding *et al.*, 2003) ou encore l'intersexualité (Ford, 2008) chez les crustacés amphipodes.

### 1.2.4.3. Valeurs de référence

Dans ce contexte, la perspective d'une utilisation de biomarqueurs dans le cadre du biomonitoring environnemental est de limiter l'impact des facteurs de confusion. Ainsi, pour pouvoir comparer des sites entre eux lors de campagnes de biomonitoring à large échelle, le contrôle de l'influence de certains facteurs biotiques ainsi que la définition de gammes de valeurs de référence sont des étapes importantes si l'on veut améliorer la fiabilité de la mesure des marqueurs et donc l'interprétation biologique des réponses observées (e.g., dissocier un effet environnemental d'un stress toxique).

D'une part, une façon relativement simple pour définir des outils de diagnostic robustes utilisables sur le terrain est de contrôler l'influence de ces facteurs de confusion. Pour cela, il est nécessaire d'adapter les tests développés au laboratoire pour des expositions *in situ*. C'est dans ce contexte qu'ont été proposées les méthodologies dites de « *biomonitoring actif* » basées sur l'observation d'organismes standardisés et transplantés sur site (Liber *et al.*, 2007 ; Ji *et al.*, 2010), par opposition à l'observation d'organismes autochtones qualifiée de « *biomonitoring passif* ». Dans ce contexte, des protocoles d'exposition d'organismes transplantés ont été développés et proposés pour la mesure de multiples marqueurs (Maltby *et al.*, 2002 ; Oikari, 2006 ; Schmitt *et al.*, 2010). Ces méthodes, bien qu'elles s'éloignent un peu de l'impact direct sur les communautés en place, sont particulièrement intéressantes pour contrôler et ainsi limiter la variabilité des réponses des marqueurs en lien avec les facteurs biotiques ; et présentent de nombreux avantages (Oikari, 2006 ; Liber *et al.*, 2007). Tout d'abord, elles permettent de contrôler les interactions de type compétition ou prédation en isolant les organismes suivis durant l'expérimentation des autres organismes du milieu, tout en les maintenant dans des conditions réalistes d'exposition. De plus, l'utilisation d'encagements permet de sélectionner des organismes standards (e.g., sexe, taille, statut reproducteur), provenant d'une même population de référence et acclimatés au laboratoire. Enfin, la durée de l'exposition est ainsi contrôlée et identique entre les différents sites d'études, contrairement au prélèvement d'organismes autochtones dont on ne peut pas déterminer la durée d'exposition. La transplantation d'organismes dans le cadre de biomonitoring est une approche utilisée dans de nombreuses études chez des crustacés (Gerhardt *et al.*, 1998 ; Schulz, 2003 ; Dedourge-Geffard *et al.*, 2009 ; Coulaud *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011b), chez des mollusques (Taleb *et al.*, 2009 ; Gust *et al.*, 2010 ; Schmitt *et al.*, 2010) ou encore chez des poissons (Ji *et al.*, 2010 ; Klobučar *et al.*, 2010 ; Hanson & Larsson, 2011).

D'autre part, afin de pouvoir comparer des sites lors de campagnes de *biomonitoring actif* à large échelle, une possibilité réside dans la définition de gammes de valeurs de référence tenant compte de la variabilité saisonnière et spatiale des marqueurs (Xuereb *et al.*, 2009a ; Hagger *et al.*, 2010 ; Hanson *et al.*, 2010 ; Lacaze *et al.*, 2011a). Afin de définir de telles gammes, un suivi de plusieurs sites de référence durant différentes saisons est nécessaire. Dans ce type d'approche, le choix des sites de référence

apparaît ainsi crucial, ce qui constitue une limite importante. Bien que cette méthode puisse être appropriée dans certains cas, elle apparaît problématique lorsque les facteurs environnementaux sont à l'origine d'une forte variabilité naturelle. En effet, la gamme de référence ainsi définie sera alors très variable et les valeurs seuils peu discriminantes ; ce qui conduit à un manque important de puissance statistique lors de la comparaison avec les réponses observées dans un site potentiellement impacté. L'une des alternatives pour définir de telles gammes de référence consiste à caractériser l'influence des facteurs environnementaux (Xuereb *et al.*, 2009a ; Coulaud *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011a) afin de pouvoir prédire le niveau de base à partir des caractéristiques des milieux et ainsi corriger les réponses obtenues chez les organismes transplantés.

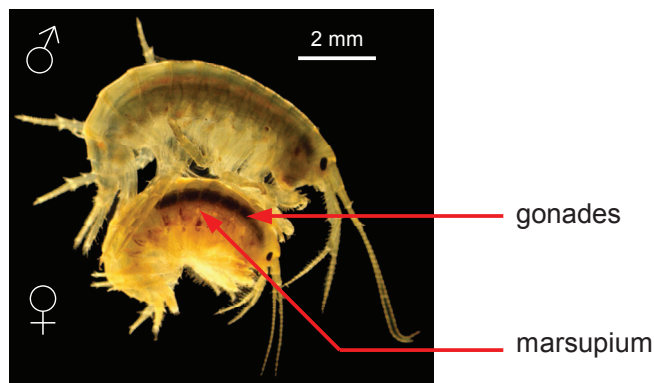
### 1.3. MODELE BIOLOGIQUE : *GAMMARUS FOSSARUM*

Plus de 4500 espèces appartiennent au sous-ordre des Crustacés Gammaridae (ordre des amphipodes). Parmi les amphipodes, les gammaridae sont les espèces les plus représentées et les plus largement répandues. Ils sont présents dans le milieu marin, dulçaquicole et terrestre. Le genre *Gammarus*, réparti dans tout l'hémisphère nord, comprend plus d'une centaine d'espèces dont la majorité sont dulçaquicoles (Barnard & Barnard, 1983).

#### 1.3.1. Systématique du gammare *Gammarus fossarum*

L'espèce sentinelle choisie pour mes travaux de thèse est l'invertébré dulçaquicole *Gammarus fossarum* (Figure 1.15) qui occupe la classification systématique suivante (Martin & Davis, 2001) :

embranchement : **Arthropoda** ;  
super-classe : **Crustacea** ;  
lasse : **Malacostracea** ;  
sous-classe : **Eumalacostracea** ;  
super-ordre : **Péracaridea** ;  
ordre : **Amphipoda** ;  
sous-ordre : **Gammaridea** ;  
genre: ***Gammarus*** ;  
espèce : ***fossarum*** (Koch, 1835).



**Figure 1.15.** Photo de deux individus appartenant à l'espèce *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) représentant un mâle (♂) et une femelle (♀) formant un précopula ou en phase d'amplexus.

### 1.3.2. Ecologie

Le genre *Gammarus* est un constituant commun des communautés de macro-invertébrés d'eau douce. Il est le genre d'amphipode épigé le plus représenté en milieu dulçaquicole, avec près de 110 espèces dont 1/5 seulement sont marines (Barnard & Barnard, 1983 ; Tachet *et al.*, 2000). Les espèces du genre *Gammarus* (e.g., *G. fossarum*) occupent une place importante au sein de leur écosystème. Généralement présents en forte densité, les gammarses représentent une importante source de nourriture pour différentes espèces de macro-invertébrés, de poissons, d'amphibiens et d'oiseaux (Welton, 1979 ; Friberg *et al.*, 1994 ; MacNeil *et al.*, 2002). Ainsi, Welton (1979) a évalué que plus de 60 % de la production annuelle de *G. pulex* pouvait être dévorée par les poissons. D'autre part, ce sont des organismes déchiqueteurs (en anglais « shredders ») qui se nourrissent préférentiellement de matériel détritique tel que les feuilles (Felten, 2003). Selon Maltby et collaborateurs (2002), ils jouent donc un rôle clef dans l'incorporation du matériel organique terrestre fixé dans les réseaux trophiques d'eau douce et dans la redistribution de la matière et de l'énergie.

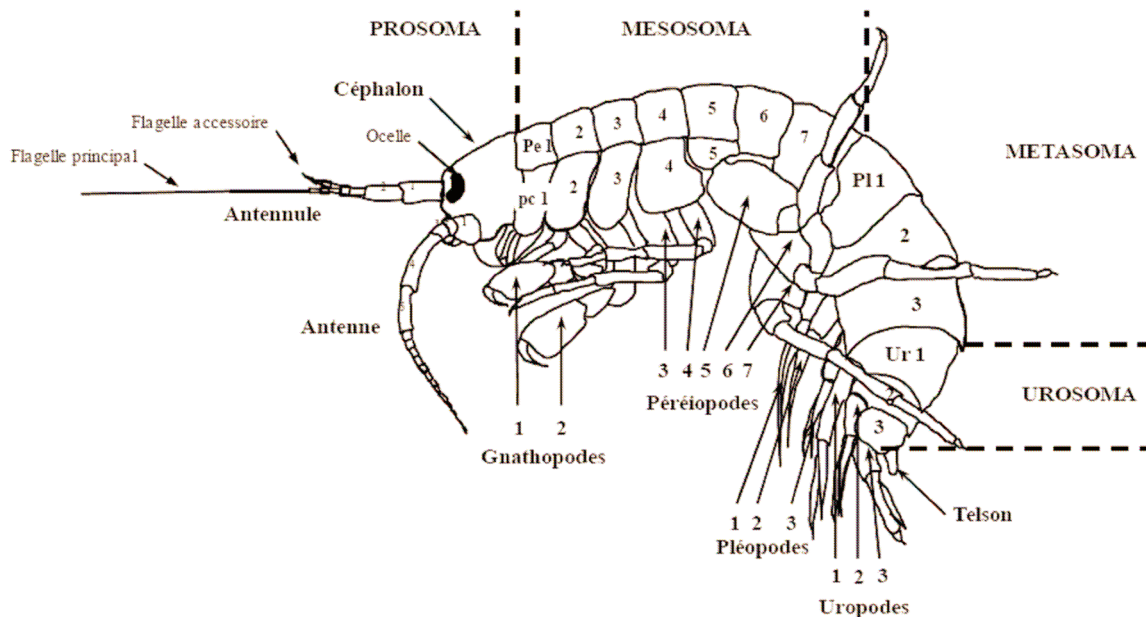
*Gammarus fossarum* est une espèce itéropare et sa durée de vie est limitée à 2 ans. Il occupe les ruisseaux et les rivières de plaine et de moyenne montagne, caractérisés par un fort courant et de fortes teneurs en oxygène (Tachet *et al.*, 2000). Les individus sont le plus souvent associés aux substrats organiques (e.g., pool détritique, bryophytes, végétation rivulaire) ainsi qu'aux substrats minéraux de grande taille, sur lesquels ils peuvent se nourrir et trouver refuge ; les densités pouvant atteindre plusieurs milliers d'organismes au m<sup>2</sup> (Felten, 2003). L'aire de répartition géographique de *G. fossarum* s'étend des Pyrénées au milieu des Balkans, en incluant l'Europe centrale (Barnard & Barnard, 1983) (**Figure 1.16**).



**Figure 1.16.** Aire de répartition géographique de l'amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum* en Europe (selon Barnard & Barnard, 1983).

### 1.3.3. Morphologie

Le corps des amphipodes est divisé en quatre régions distinctes comprenant de l'avant vers l'arrière, [1] le prosoma (i.e., tête), [2] le mésosoma (i.e., thorax) ainsi que [3] le métasoma et [4] l'urosoma qui forment l'abdomen (revu par Chevreux & Fage, 1970 ; Roux, 1970) (**Figure 1.17**) :



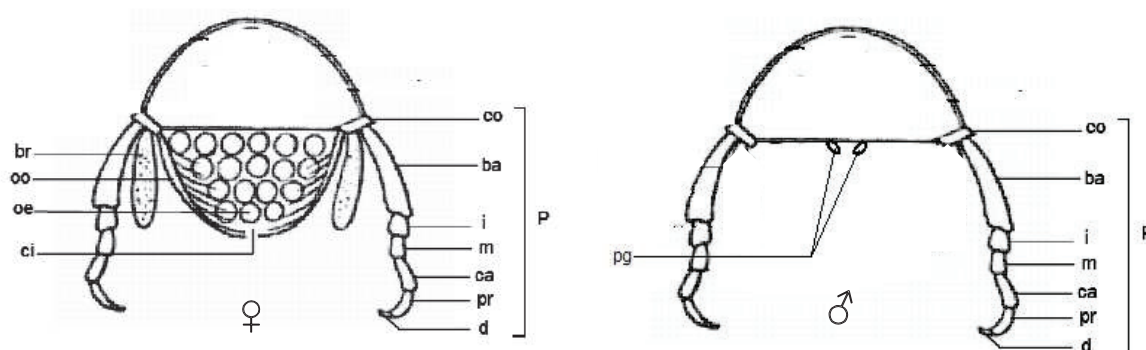
**Figure 1.17.** Schéma d'une vue latérale d'un *Gammaridae* (modifié de Chevreux & Fage, 1970).

*Pc 1-7* : plaques coxales 1-7 ; *Pe 1-7* : périomères 1-7 ; *Pl 1-3* : pléomères 1-3 ; *Ur 1-3* : uromères 1-3.

[1] Le prosoma (ou céphalon) est constitué d'une seule pièce qui résulte de la fusion des métamères le constituant (i.e., six segments céphaliques, plus le premier segment thoracique). Le céphalon porte latéralement une paire d'yeux composés et sessiles (ocelles), une paire d'antennules (antennes 1) et une paire d'antennes (antennes 2) qui se prolongent vers l'avant, ainsi que quatre paires d'appendices masticateurs situées sur la face inférieure (labre, mandibules, labium, maxillules et maxilles).

[2] Le mésosoma (ou péréion) compte sept articles libres, chacun muni d'une paire d'appendices uniramés constituant les péréiopodes. Les deux premiers péréiopodes sont préhensibles et fixateurs. Ils constituent les gnathopodes 1 et 2. Les péréiopodes 3 à 7 sont locomoteurs. Chaque péréiopode est constitué, de la base vers son extrémité, d'un coxopodite, d'un basipodite, d'un ischiopodite, d'un méropodite, d'un carpopodite, d'un propodite et d'un dactylopodite. Chez les femelles, la face interne des coxopodites de la deuxième paire de gnathopodes et des trois paires de péréiopodes suivants porte une extension lobiforme, appelée oostégite. Les oostégites forment le planché d'une chambre incubatrice (i.e., marsupium) au sein de laquelle les oeufs fécondés pourront se développer jusqu'à éclosion (**Figure 1.18**).

Chez les mâles, la face ventrale de la fin du thorax, au niveau du 7<sup>e</sup> et dernier périomère du mésosoma présente une paire de papilles génitales (**Figure 1.18**). La cavité ventrale qui abrite également les branchies est délimitée latéralement par des plaques coxales.



**Figure 1.18.** Schéma d'une coupe transversale de *Gammaridae* au niveau du mésosoma d'une femelle (♀), et entre le 7<sup>e</sup> périomère du mésosoma et le 1<sup>er</sup> pléomère du métasoma d'un mâle (♂) (modifié d'après Chevreux & Fage, 1970).

*ba*, basipodite ; *br*, branchie ; *c*, coeur ; *ca*, carpopodite ; *ci*, chambre incubatrice ; *cn*, chaîne nerveuse ; *co*, coxopodite ; *d*, dactylopodite ; *h*, caecum hépatique ; *i*, ischiopodite ; *m*, mérupodite ; *oe*, oeufs ; *oo*, oostégite ; *pg*, papille génitale ; *pr*, propodite ; *P*, périopode ; *td*, tube digestif

[3] Le métasoma (ou pléon) est constitué de trois segments libres. Leurs tergites se prolongent latéralement en lamelles plus ou moins grandes appelées les plaques épimérales. Chaque segment porte une paire d'appendices biramés nommés les pléopodes. Ces pléopodes, en perpétuels mouvements synchronisés, jouent un rôle important dans la locomotion mais également dans la ventilation de la cavité branchiale ainsi que de la poche incubatrice chez les femelles.

[4] L'urosoma, terminé par un court telson, est constitué de trois segments libres qui diminuent en taille de l'avant vers l'arrière. Chacun est muni d'une paire d'appendices biramés dénommés uropodes. Les uropodes 3 ont une partie interne (*i.e.*, endopodite) généralement plus courte que l'externe (*i.e.*, exopodite).

### 1.3.4. Critères morphologiques pour l'identification de l'espèce

Le genre *Gammarus* regroupe un ensemble d'amphipodes exclusivement aquatiques, à la fois marin, estuarien ou dulçaquicole et qui se distingue par son corps lisse avec quelques épines et soies n'existant que sur le dos de l'urosoma. La **Figure 1.19** présente une classification avec les clefs de détermination de plusieurs espèces du genre *Gammarus* et notamment les espèces *pulex*, *wautieri* et *fossarum*. De façon générale, l'endopodite de l'uropode 3 est toujours présent et bien développé (toujours supérieur à 1/3 de l'exopodite) (Roux, 1970 ; Karaman & Pinkster, 1977 ; Eggers & Martens, 2001).

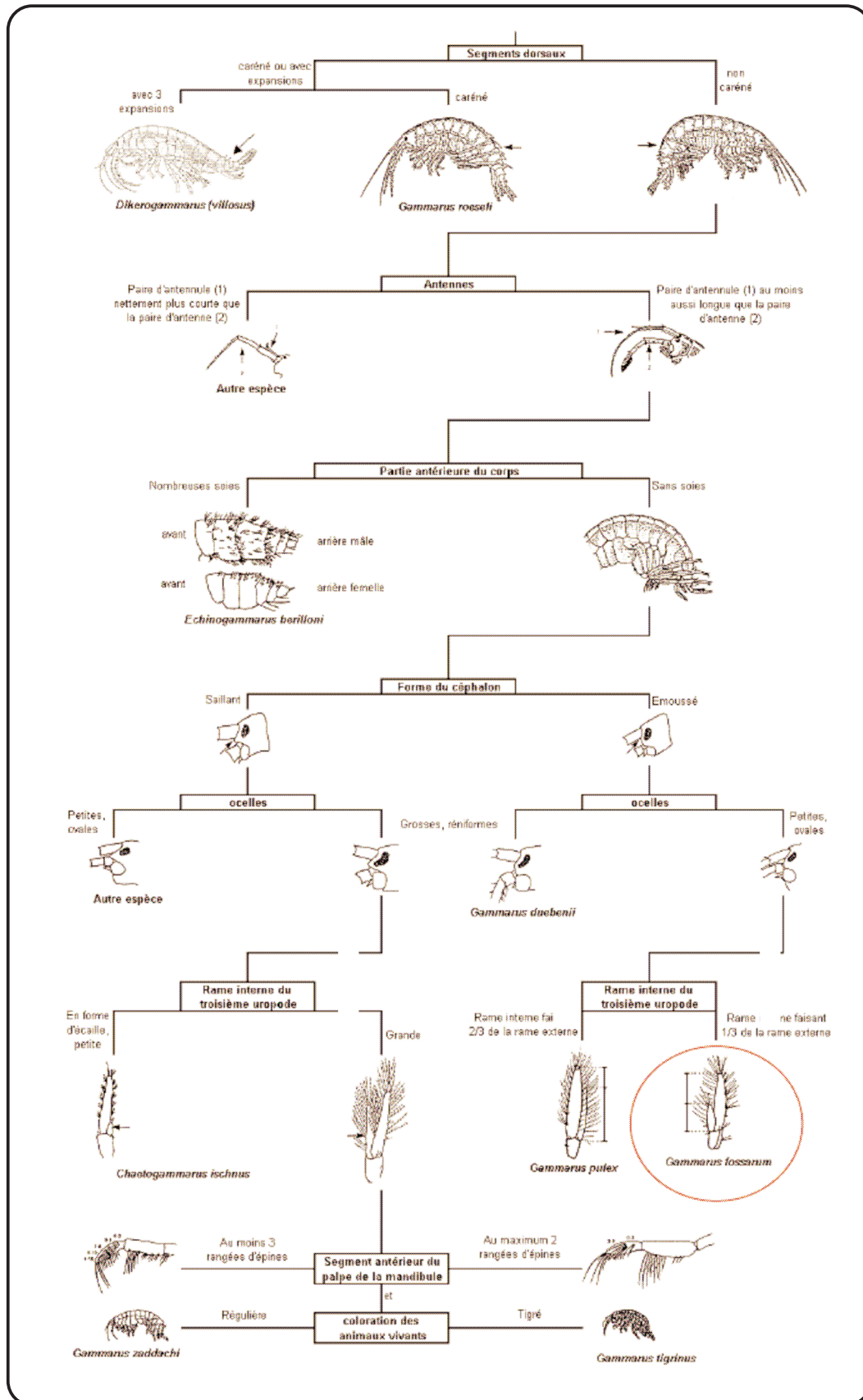


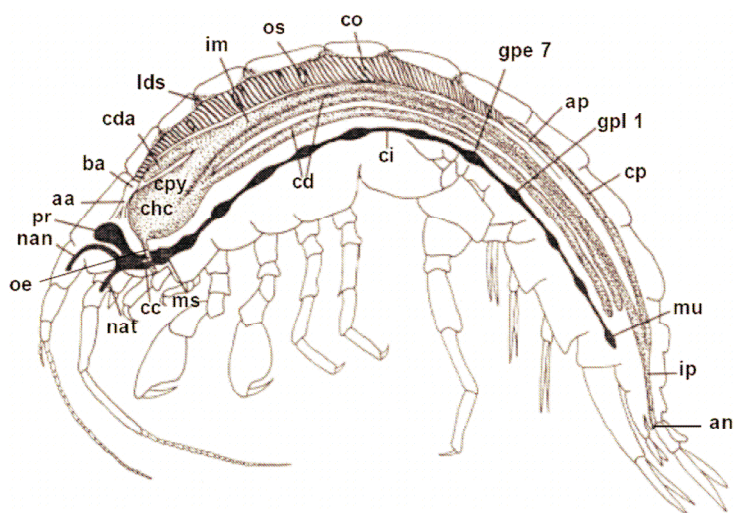
Figure 1.19. Synthèse des clés d'identification de *Gammaridae* (d'après Felten, 2003).



Les espèces *pulex*, *wautieri* et *fossarum* se distinguent par détermination du rapport endopodite/exopodite de l'uropode, et de la morphologie des antennes 2. L'espèce « *fossarum* » se caractérise par : [1] une cuticule non carénée, [2] l'absence de rayures sur le corps, [3] de petites ocelles de formes ovales, [4] un rapport endopodite/exopodite (de l'uropode 3) compris entre 0.40 et 0.60, et [5] des antennes portant un article 4 plus court que l'article 5, munies de longues soies supérieures ou égales à la largeur de l'article et insérées en 6 ou 7 points, voire 8 exceptionnellement (Roux, 1970 ; Karaman & Pinkster, 1977 ; Eggers & Martens, 2001).

### 1.3.5. Anatomie

La **Figure 1.20** montre une coupe longitudinale d'un *Gammaridae*, permettant de replacer les différents organes principaux.



**Figure 1.20.** Coupe latérale d'un *Gammaridae* présentant les principaux viscères le composant. (d'après Schmitz, 1992).

*aa*, aorte antérieure ; *an*, anus ; *ap*, aorte postérieure ; *ba*, bulbe artériel ; *cc*, connexion circumoesophagiale ; *cd*, cæcum digestifs ; *cda*, cæcum dorsal antérieur ; *chc*, chambre cardiaque ; *ci*, connexion intersegmentaire ; *co*, cœur ; *cp*, cæcum postérieur ; *cpy*, chambre pylorique ; *gpe*, ganglion péréionique 7 ; *gpl*, ganglion pléonique 1 ; *im*, intestin moyen ; *ip*, intestin postérieur ; *lds*, ligament dorsal suspendu ; *mu*, masse urosomique (fusion des ganglions abdominaux 4-6) ; *ms*, masse suboesophagique ; *nan*, nerf antennulaire ; *nat*, nerf antennaire ; *oe*, oesophage ; *pr*, protocérébrum.

#### 1.3.5.1. Appareil digestif

L'appareil digestif est constitué d'un simple tube, presque entièrement rectiligne et cylindrique dans toute son étendue. Cependant, dans sa partie antérieure, il s'élargit pour former un sac ovoïde représentant l'estomac (*chc*, *cpy*). En avant de « l'estomac » se trouve l'oesophage s'ouvrant entre le

labrum et le labium formant la bouche. En arrière de « l'estomac » s'insère l'intestin moyen (im), s'étendant du deuxième segment du mésosoma au premier segment du métasoma. De part et d'autre se trouvent, ventralement, deux paires de cæcum digestif (cd) et, dorsalement, les organes reproducteurs. Chaque paire de cæcum digestif se rejoint dans la partie antérieure en un tronc unique débouchant dans la chambre cardiaque (chc). L'intestin postérieur (ip), auquel s'insère une paire de cæcum, se termine par un orifice, ou anus (an), positionné en dessous du telson. Un septième cæcum, présent au niveau dorsal dans la partie antérieure, se jette dans l'intestin moyen. Les cæca sont les principaux sites de production d'enzymes digestives et présentent un rôle dans l'absorption, le stockage énergétique et l'excrétion via les glandes antennaires (Chevreux & Fage, 1970 ; Schmitz, 1992 ; Felten, 2003).

### 1.3.5.2. Système nerveux

Ce système comprend un cerveau ou protocérébrum (pr), composé de deux grands lobes reliés par des nerfs aux ocelles, aux antennes (nat) et aux antennules (nan). Le protocérébrum est relié à une chaîne ganglionnaire située le long de la partie ventrale de l'intestin. Cette chaîne se compose d'une paire de ganglions soudés ensemble pour chacun des segments du mésosoma et du métasoma. Dans le céphalon et l'urosoma, les ganglions sont réunis respectivement en une masse suboesophagique (ms) et une masse urosomique (mu). De ces ganglions et masses, reliés entre eux par des connexions nerveuses intersegmentaires (ci), partent des filets nerveux qui desservent chaque appendice (périopodes, uropodes, pièces buccales) (Chevreux & Fage, 1970 ; Schmitz, 1992 ; Felten, 2003).

### 1.3.5.3. Appareil circulatoire

La circulation hémolympatique s'effectue au moyen d'un coeur (co) mais peut aussi être affectée par des mouvements corporels, squelettomusculaires ainsi que par des contractions stomacales. Le coeur, positionné dorsalement au dessus de l'appareil digestif est un tube cylindrique ouvert à ses deux extrémités. Il est entouré d'une sorte de sac rempli d'hémolymphe, nommé péricarde (ou encore hémocoèle), et s'étend sur presque toute la longueur du mésosome. Il est suspendu dans le péricarde par des bandes élastiques de tissu connectif nommées ligaments dorsaux suspendus (lds). Le contrôle nerveux des battements cardiaques et de la circulation hémolympatique est localisé dans la masse suboesophagique (ms).

L'hémolymphe passe dans deux courtes aortes séparées du coeur par une valvule à deux lèvres, dans un système de lacunes. Dans la partie antérieure, après un bulbe artériel (ba), l'hémolymphe est canalisée dans deux artères latérales et dans l'aorte antérieure (aa) qui se prolonge jusqu'à la tête et entoure le protocérébrum. Cette aorte se divise elle même en cinq types d'artères : (i) l'artère cardiaque allant de la surface convexe antérieure de la chambre cardiaque au cæcum dorsal antérieur (cda), (ii) l'artère oesophagique prenant naissance ventralement dans la chambre cardiaque (chc) et s'étendant dans

un large sinus ventral alimentant la masse suboesophagique (ms) et la chaîne nerveuse, (iii) les artères ophtalmiques fournissant la région céphalique en arrière des ocelles, (iv) les artères antennaires approvisionnant la région céphalique occupée par les glandes antennaires et (v) les artères antennulaires alimentant la région à la base des antennules.

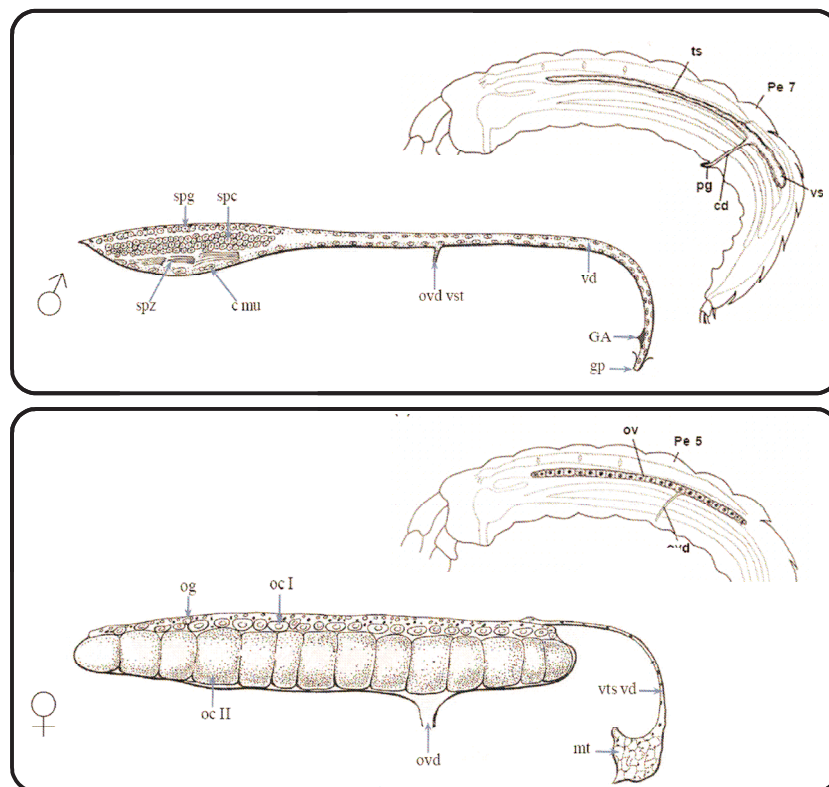
L'aorte postérieure (ap), quant à elle, se prolonge dans le métasome puis se perd dans un sinus ventral (cavité remplie d'hémolymphe) qui envoie l'hémolymphe dans les appendices et les branchies. Des vaisseaux péricardiques ramènent ensuite l'hémolymphe dans le péricarde, d'où elle reviendra dans le coeur, après franchissement de valvules ostiales, grâce à des ouvertures latérales nommées ostium afférent (trois paires existent dans le coeur des gammares) (Chevreux & Fage, 1970 ; Schmitz, 1992).

#### 1.3.5.4. Appareil reproducteur

L'appareil génital est composé de deux organes fusiformes indépendants situés sous le coeur, au-dessus du tube digestif et des caeca hépatiques. Ils s'étendent du 2<sup>ième</sup> au 7<sup>ième</sup> segment du mésosoma et sont entourés par une gaine conjonctive qui se prolonge, antérieurement et postérieurement, chez la femelle uniquement, par un fin filament jouant le rôle de cordon suspenseur (Le Roux, 1933) (**Figure 1.21**, ci-contre).

L'appareil génital mâle est constitué par une paire de tubes accolés à l'intestin et aux caeca hépatiques. Il est divisé en trois régions : les testicules (ts), la vésicule séminale (vs) et le canal déférent (cd). Les organes présentent, au niveau du 5<sup>ième</sup> segment, un étranglement séparant la région antérieure ou testicule, de la vésicule séminale qui s'étend jusqu'au 7<sup>ième</sup> segment et se prolonge par le canal déférent. Les deux vas déférents aboutissent séparément à deux papilles génitales situées en position ventrale du 7<sup>ième</sup> segment, de part et d'autre de la ligne médiane ventrale. Attachées au niveau de la région sub-terminale des vas déférents, se situent les glandes androgènes. La spermatogenèse s'effectue de l'extrémité antérieure vers la région postérieure du testicule (Charniaux-Cotton, 1965).

Chez la femelle, les ovaires (ov) occupent le même emplacement que les testicules chez les mâles et ont à peu près la même forme. Les oviductes (ovd) se détachent du tiers inférieur de chaque ovaire, au niveau du 5<sup>ième</sup> péréiomère et se dirigent obliquement sous les plaques coxales, vers la face ventrale de l'animal. Les deux oviductes aboutissent séparément à la base des oostégites, de part et d'autre de la ligne médiane ventrale. Les oeufs sont déposés dans le marsupium formé par les oostégites. C'est là que les oeufs achèvent leur développement et éclosent. Dans l'ovaire, les cellules reproductrices sont disposées en rangées longitudinales, plus ou moins enchevêtrées ; chacune d'elles correspondant à des degrés de développement différents. L'évolution de ces cellules se fait du bord interne vers le bord externe de l'ovaire. La première rangée, formée essentiellement d'ovogonies, constitue la zone germinative. Puis, viennent les ovocytes primaires et les ovocytes secondaires.



**Figure 1.21.** Coupes longitudinales de *Gammaridae* mâle et femelle : localisation du système reproducteur au niveau du mésosoma et du métasoma (d'après Schmitz, 1992) et structure de l'appareil génital (d'après Charniaux-Cotton, 1965).

♂ : jeune mâle (la vésicule séminale n'est pas encore différenciée) ; ♀ : femelle en vitellogenèse ; *c mu* : cellules à mucus ; *GA* : glande androgène ; *gp* : papille génitale ; *mt* : tissu mésenchymatique indifférencié ; *oc I* : ovocyte en vitellogénèse primaire ; *oc II* : ovocyte en cd, canal déférent ; *ov*, ovaire ; *ovd*, oviducte ; *Pe 5, 7*, péréionère 5, 7 ; *pg*, papille génitale ; *vs*, vésicule séminale ; *ts*, testicule.

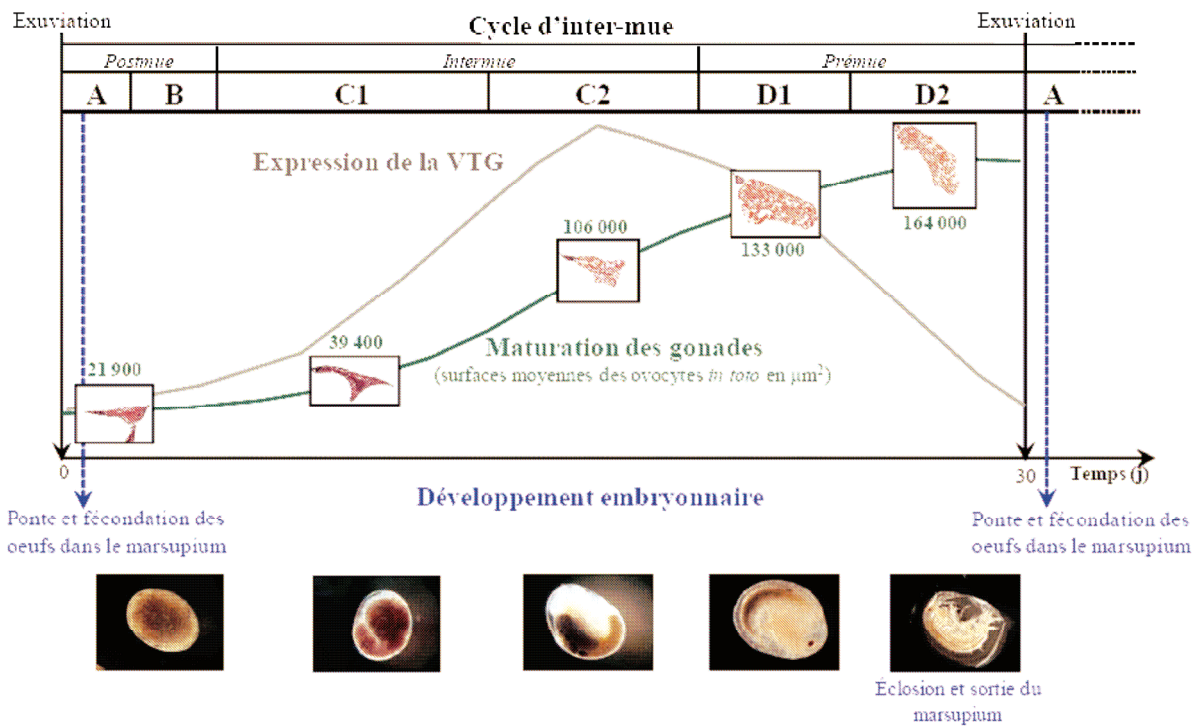
### 1.3.6. Reproduction

Les gammares sont des organismes gonochoriques et itéropares. Leur période de reproduction s'étendant sur la quasi-totalité voire la totalité de l'année, avec des pics de reproduction, est généralement observée au printemps et à la fin de l'été (Le Roux, 1933 ; Felten, 2003 ; Coulaud, 2012). Chez les crustacés pécararides tels que les amphipodes ou les mysidacés, le cycle de reproduction des femelles est rythmé par le cycle d'inter-mue (Charniaux-Cotton, 1965 ; Blanchet-Tournier, 1980).

#### 1.3.6.1. Cycles d'inter-mue et de reproduction

Chez la femelle *G. fossarum*, les cycles de mue et de reproduction ont été caractérisés précisément (Geffard *et al.*, 2010) (**Figure 1.22**). Le cycle de mue dure environ 30 jours, à 12°C, chez la femelle adulte et se découpe en 5 stades dont la détermination se base sur l'observation microscopique du

développement de la nouvelle cuticule et du décollage de l'ancienne au niveau de la griffe des péréopodes 3 et 4. Chez les femelles sexuellement actives, la maturation des gonades (*i.e.*, vitellogenèse) et le développement des embryons dans le marsupium se déroulent de manière parfaitement synchrone, à chaque cycle d'inter-mue. Les juvéniles éclos, issus de la ponte précédente, sortent du marsupium peu de temps avant l'exuviation de leur mère. Suite à cette exuviation, la femelle pond les oeufs dans le marsupium qui seront aussitôt fécondés par un mâle. Parallèlement, dans la gonade, un nouveau lot d'ovocytes primaires entre en vitellogenèse. L'exuviation peut ainsi être considérée comme le point de départ et d'aboutissement de la maturation gonadique ainsi que du développement embryonnaire dans le marsupium. Chez les femelles sexuellement actives, le cycle d'inter-mue s'effectue dans un temps précis, contrairement aux mâles ou aux femelles en repos sexuel qui présentent des durées d'inter-mue beaucoup plus variables.



**Figure 1.22.** Description des cycles d'inter-mue et de reproduction chez la femelle *Gammarus fossarum* (d'après Geffard *et al.*, 2010).

### 1.3.6.2. L'accouplement

L'accouplement à proprement parler a été décrit en détail par Le Roux (1933). Quelques temps avant la ponte, le mâle s'agrippe au dos de la femelle au moyen de ses gnathopodes, formant ainsi le précopulat. Cette étape dure quelques jours jusqu'à la mue. Elle est suivie de la ponte des oeufs qui est facilitée par la présence du mâle aidant la femelle à sortir son exuvie. Le mâle se positionne alors

ventralement, en travers, de façon à ce que ses papilles génitales se retrouvent en vis-à-vis du marsupium de la femelle. Le sperme est alors déposé sur les oeufs fraîchement pondus. Cette opération est renouvelée deux à trois fois.

### 1.3.7. Utilisation des gammares en écotoxicologie

Du fait de leur sensibilité aux contaminants, les gammares, et en particulier *G.fossarum*, sont de bons indicateurs de la santé des milieux aquatiques d'eau douce. Ils sont fréquemment utilisés dans le cadre d'études d'évaluation de risques et de la qualité des écosystèmes aquatiques (Rinderhagen *et al.*, 2000), par de nombreux laboratoires d'écotoxicologie, dans divers scénarios contrastés (*in situ*, *in vivo*, *in vitro*, exposition aux sédiments, par pulse,...) (Kunz *et al.*, 2010).

Durant ces dernières décennies, les impacts de stress toxiques chez ces organismes ont été étudiés à différentes échelles d'organisation biologique, que ce soit au niveau : **[1] de la population**, au travers du suivi des modifications de la répartition des classes d'âge, du sexe-ratio ou de l'occurrence de l'intersexualité (Watts *et al.*, 2002 ; Ford *et al.*, 2004 ; Yang *et al.*, 2008), **[2] de l'individu**, via le suivi de la croissance (Blockwell *et al.*, 1996a ; Roman *et al.*, 2007), des taux de reproduction (Cold & Forbes, 2004) ou de paramètres comportementaux tels que la prise alimentaire (Taylor *et al.*, 1993 ; Malbouisson *et al.*, 1995 ; Matthiessen *et al.*, 1995 ; Blockwell *et al.*, 1998 ; Forrow & Maltby, 2000 ; Maltby *et al.*, 2002 ; Bloor & Banks, 2006), l'endurance natatoire, la locomotion et la ventilation (Borlakoglu & Kickuth, 1990 ; Gerhardt, 1995, 1996 ; Gerhardt *et al.*, 1998 ; Felten & Guerold, 2001 ; De Lange *et al.*, 2006 ; Felten *et al.*, 2008b) ou le comportement pré-copulatoire (Borlakoglu & Kickuth, 1990 ; Pascoe *et al.*, 1994 ; Malbouisson *et al.*, 1995 ; Watts *et al.*, 2001), **[3] physiologique**, via l'étude de paramètres tels que l'allocation énergétique (Naylor *et al.*, 1989 ; Maltby *et al.*, 1990 ; Maltby, 1992), la respiration (Kedwards *et al.*, 1996) ou le maintien de l'homéostasie (ionorégulation) (Handy & Depledge, 2000 ; Felten & Guerold, 2001 ; Brooks & Mills, 2003 ; Felten & Guerold, 2006), **[4] tissulaire et cellulaire**, comme avec l'étude histologique des anomalies gonadiques (Gross *et al.*, 2001 ; Vandenberghe *et al.*, 2003 ; Schirling *et al.*, 2005 ; Schirling *et al.*, 2006) ou des *caeca* hépatopancréatiques (Blockwell *et al.*, 1996b ; Kutlu *et al.*, 2002), et **[5] au niveau moléculaire**, avec entre autre, l'application de biomarqueurs neurotoxiques (activité enzymatique des cholinestérases) (Kuhn & Streit, 1994 ; Streit & Kuhn, 1994 ; Crane *et al.*, 1999 ; McLoughlin *et al.*, 2000) et reprotoxiques (par exemple la mesure de Vg) (Gagné *et al.*, 2005).



## 1.4. OBJECTIFS

Les travaux de ma thèse ont été structurés autour de deux axes :

- Un premier **méthodologique** visant à [1] développer et valider un essai LC-MS/MS permettant de quantifier la vitellogénine (Vg) chez le crustacé *Gammarus fossarum* et [2] évaluer la pertinence de la spectrométrie de masse pour développer rapidement la mesure de Vg chez plusieurs grands groupes d'invertébrés (mollusques, crustacés et insectes) ; ceci en identifiant des peptides spécifiques de la Vg pouvant être utilisés pour la quantification de cette protéine.
- Un second **écotoxicologique** chez l'espèce modèle *Gammarus fossarum* visant à [1] utiliser la mesure de la Vg chez le mâle comme biomarqueur d'exposition à des PE et évaluer sa pertinence comme outil de diagnostic, et [2] évaluer la pertinence de marqueurs de reprotoxicité chez la femelle (perturbation du cycle de mue et de la vitellogenèse, fertilité) pour identifier des perturbateurs endocriniens. Ces deux objectifs ont été appréhendés dans le cadre d'expositions au laboratoire à des substances modèles (incluant des hormones de crustacés, des pesticides et des produits médicaux) et *in situ* via la transplantation d'organismes dans des sites peu à fortement contaminés du bassin rhodanien.

Pour répondre à ces différents objectifs, le manuscrit s'articule autour des **Chapitre 3, Chapitre 4 et Chapitre 5** qui se présentent sous forme d'articles et d'une note décrivant en détail les différentes étapes de mes travaux de thèse.

Le **Chapitre 3** détaille [1] les étapes du développement et de la validation d'un essai LC-MS/MS chez *Gammarus fossarum* ; ceci à partir du séquençage partiel de la Vg chez cette espèce jusqu'à la validation d'un protocole de quantification à l'aide d'un peptide identifié comme spécifique de la Vg chez le gammare et [2] les stratégies proposées pour l'identification de peptides spécifiques de la Vg (*i*) chez des espèces pour lesquelles on dispose d'une séquence même partielle de la Vg et (*ii*) chez des espèces non séquencées. Pour celles-ci, ces travaux se sont appuyés sur la probabilité de retrouver les peptides validés pour une espèce séquencée chez une espèce non séquencée. Cette probabilité est directement liée au niveau de conservation de ces peptides entre espèces au cours de l'évolution. Ensuite, afin d'augmenter la probabilité d'identification de peptides chez ces espèces, une approche basée sur l'étude des alignements de séquence a été réalisée pour identifier des peptides.

Le **Chapitre 4** a pour objectifs d'étudier chez *Gammarus fossarum* [1] l'évolution des teneurs en Vg au cours des processus de vitellogenèse et d'embryogenèse ainsi que les différences inter-sexe, [2] la pertinence de l'utilisation de la Vg comme indicateur de la qualité des ovocytes et comme biomarqueur spécifique de l'exposition à des PE chez les mâles ; ceci dans le cadre d'expositions au laboratoire à des substances modèles, et [3] la variabilité intrinsèque des teneurs en Vg chez le mâle en réponse à des facteurs confondants (biotique et environnementaux) et la pertinence de la mesure de Vg chez les mâles comme outil de diagnostic de la perturbation endocrinienne des milieux aquatiques.



La **Chapitre 5** vise à évaluer la pertinence d'une approche basée sur l'utilisation d'un biotest de reprotoxicité chez les femelles dans le cadre d'expositions à différents stress, au laboratoire et *in situ* (via la transplantation d'organismes). L'intérêt de la mesure de réponses caractérisées et synchronisées, en lien avec le cycle de mue et le cycle de reproduction des femelles, a pour but d'identifier l'impact de PE, capables de perturber un de ces processus physiologiques.

Le **Chapitre 6** est une discussion générale des résultats obtenus au cours de mes travaux de thèse et est suivie d'une conclusion générale.

Avant d'aborder les **Chapitres 3, 4, 5 et 6**, le **Chapitre 2** a pour but de détailler les matériels et méthodes utilisés pendant ces travaux avec : [1] les outils bioinformatiques auxquels j'ai eu recours pendant mes travaux ; [2] le prélèvement d'invertébrés et leur maintien au laboratoire, [3] la mise en place des expérimentations au laboratoire et *in situ* chez *Gammarus fossarum* et [4] les protocoles de mesure des différents marqueurs utilisés chez le gammare (*i.e.*, Vg , les marqueurs de la perturbation endocrinienne chez la femelle et la mesure des anomalies embryonnaires).





# CHAPITRE II

## 2. MATERIELS ET METHODES

---

2.1. Outils bioinformatiques

2.2. Matériel biologique

2.3. Expérimentations

2.4. Marqueurs biologiques

---



## 2.1. OUTILS BIOINFORMATIQUES

### 2.1.1. Les banques de données

Deux grandes banques de données ont été consultées pour réaliser une liste des espèces dont la séquence Vg est connue : GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) et EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/embl>) (cf. section 1.2.3.2.3 - **Tableau 1.4**). Ces bases de données rassemblent les séquences protéiques et nucléiques (notamment les séquences génomiques, les ARNm ou les ADNc). Les ADNc (Acide DésoxyriboNucléique complémentaire) sont obtenus après transcription inverse des ARNm : ils correspondent aux gènes sans les parties non codantes (introns). Les séquences codant la Vg ont, dans un premier temps, été recherchées avec le mot clé « *vitellogenin* ».

### 2.1.2. La traduction en ligne

Lorsque seule la séquence nucléique est disponible, un outil de traduction en ligne accessible sur ExpASY (Expert Protein Analysis System) a été utilisé (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>). Cet outil permet de proposer une traduction de la séquence de la protéine selon les six cadres de lecture possibles : trois dans le sens 5'-3' et trois dans le sens 3'-5'. Le bon cadre de lecture parmi les six étant celui ne donnant aucun codon de terminaison, dit "STOP", au sein de la séquence.

### 2.1.3. Le BLAST

Le BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est un outil de biologie moléculaire permettant de comparer les séquences nucléiques (BLASTn) ou protéiques (BLASTp) avec les séquences disponibles dans les banques de données. En trouvant des similarités entre les séquences, cet outil peut permettre de : [1] prédire les nouveaux membres de familles de gènes, [2] déduire la fonction de gènes nouvellement séquencés ou encore [3] explorer les relations au cours de l'évolution. Au cours de nos travaux, seuls les BLASTp ont été utilisés (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) : dans un premier temps, à partir des séquences connues de Vg. Ceci a été fait dans le but de rechercher toutes autres séquences ressemblant à la protéine mais qui n'auraient pas été annotées comme étant de la Vg par les auteurs. Ces protéines peuvent par exemple être des EST (« *Expressed Sequence Tags* ») dont les auteurs savent que la protéine est exprimée par l'organisme, mais n'en connaissent pas la fonction. Dans un deuxième temps, l'outil a été utilisé après l'identification des peptides candidats, afin d'évaluer la spécificité des peptides. Le but était de voir s'ils étaient retrouvés chez d'autres protéines de l'organisme testé ou pas et ainsi valider la spécificité des peptides vis-à-vis de la Vg.

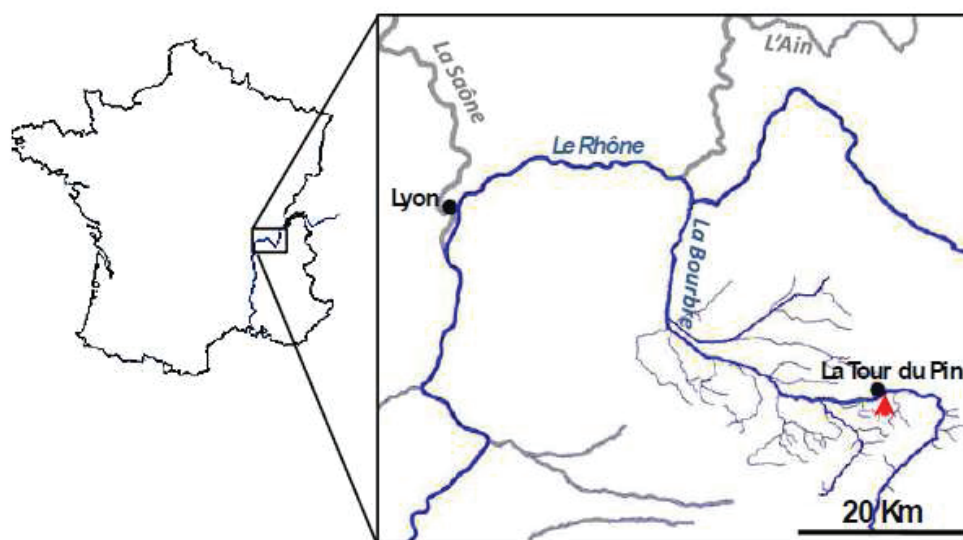
#### 2.1.4. Les alignements de séquences

Des alignements automatiques de séquences ont été réalisés à l'aide du logiciel Seaview 4 (Galtier *et al.*, 1996; <http://pbil.univ-lyon1.fr>). Nous avons comparé les séquences protéiques de la Vg de différentes espèces, dans le but d'avoir une idée des distances phylogénétiques et d'identifier les zones pouvant être conservées au sein des différents groupes taxonomiques étudiés. Ce type d'observation a été à la base du raisonnement tenu pour les approches visant le dosage de la Vg chez les espèces non séquencées. La conservation devait cependant tenir compte des sites de coupure reconnus par l'enzyme utilisée (trypsine) pour la digestion enzymatique des échantillons testés. Dans notre cas, l'arginine (R) et la lysine (K) constituent les sites de clivage reconnus par la trypsine (van den Broek *et al.*, 2008).

## 2.2. MATERIEL BIOLOGIQUE

### 2.2.1. Prélèvement de gammares

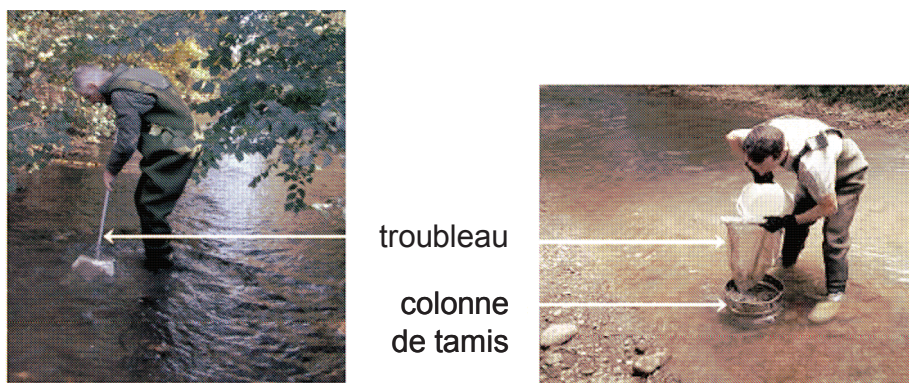
Il existe peu de publications sur l'élevage de gammares au laboratoire qui semble être assez délicat (revu dans Kunz *et al.*, 2010). Ces travaux ont donc été réalisés sur des gammares prélevés dans le milieu naturel, sur des stations de référence, puis acclimatés entre deux et trois semaines au laboratoire. Les gammares ont été collectés en amont du bassin de la Bourbre au niveau de la commune de la Tour du Pin (Isère, France) (**Figure 2.1**). Le site de la Tour du Pin a été retenu pour deux raisons. D'une part, les données disponibles par le Réseau National des Bassins le qualifient de "bon état" (en raison des niveaux de contaminations mesurés dans l'eau et le sédiment, et de la note de l'indice biologique global normalisé). D'autre part, d'importantes densités de gammares (supérieures à 1000 individus.m<sup>-2</sup>) y ont été enregistrées au cours des dernières années et répondent aux besoins "matériels" du laboratoire toute l'année.



**Figure 2.1.** Localisation du site de prélèvement de *Gammarus fossarum* sur un affluent du Rhône : « la Bourbre », au niveau de la Tour du Pin (Isère, France).

Les gammares sont prélevés à l'aide d'un troubleau (base rectangulaire 25 x 18 cm ; maille 630 µm) selon la méthode du "kick-sampling". Cette méthode est adaptée au cours d'eau de faible profondeur et consiste à remuer le substrat, généralement avec le pied, afin de provoquer la fuite des organismes épibenthiques. Les organismes, et notamment les gammares, se retrouvent ainsi portés par le courant, dérivent et sont piégés dans le filet du troubleau qui est disposé juste en aval de la zone de travail. Le contenu du troubleau est ensuite trié à travers une colonne de tamis de maille 2 mm à 2,5 mm afin d'obtenir des gammares adultes de taille homogène (**Figure 2.2**).

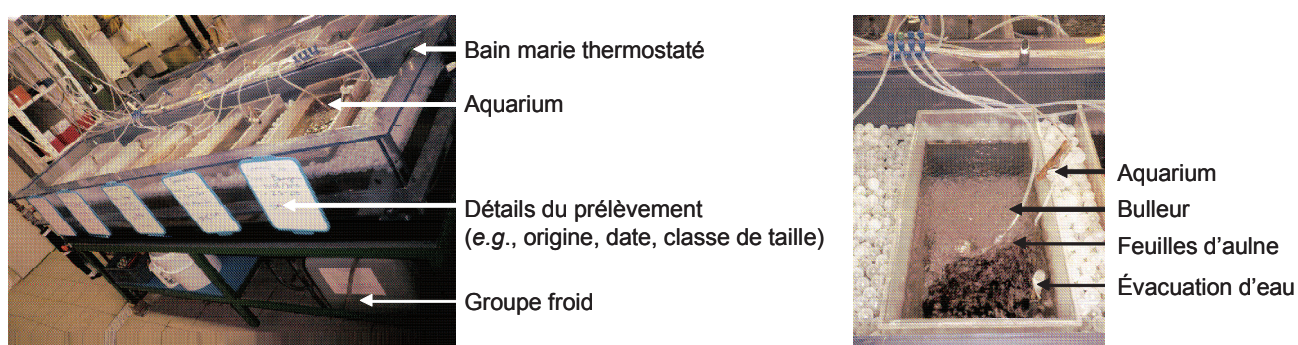




**Figure 2.2.** Prélèvement d'organismes épibenthiques au troubleau suivi par le tri des gammares sur une colonne de tamis (Lacaze, 2011).

### 2.2.2. Maintien au laboratoire des gammares

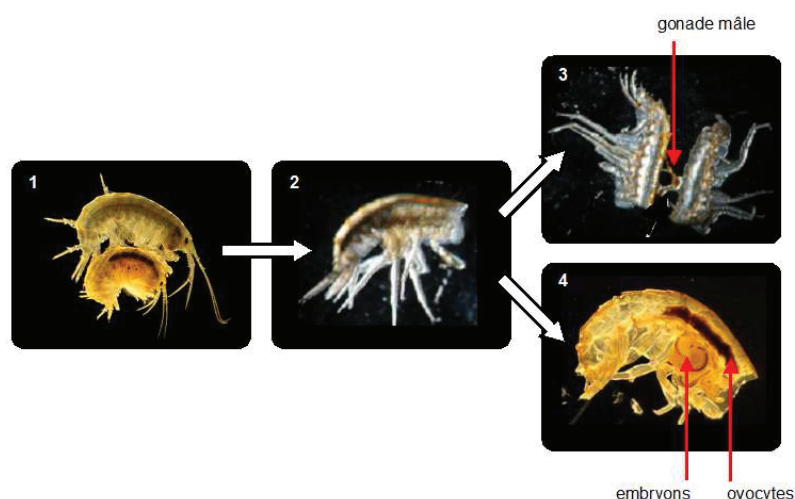
De retour au laboratoire, les gammares sont séparés des débris organiques (feuilles, bryophytes) et minéraux (graviers, sable) et des espèces non-cibles (poissons, sangsues, annélides). Avant leur utilisation pour toutes expérimentations, les gammares sont acclimatés au laboratoire pendant une période de stabulation comprise entre deux et trois semaines. Les gammares sont répartis dans des aquariums de 30 litres qui sont maintenus à une température de  $12 \pm 1$  °C dans un bain marie thermorégulé (**Figure 2.3**). L'eau des aquariums est continuellement renouvelée à un débit fixe de  $4 \text{ L.h}^{-1}$  et est constituée d'un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée (pH 7,4-7,8) de manière à ce que la conductivité soit maintenue à  $600 \pm 50 \mu\text{S.cm}^{-1}$  (valeur de conductivité moyenne enregistrée sur le site de prélèvement). Un bullage permanent permet de maintenir l'oxygène dissous à saturation. La photopériode est de 16h de jour et 8h de nuit avec une intensité lumineuse comprise entre 500 et 1000 lux. Les organismes sont nourris *ad libitum* (c.a.d. à volonté) avec des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*). Ces feuilles sont préalablement conditionnées en les plaçant dans de l'eau renouvelée quotidiennement, durant environ une semaine et à température ambiante, dans le but d'augmenter leur appétence. Des vers lyophilisés (*Tubifex tubifex*) sont ajoutés plusieurs fois par semaine comme complément alimentaire.



**Figure 2.3.** Installation pour la stabulation des gammares au laboratoire

### 2.2.3. Dissection des gonades de gammares

La **Figure 2.4** illustre les principales étapes de la dissection des gonades mâle et femelle. Le céphalon du gammare est tout d'abord coupé, puis les cæcums ainsi que le tube digestif sont extraits de la cavité thoracique à l'aide de pinces. Ensuite, la cuticule est découpée ventralement et dorsalement tout en veillant à ce que les lames des ciseaux (ciseaux de Wecker) restent le plus près possible de la cuticule afin de ne pas altérer la structure des gonades. Une fois ces étapes accomplies, les gonades peuvent être récupérées à l'aide de pinces à pointes ultra fines. [1] Les gonades du mâle sont translucides mais repérables grâce aux gouttelettes lipidiques de couleur orange (pigments caroténoïdes) qui les entourent. [2] Les gonades de la femelle sont bien visibles, quelque soit le stade de maturation des ovocytes mais disposent de membranes relativement fragiles. Ainsi, la récupération des ovocytes nécessite une dissection particulièrement minutieuse. Enfin, les gonades sont placées dans un microtube contenant du tampon Tris (voir section 2.4.1.1. pour la composition du tampon), congelées dans de l'azote liquide et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à la mesure de Vg.



**Figure 2.4.** Etapes de dissection des gonades mâle et femelle.

1 : Mâle et femelle en amplexus ; 2 : Elimination du céphalon, des cæcums et du tube digestif ; 3. Isolation et récupération de la gonade mâle ; 4. Isolation et récupération de la gonade femelle contenant les ovocytes.

### 2.2.4. Echantillonnage des invertébrés

Pour évaluer si la spectrométrie de masse est un outil pertinent pour le développement d'une méthode de mesure de la Vg chez les invertébrés, plusieurs espèces représentatives des grands taxons de protostomiens (mollusques, crustacés et insectes) ont été utilisées dans ce travail et sont présentées dans le **Tableau 2.1**. Pour valider la spécificité de l'essai LC-MS/MS, des comparaisons ont été faites en fonction du mode de reproduction de l'espèce : entre les sexes ou les tissus sexuels (pour les espèces gonochoristes), entre les tissus sexuels (pour les hermaphrodites) ou entre les adultes et les juvéniles (pour les espèces parthénogénétiques). En fonction de la taille des organismes (pour la dissection

d'organes sexuels), les mesures ont été effectuées sur des organismes entiers (pour les crustacés et les insectes de petite taille) ou des gonades (pour les mollusques).

**Tableau 2.1. Liste des invertébrés utilisés afin de développer la mesure de vitellogénine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS)**

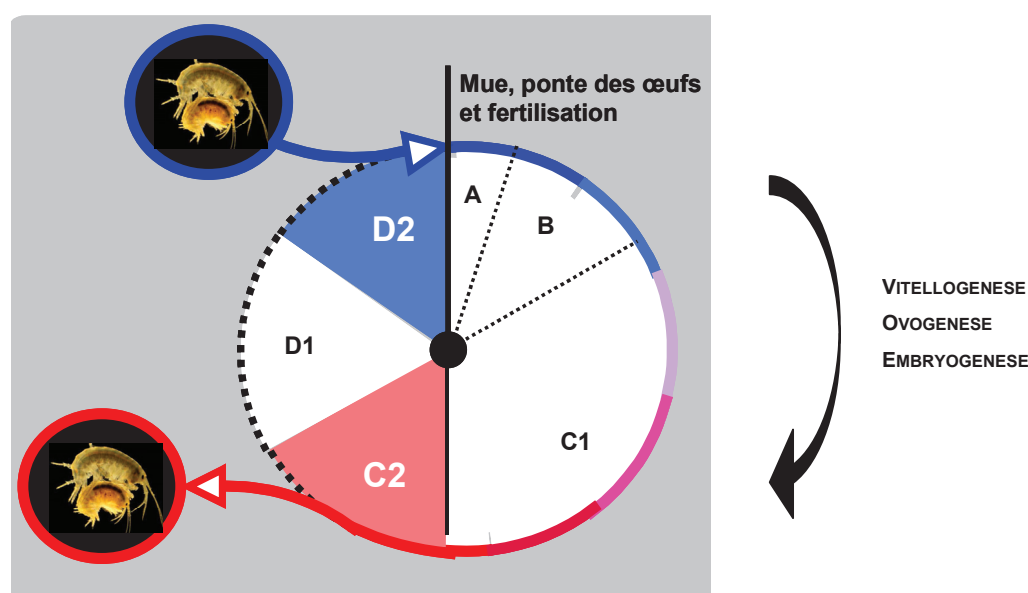
(●) Espèces pour lesquelles une séquence partielle ou complète codant pour la Vg est disponible dans les banques génomiques (numéro d'accèsion dans le Tableau 1.4 – section 1.2.3.2.3).

Espèces	Reproduction	Echantillonnage
<b>Crustacés</b>		
<b><u>Isopodes</u></b>		
● <i>Armadillidium vulgare</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<b><u>Amphipodes</u></b>		
<i>Gammarus fossarum</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
● <i>Gammarus pulex</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<i>Gammarus roeseli</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<i>Gammarus wautierii</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<i>Dikerogammarus villosus</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<b><u>Cladocères</u></b>		
● <i>Daphnia magna</i>	parthenogénétique	individu juvénile, individu ♀
<i>Daphnia pulex</i>	parthenogénétique	individu juvénile, individu ♀
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	parthenogénétique	individu juvénile, individu ♀
<b><u>Copépodes</u></b>		
● <i>Lepeophtheirus salmonis</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<b>Insectes</b>		
<b><u>Diptères</u></b>		
● <i>Drosophila melanogaster</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<i>Drosophila immigrans</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<i>Drosophila subobscura</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<b><u>Coléoptères</u></b>		
● <i>Tribolium castaneum</i>	gonochoriste	individu ♂, individu ♀
<b>Mollusques</b>		
<b><u>Bivalves</u></b>		
● <i>Crassostrea gigas</i>	gonochoriste	gonade ♂, gonade ♀
● <i>Mytilus edulis</i>	gonochoriste	gonade ♂, gonade ♀
<b><u>Gastéropodes</u></b>		
<i>Biomphalaria glabrata</i>	hermaphrodite	gonade ♂, gonade ♀
<i>Haliotis tuberculata</i>	gonochoriste	gonade ♂, gonade ♀

## 2.3. EXPERIMENTATIONS

### 2.3.1. Application du biotest de reprotoxicité chez *G. fossarum*

Pour les expositions au laboratoire à des composés modèles et sur le terrain, le biotest développé par Xuereb (2009b) et par Geffard et collaborateurs (2010) a été mis en place pour étudier les réponses de plusieurs marqueurs en lien avec la mue, la vitellogenèse et l'embryogenèse. Au lancement de biotest, des femelles au stade de mue D2 (*i.e.*, en amplexus, avec des gonades bien visibles et en fin de vitellogenèse ainsi que des embryons au stade 5 (juvénile) dans le marsupium) ont été sélectionnées. A la fin de l'exposition, les femelles au stade de mue C2 ont été échantillonnées (*i.e.*, en phase de vitellogenèse secondaire et avec des embryons au stade 3). (voir le schéma de la **Figure 2.5**).



**Figure 2.5.** Application du biotest développé chez *Gammarus fossarum* pour la mesure de marqueurs en lien avec la reproduction (d'après Geffard *et al.*, 2010).

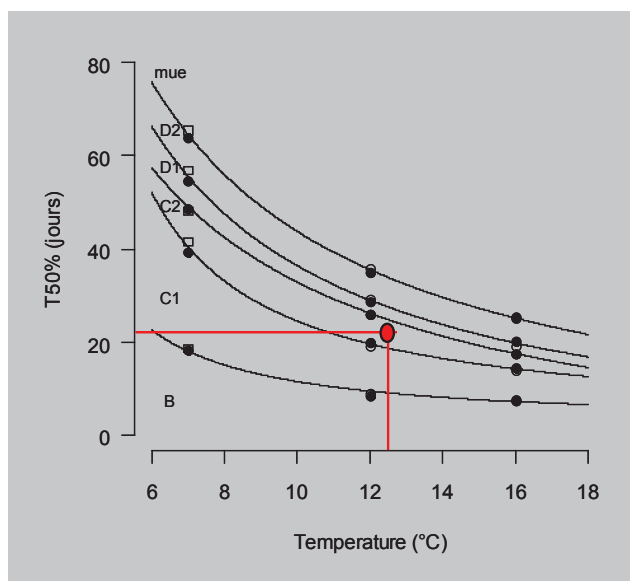
Les organismes entourés en bleu (femelles au stade D2 en amplexus avec un mâle) ont été utilisés au démarrage de l'exposition (laboratoire ou in situ) et les organismes en rouge (femelles au stade C2 et mâles, en amplexus ou pas) ont été récupérés à la fin de l'exposition pour la mesure des différents marqueurs. Après la mue et la ponte des œufs, un nouveau cycle de production de Vg et d'ovocytes ainsi que de développement embryonnaire se met en place. A, B, C1, C2, D1 et D1 correspondent aux stades de mue caractérisés chez *Gammarus fossarum* (Geffard *et al.*, 2010)

La mesure de la Vg et des surfaces ovocytaires et le comptage des ovocytes (fertilité) et des embryons (fécondité) ont été réalisés sur les femelles au stade C2. En effet, ceci permet de limiter la variabilité inter-individuelle de ces réponses qui sont fortement corrélées avec le stade de mue des individus, permettant ainsi de pouvoir discriminer les effets toxiques de la variabilité naturelle de ces réponses au cours du cycle de mue. (Geffard *et al.*, 2010). Par ailleurs, en conditions normales, les

femelles au stade C2 disposent dans le marsupium d'embryons au stade 3. La détermination du stade embryonnaire ainsi que le comptage des anomalies embryonnaires ont été effectués exclusivement à partir des embryons prélevés sur des femelles au stade C2. Enfin, des gammars mâles ont également été récupérés à la fin de la période d'exposition afin de mesurer la Vg (en contrôlant au préalable la présence de papilles génitales). Enfin, le stade de mue de l'ensemble des femelles récupérées à la fin de l'exposition a été déterminé afin d'évaluer des retards ou des accélérations dans le cycle de mue.

Le stade de mue C2 a été retenu car la vitellogenèse secondaire est bien avancée et la mesure des surfaces ovocytaires est plus aisée que pour les stades de mue plus avancés (Geffard *et al.*, 2010).

L'impact de la température et de la conductivité sur la durée du cycle de mue et des stades de mue a été caractérisé pour cette espèce (Coulaud, 2012 ; **Figure 2.6**) ; la durée du cycle de mue dépendant principalement de la température. L'obtention d'une majorité de femelles en stade C2 se traduit par une exposition pendant 21 jours à une température de  $12,5 \pm 0,5$  °C. Pour les expérimentations menées sur le terrain où la température n'est pas contrôlable, la durée d'exposition est variable en fonction de la température du site d'étude. Pour cela, des modèles prédictifs développés chez *Gammarus fossarum* permettent de définir le temps d'exposition optimal permettant de faire la lecture des réponses biologiques sur des femelles au stade C2.



**Figure 2.6.** Relation entre la température (°C) et la durée (jours) des différents stades du cycle de mue chez *Gammarus fossarum* (modifié de Coulaud, 2012).

Les courbes correspondent à la relation entre température et durée des stades obtenue avec un modèle linéaire généralisé pour chacun des stades. Les carrés blancs correspondent aux observations pour la conductivité de  $600 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  et les points noirs pour la conductivité de  $200 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  pour les trois températures. Le point rouge correspond à l'arrêt du test en conditions contrôlées (21 jours à  $12,5^\circ\text{C}$ ) où l'on obtient une majorité de femelles au stade de mue C2.

### 2.3.2. Expérimentations sous conditions contrôlées au laboratoire

Dans le cadre de cette thèse, différentes expérimentations ont été réalisées dans des conditions contrôlées au laboratoire. Ces expérimentations avaient pour objectifs [1] de caractériser l'influence de la spermatogenèse (décrite par Lacaze, 2011) sur le niveau de Vg mesuré chez les gammares mâles et [2] d'étudier l'impact de contaminants modèles (hormones de crustacés, pesticides et produits pharmaceutiques) chez les mâles (*i.e.*, l'induction de Vg) et les femelles (*i.e.*, la teneur en Vg, le retard ou l'accélération du processus de mue, la production (fertilité) et la qualité (surface ovocytaire) des ovocytes ainsi que le pourcentage d'anomalies embryonnaires). Le **Tableau 2.2** présente un descriptif des différentes expérimentations réalisées au laboratoire au cours de ces travaux de thèse.

**Tableau 2.2. Liste détaillée des expérimentations réalisées au laboratoire en conditions contrôlées.**

20HE : 20-hydroxyecdysone ; BZ : benzophénone ; CA : carbamazépine ; CY : cyprotérone ; MF : méthyle-farnesoate ; MX : méthoxyfénazole ; PZ : propiconazole ; RP : (R)-propranolol ; T : témoin eau ; TS : témoin solvant (0,005 % acétone). Concentrations d'exposition testées : (a) 0,01 ; 1 et 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ; (b) 0,001 ; 0,1 et 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  ; (c) 0,001 ; 0,1 ; 10 et 1000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . (\*) : la mesure de Vg chez les femelles a été réalisée uniquement pour les organismes exposés à la 20HE et au MF. (\*\*): la CA et le RP ont été comparés au témoin eau (T); les autres substances (20HE, BZ, CY, MF, MX et PZ) avec le témoin solvant (TS).

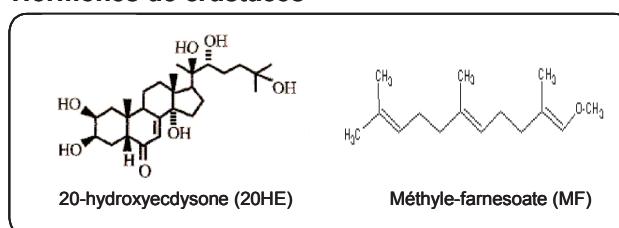
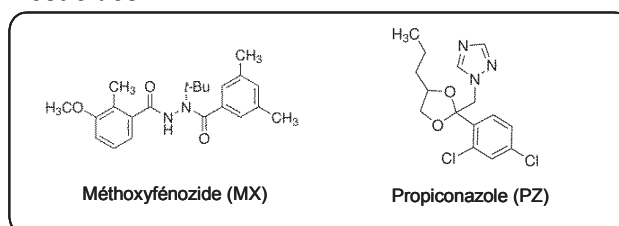
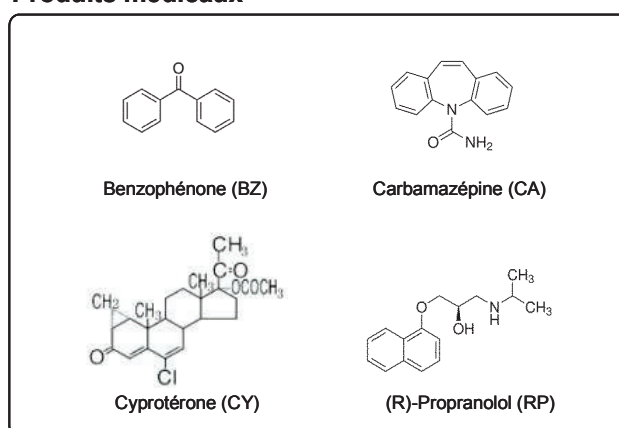
Description de l'expérimentation	Effet de la spermatogenèse sur la teneur en Vg chez les mâles	Effets de substances modèles sur l'induction de Vg chez les mâles	Effets de substances modèles chez les femelles
Durée (jours)	7	21	21
Température (°C)	12,5 ± 0,5	12,5 ± 0,5	12,5 ± 0,5
Conductivité ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	600 ± 50	600 ± 50	600 ±
pH	7,6 - 8,2	7,6 - 8,2	7,6 - 8,2
Rythme jour / nuit	16h / 8 h	16h / 8 h	16h / 8 h
Renouvellement du milieu	continu (500 mL / 6h)	semi-statique (500 ml / 24h)	semi-statique (500 ml / 24h)
Aération	constante	aucune	aucune
Nourrissage	<i>ad libitum</i> (feuilles et vers)	<i>ad libitum</i> (feuilles et vers)	<i>ad libitum</i> (feuilles et vers)
Contaminants et concentrations	aucun	T, TS (0,005 % acétone) 20HE et MF (a) ; MX (b) BZ, CA**, CY, PZ, et RP** (c)	T, TS (0,005 % acétone) 20HE et MF (a) ; MX (b) BZ, CA**, CY, PZ, et RP** (c)
Nombre d'organismes par réplicat	6 mâles adulte (20-30 mg)	6 mâles adulte (20-30 mg)	6 femelles adulte (20-30 mg)
Nombre de réplicats par condition	3 réplicats	3 réplicats	3 réplicats
Paramètres mesurés (Temps ou fréquence)	Survie (quotidien) Vg (1 et 7 j)	Survie (quotidien) Vg (21 j)	Survie (quotidien) Vg (21 j)* Mue (21 j) Surface ovocytaire (21 j) Fertilité (21 j) Anomalies embryonnaires (21 j)

### 2.3.2.1. Effet de la spermatogenèse chez les mâles

En accord avec les stades de spermatogenèse décrits par Lacaze (2011), [1] les gammares mâles « J-1 » correspondent à des individus matures, en amplexus et proches de l'accouplement pour lesquels la production de spermatozoïdes est complète, [2] les gammares mâles « J0 » correspondent à des individus qui viennent de s'accoupler et qui ont redémarré la production de spermatozoïdes et [3] les gammares mâles « J7 » correspondent à des individus qui ont finalisé la production de spermatozoïdes et qui sont de nouveau aptes à s'accoupler (semblable aux mâles « J-1 »). Pour évaluer l'impact de la spermatogenèse sur la teneur en Vg chez les mâles, des individus ont été échantillonnés juste avant l'accouplement (J-1), maintenus et échantillonnés juste après l'accouplement (J0) et 7 jours (J7) après l'accouplement. Les gammares mâles (pris en amplexus avec une femelle au stade D2) ont été placés et maintenus dans des béciers (un couple par bécier). Les béciers ont été alimentés avec de l'eau (600  $\mu$ S/cm) en continu. L'arrivée d'eau a été réglée par des pompes péristaltiques permettant un renouvellement constant au cours du temps et parfaitement similaire entre les béciers (renouvellement complet (500mL) toutes les six heures). Les béciers ont été équipés d'une surverse afin d'évacuer le trop-plein. L'ouverture des surverses a été obstruée par de la toile à bluter (maille de 300  $\mu$ m) afin d'empêcher la fuite des organismes.

### 2.3.2.2. Effet de contaminants modèles chez les mâles et les femelles

Les mâles et les femelles ont été exposés au laboratoire pendant 21 jours, à plusieurs substances modèles : des hormones de crustacés (20-hydroxyecdysone et méthyle-farnesoate), des pesticides (propiconazole et méthoxyfénozide) et des produits médicaux ou pharmaceutiques (benzophénone, carbamazépine, cyprotérone et (*R*)-propranolol) (**Figure 2.7**). Toutes les expérimentations ont été menées pendant une période d'exposition de 21 jours avec trois réplicats (béciers) de 12 gammares par condition testée (*i.e.*, six amplexus mâle/femelle au stade D2). Les tests ont été réalisés dans des conditions semi-statiques (renouvellement complet du milieu d'exposition tous les jours). Cette méthodologie nous est apparue être la plus appropriée pour l'utilisation de molécules peu solubles et rapidement dégradables. Les organismes ont été exposés dans de la vaisselle en verre afin de limiter l'absorption du contaminant sur les parois.

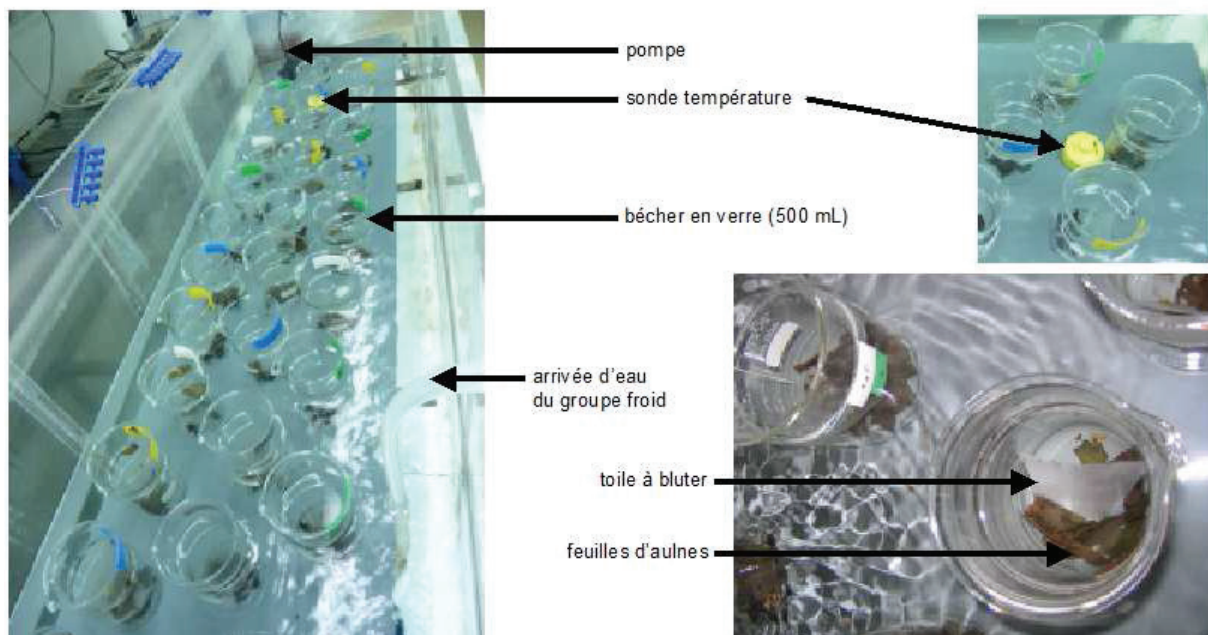
**Hormones de crustacés****Pesticides****Produits médicaux**

**Figure 2.7.** Substances modèles testées au cours des expérimentations au laboratoire en conditions contrôlées chez *Gammarus fossarum*.

### 2.3.2.3. Méthodes d'exposition

Ces expérimentations ont été menées dans du milieu de stabulation à  $600 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  et à une température de  $12,5 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Une pièce de toile bluter en polyamide (ouverture de maille :  $500 \mu\text{m}$  ; longueur x largeur :  $6 \times 5 \text{ cm}$ ) a été disposée dans chaque béccher pour fournir une surface d'accroche, permettant ainsi de minimiser les agressions entre gammarus. Les caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition (pH, conductivité,  $\text{O}_2$  dissous et température) ainsi que la survie des organismes ont été suivis quotidiennement. Les bécchers ont été répartis dans des bains marie thermorégulés comme présenté sur la **Figure 2.8**.





**Figure 2.8.** Dispositif expérimental semi-statique utilisé au cours des expositions au laboratoire en conditions contrôlées chez *Gammarus fossarum*.

### 2.3.3. Exposition sur le terrain de gammares transplantés

Dans le cadre de cette thèse, différentes expérimentations ont été réalisées sur des gammares transplantés sur différents sites dits « de référence » et « contaminés ». Ces expérimentations avaient pour objectifs [1] de caractériser l'influence de différents facteurs environnementaux (notamment la température et la conductivité) sur la teneur en Vg chez les mâles et [2] d'évaluer sur des sites peu à fortement anthropisés la réponse du ou des biomarqueurs chez les mâles (c.a.d. l'induction de Vg) et les femelles (c.a.d. la teneur en Vg, le retard ou l'accélération du processus de mue, la production (fertilité) et la qualité (surface ovocytaire) des ovocytes ainsi que le pourcentage d'anomalies embryonnaires). Le **Tableau 2.3** présente un descriptif des différentes expérimentations réalisées sur le terrain au cours de ces travaux de thèse.

**Tableau 2.3.** Liste détaillée des expérimentations réalisées sur le terrain (*in situ*)

Description de l'expérimentation  Conditions d'exposition	Variabilité spatio-temporelle de la teneur en Vg chez les mâles sur deux sites de référence		Etude du biomarqueur Vg chez des mâles encagés sur des sites peu à fortement contaminés	Etude des réponses des marqueurs de reproduction chez des femelles encagées sur des sites peu à fortement contaminés
	Ardières (Ardillats)	Bourbre (Tour du Pin)	Bassin Rhône-Alpes	Bassin Rhône-Alpes
Durée (jours)	21	21	21	14 à 21
Température moyenne journalière (°C)	7,2 (Décembre) 12,0 (Avril) 15,1 (Juin) 8,5 (Octobre)	7,6 (Décembre) 15,2 (Avril) 18,6 (Juin) 9,0 (Octobre)	de 9,2 à 15,6 en fonction des sites	de 11,8 à 20,5 en fonction des sites
Dureté (mg.L <sup>-1</sup> de CaCO <sub>3</sub> )	de 31 à 35	de 273 à 300	de 156 à 242 en fonction des sites	de 14 à 331 en fonction des sites
pH	7,6 - 8,2	7,6 - 8,2	7,6 - 8,2	7,6 - 8,2
Nourrissage	<i>ad libitum</i> (feuilles)	<i>ad libitum</i> (feuilles)	<i>ad libitum</i> (feuilles)	<i>ad libitum</i> (feuilles)
Nombre d'organismes par réplicat	6 mâles adulte (20-30 mg)	6 mâles adulte (20-30 mg)	6 mâles adulte (20-30 mg)	6 femelles adulte (20-30 mg)
Nombre de réplicats par site	3 réplicats	3 réplicats	3 réplicats	3 réplicats
Paramètres mesurés (temps ou fréquence)	Survie (hebdomadaire)  Vg (21 j)	Survie (hebdomadaire)  Vg (21 j)	Survie (hebdomadaire)  Vg (21 j)	Survie (hebdomadaire)  Mue (21 j) Surface ovocytaire (21 j) Fertilité (21 j) Anomalies embryonnaires (21 j)

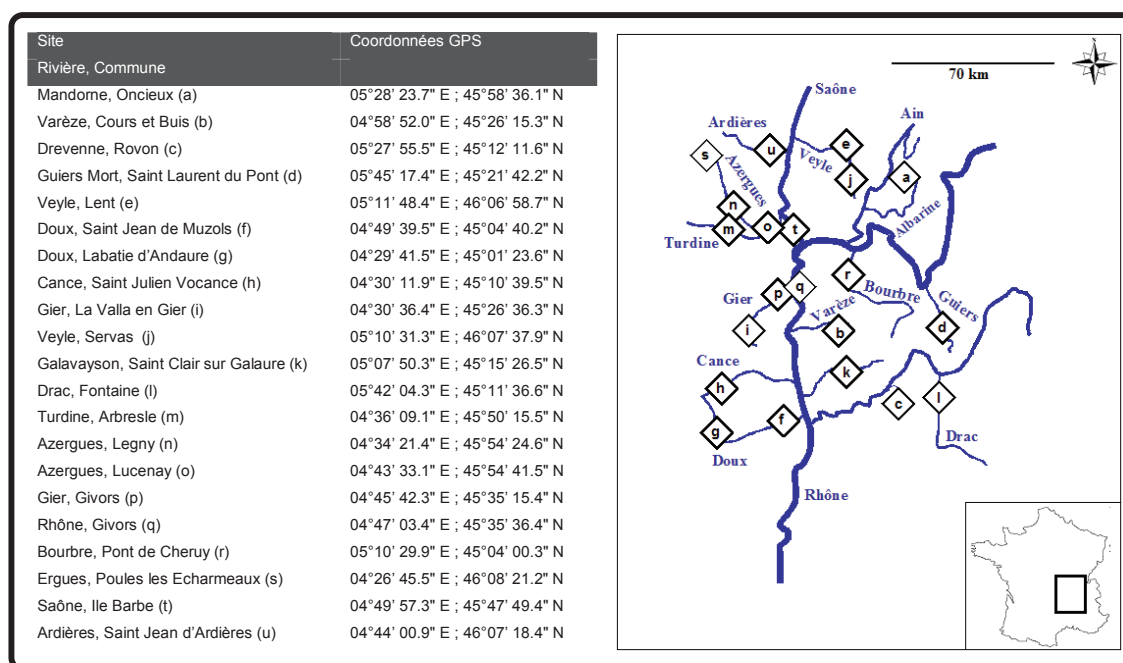
### 2.3.3.1. Impact de facteurs environnementaux chez le mâle

Afin d'évaluer l'impact de différents facteurs environnementaux (par exemple la température et la conductivité) sur la teneur en Vg, des gammares mâles ont été encagés sur deux sites non contaminés dits « *de référence* » pendant 21 jours et au cours de quatre campagnes (décembre 2008 et avril, juin et octobre 2009) reflétant les quatre saisons de l'année. Il s'agit du site des Ardillats sur l'Ardière (longitude: 04°31'13"E, latitude: 46°11'10"N) et du site de La Tour du Pin sur la Bourbre, précédemment décrit. Les deux rivières présentent d'importantes variations de température au cours de l'année (de 3 à 24°C) et sont caractérisées par une dureté relativement constante. L'Ardière coule sur un socle granitique, ce qui se

traduit par une faible dureté (environ  $30 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ) alors que la Bourbre est majoritairement clacaire, ce qui se traduit par une dureté plus élevée (environ  $285 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ). La qualité biologique des deux sites de référence est très bonne (données SEQ, système d'évaluation de la qualité des cours d'eau).

### 2.3.3.2. Campagne d'exposition *in situ*

Pour évaluer la pertinence des marqueurs chez les gammares mâle et femelle, une campagne de transplantation d'organismes à large échelle a été menée dans le bassin rhodanien en juin 2010 sur 21 sites peu à fortement contaminés (**Figure 2.9**). Nous avons choisi les différents sites sur l'ensemble de la région Rhône-Alpes afin de couvrir une large gamme de conditions physico-chimiques ainsi qu'une grande aire de répartition ( $\approx 20.000\text{km}^2$ ). L'ensemble de ces sites d'encagement présentait une conductivité moyenne hebdomadaire de l'eau comprise entre  $110$  et  $420 \mu\text{S.cm}^{-1}$ .



**Figure 2.9.** Localisation des sites d'encagement *in situ* de *G. fossarum*.

### 2.3.3.3. Méthodes d'encagement

Les gammares triés pour les expérimentations d'encagement proviennent des aquariums de stabulation dont une partie est alimentée par un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée à une conductivité de  $300 \mu\text{S.cm}^{-1}$  et l'autre partie est alimentée par une eau à  $600 \mu\text{S.cm}^{-1}$ . En fonction de la conductivité du site sur lesquels les organismes sont encagés, ils sont issus de l'une ou l'autre condition, ceci afin de limiter le stress osmotique. Ils sont répartis dans des chambres cylindriques d'encagement en

polypropylène de 5 cm de diamètre et 12 cm de hauteur. Ces systèmes sont clos par un couvercle percé, vissé sur un carré de toile à bluter de 500 µm de vide de maille. Le fond de la chambre d'encagement est un carré de toile à bluter fondu sur les bords du tube de polypropylène. Un maximum de 20 organismes peut être contenu dans ces systèmes. Des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*) ont été ajoutées dans les chambres d'encagement.

Les systèmes sont transportés dans des bidons en polypropylène contenant le même milieu que celui de stabulation. Lors du transport sur les sites, les bidons sont placés dans des glacières avec un système de bullage. Dans le milieu, les chambres d'encagement sont protégées des branches ou des pierres pouvant déchirer les toiles, en les plaçant dans des caisses en PVC percées sur leur pourtour (longueur x largeur x hauteur : 60 x 40 x 20 cm), lestées par des pierres trouvées sur le site et par un bloc rocheux posé sur le couvercle. Une sonde programmable enregistrant la température toutes les 4 heures est fixée à l'intérieur de la caisse. Les caisses sont fixées sur la berge par une corde et un panneau d'information précisant l'objet des expériences est installé pour éviter tout vandalisme. La **Figure 2.10** présente le matériel nécessaire à l'encagement de gammarès sur le terrain.



**Figure 2.10.** Matériels et méthodes d'encagement sur le terrain avec de gauche à droite : la chambre d'encagement, les caisses d'encagement et les systèmes d'encagement dans une rivière installés près de la berge. *cv.* : couvercle vissé ; *p.* : pot en polypropylène étiqueté ; *tb.* : toile à bluter

Les chambres d'encagement sont relevées au minimum toutes les semaines pour mesurer le taux de survie des organismes et y ajouter de la nourriture si besoin. Si les conditions climatiques se dégradent (forte pluie, crue), les caisses sont relevées et nettoyées dès le lendemain pour éviter une sédimentation trop importante de la matière organique. Lors de l'arrêt d'une expérimentation de terrain, les gammarès sont ramenés au laboratoire dans leurs chambres d'encagement qui sont placées dans un bidon contenant de l'eau du site et un système d'aération. Arrivés au laboratoire, les bidons sont alors disposés dans des bains-marie thermorégulés et placés sous aération constante, le temps de traiter les échantillons.

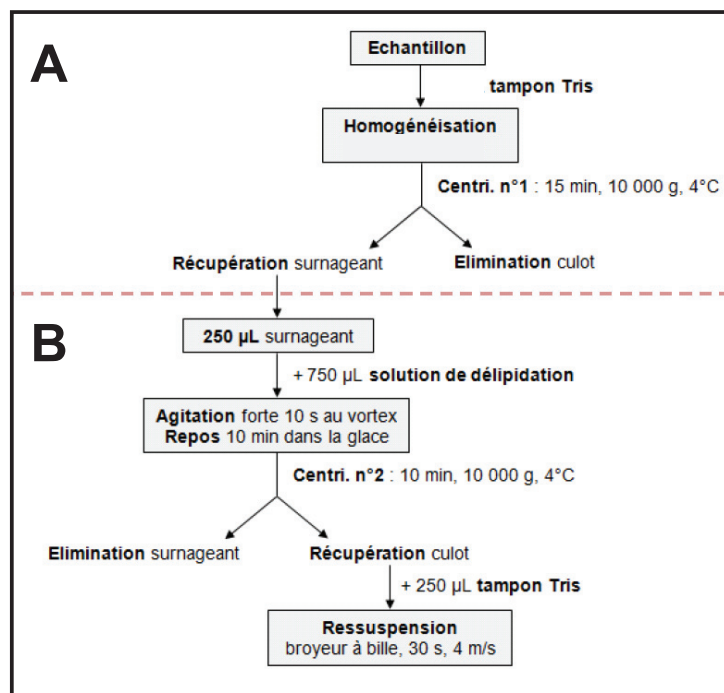
Lors de chaque installation de caisses d'encagement sur un site, des mesures physico-chimiques de base (pH, conductivité et température) ont été effectuées à l'aide d'une sonde multimètre WTW Multi350i®.

## 2.4. MARQUEURS BIOLOGIQUES

### 2.4.1. Le dosage de la vitellogénine

#### 2.4.1.1. Extraction protéique des échantillons

L'extraction (broyage et délipidation) de la Vg a été faite à partir d'organismes entiers, de gonades ou d'embryons selon le protocole schématisé dans la **Figure 2.11**. Ce protocole d'extraction (tampon, centrifugation, délipidation) a été construit autour des données disponibles dans la littérature sur l'extraction de protéines Vg chez les invertébrés. Les échantillons ont été homogénéisés à l'aide d'un broyeur à billes (FastPrep-24 ball mill, M.P. Biomedicals®, USA). Pour *Gammarus fossarum*, les femelles *in toto*, les gonades ainsi que les embryons ont été broyés dans 1 mL de tampon Tris ; tandis que les mâles ont été broyés dans du tampon Tris avec un rapport poids (mg)/volume ( $\mu\text{L}$ ) de 1 pour 25. Pour les autres invertébrés, les organismes entiers et les gonades ont été homogénéisés dans 1 mL de tampon Tris et dans des tubes à hémolyse de 5 mL à l'aide d'un homogénéiseur à couteaux (Ultra-Turrax T25 basic, Ika-werke GMBH & Co®, Allemagne), en présence de tampon Tris.



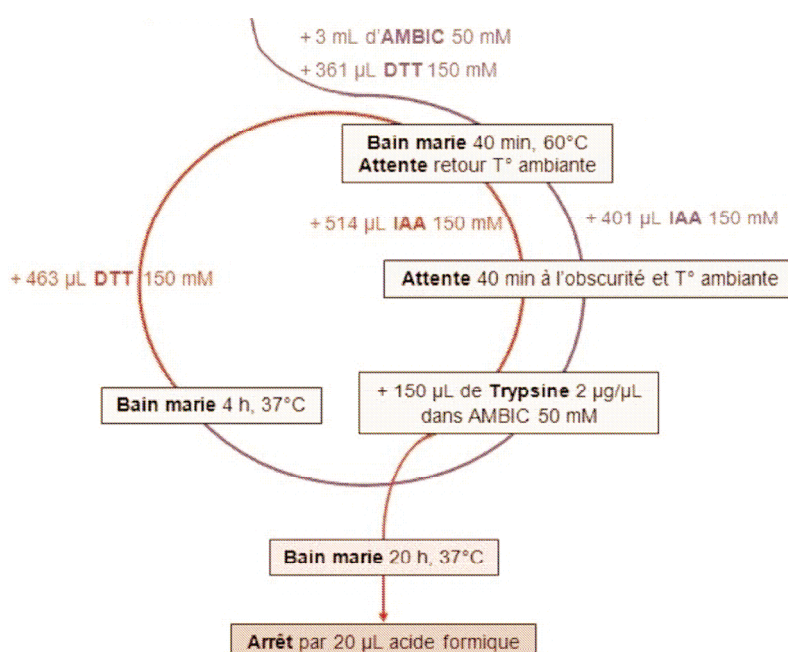
**Figure 2.11.** Etapes du protocole de broyage (A) et de délipidation (B) des échantillons.

Le tampon Tris a été largement utilisé pour l'extraction des protéines Vg chez les invertébrés (crustacés : Oberdorster *et al.*, 2000 ; Tsukimura *et al.*, 2000 ; Ghekiere *et al.*, 2005 ; Sanders *et al.*, 2005 ;

Tiu *et al.*, 2006a ; mollusques : Dreon *et al.*, 2002 ; Matozzo & Marin, 2005 ; Quinn *et al.*, 2006). Le tampon d'extraction est constitué de Tris-HCl (50 mM), de NaCl (100 mM), d'EDTA (1mM), de Triton X-100 (0,1% (v/v)) et d'eau ultrapure. Le pH a été ajusté à 7,8 avec de l'acide chlorhydrique. Deux inhibiteurs de protéases sont ajoutés extemporanément : leupeptine et aprotinine (concentrations finales = 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Ces inhibiteurs de protéases permettent de bloquer l'activité des protéases endogènes de l'organisme lors de la préparation. Une fois les tissus homogénéisés, le surnageant est prélevé après une étape de centrifugation (10,000g / 15 minutes / 4 °C). Une étape de délipidation est ensuite réalisée à l'aide d'une solution organique de délipidation, dont la composition a été optimisée à 1/1 (v/v) éthanol absolu/diéthyléther. Une fois que les protéines ont culotté (deuxième centrifugation à 10,000g pendant 15 minutes à 4 °C), le surnageant est éliminé et le culot homogénéisé dans 250  $\mu\text{L}$  de tampon Tris à l'aide d'un broyeur à billes.

#### 2.4.1.2. Digestions enzymatiques

Les culots homogénéisés subissent ensuite deux cycles complets de digestion selon le protocole schématisé dans la **Figure 2.12** afin de dégrader les protéines en peptides par une digestion enzymatique à la trypsine.



**Figure 2.12.** Etapes de réduction, d'alkylation et de digestion enzymatique (enzyme utilisée : la trypsine) des échantillons. AMBIC : bicarbonate d'ammonium ; DTT : dithiothréitol ; IAA : iodoacétamide.

Chaque cycle de digestion est composé de trois étapes : une réduction, une alkylation et une digestion enzymatique, et se fait dans un tampon : le bicarbonate d'ammonium (AMBIC). [1] La réduction

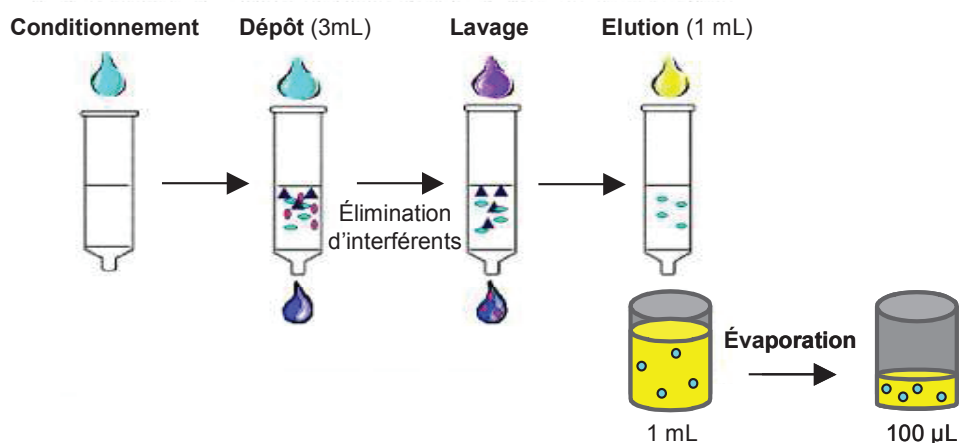
se fait à chaud en présence de dithiothréitol (DTT), permettant de scinder les ponts disulfures et ainsi de déstabiliser les structures tertiaires et quaternaires des protéines. Ainsi, la totalité de la protéine est linéarisée et accessible pour la digestion enzymatique qui suit. [2] L'alkylation, grâce à l'iodoacétamide (IAM), permet l'ajout de groupements carboxyamidométhyles aux fonctions thiol réduites des cystéines. L'ajout de ces groupements évite la reformation des ponts disulfures et ainsi, maintient la protéine dans une conformation linéaire, accessible aux enzymes de digestion. [3] La digestion enzymatique par la trypsine permet l'obtention de peptides en coupant sélectivement les protéines au niveau de la partie C-terminale des acides aminés « arginine » (R) et « lysine » (K) (Geng *et al.*, 2000). La trypsine est l'endopeptidase la plus utilisée dans les analyses protéomiques. En effet, la fréquence des positions R et K offre en moyenne des peptides tryptiques d'une dizaine d'acides aminés, soit une masse d'environ 1100 Da, parfaitement située dans la gamme de masse des spectromètres.

#### 2.4.1.3. Quantification absolue via un étalon interne

On distingue deux types de quantification : [1] la quantification absolue de la protéine contenue dans l'échantillon ou [2] le changement relatif de la quantité de protéine entre deux échantillons. La quantification absolue est de loin la plus intéressante car elle permet également de calculer un ratio entre deux échantillons et par conséquent sera retenue dans ce projet. La technique AQUA (Kusmierz *et al.*, 1990 ; Gygi & Aebersold, 2000) a été utilisée pour quantifier de façon absolue les quantités de Vg chez le gammare. Elle consiste à faire un ajout dosé d'un peptide radiomarqué dans l'échantillon entre l'étape de digestion et l'étape de purification des échantillons.

#### 2.4.1.4. Purification et re-concentration des échantillons

Après digestion, les échantillons de gammare femelles, les gonades mâle et femelle ainsi que les embryons sont directement congelés dans l'azote liquide et stockés à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'aux analyses. Les autres échantillons (gammare mâles et les autres invertébrés) ont été purifiés et reconcentrés par une étape d'extraction en phase solide (en anglais « *solid phase extraction* », SPE). Des colonnes SPE de 3cc et 1cc sont utilisées respectivement pour les gammare et les autres espèces d'invertébrés, contenant 60 et 30 mg de phase HLB (en anglais « *Hydrophilic Lipophilic Balance* ») Waters®. L'utilisation d'une phase polyvalente permet de concentrer la totalité des peptides dans un faible volume et d'éliminer les particules de taille trop importante qui pourraient altérer de façon prématurée l'état du système chromatographique et/ou encrasser le spectromètre de masse. Les étapes du protocole sont décrites dans la **Figure 2.13**.



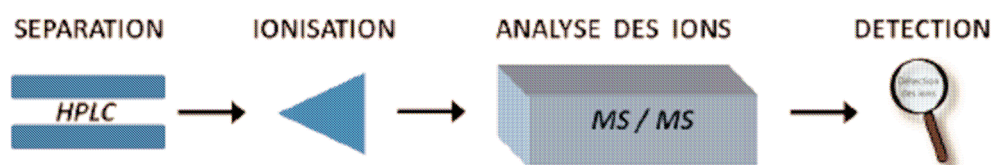
**Figure 2.13.** Etapes de purification et de re-concentration (par évaporation) des échantillons de gammarus mâles.

Dans un premier temps, les colonnes ont été conditionnées en déposant 1 mL de méthanol (0,5% d'acide formique) puis 1 mL d'eau (0,5% d'acide formique). Ensuite, 3 mL d'échantillon ont été déposés dans la colonne puis les colonnes ont été rincées avec 1 mL d'un mélange eau/méthanol (95/5, v/v ; 0,5% d'acide formique) afin d'éliminer les composés non retenus. Enfin, les peptides ont été élués en déposant 1 mL d'un mélange eau/méthanol (20/80, v/v ; 0,5% d'acide formique) dans la colonne.

A la suite de l'éluion, les échantillons ont été déposés dans un évaporateur (SpeedVac, Thermo scientific® Savant, USA) pour éliminer le solvant et ainsi concentrer les peptides en solution. Enfin, le volume des échantillons a été ajusté avec de l'eau (0,5% d'acide formique) à 100 µL pour *Gammarus fossarum* et 300 µL pour les autres espèces d'invertébrés.

#### 2.4.1.5. Analyse par LC-MS/MS

La **Figure 2.14** présente de façon schématique les éléments retrouvés sur des appareillages classques de couplage de (HP)LC-MS/MS.



**Figure 2.14.** Schéma simplifié du couplage LC-M/MS

L'analyse des peptides par LC-MS/MS se déroule en trois grandes étapes :

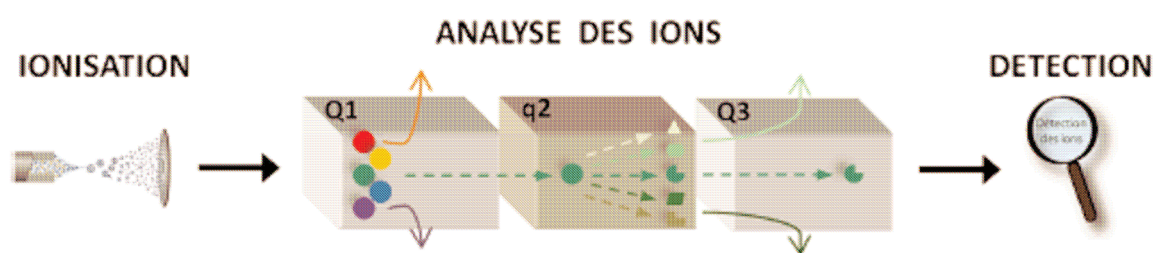
[1] Tout d'abord, l'échantillon (mélange complexe de peptides) est injecté dans le système chromatographique qui permet de séparer les peptides. La séparation est faite par RPLC (« *Reverse*



*Phase Liquid Chromatography* »), où l'élution des peptides se fait en fonction de l'hydrophobicité des peptides : élution des moins hydrophobes aux plus hydrophobes. La colonne chromatographique utilisée lors de ces travaux est caractérisée par une phase stationnaire apolaire greffée de silice C18 (longueur : 100 mm ; diamètre : 2,1 mm ; granulométrie : 3,5  $\mu\text{m}$  ; gamme Symmetry de Waters®). La phase mobile est composée d'eau et d'acétonitrile acidifiés (0,1% acide formique). En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, les peptides traversent plus ou moins rapidement la colonne chromatographique et atteignent la source d'ionisation.

[2] La source d'ionisation constitue l'interface entre la chromatographie et la spectrométrie et permet de vaporiser les peptides et de les ioniser. Une source de type « *electrospray* » (ESI) a été utilisée pour l'ionisation des peptides. Lors de la vaporisation, les peptides passent d'un état solvaté (lors de leur sortie de la colonne chromatographique) à un état désolvaté et sont ensuite ionisés sous forme mono- ou multichargée avant leur entrée dans le spectromètre de masse. Ces peptides ionisés, dits « ions parents », sont alors caractérisés par un rapport masse/charge ( $m/z$ ).

[3] Les spectromètres utilisés étaient des analyseurs de type triples quadripôles. La **Figure 2.15** présente de façon schématique le principe du mode d'analyse MRM (« *Multiple Reaction Monitoring* ») utilisé au cours de ces travaux. Les ions parents sont triés en fonction de leur rapport  $m/z$  au niveau du premier quadripôle (Q1). Les ions parents sélectionnés passent dans le second quadripôle (Q2) appelé aussi « cellule de collision » où ils sont fragmentés par un flux d'azote. Les règles régissant la fragmentation des peptides permet de prédire le rapport  $m/z$  des ions fils (ou fragments peptidiques) qui sont issus de la fragmentation d'un ion parent. Lors de la dissociation induite par la collision (CID en anglais), les ions fils obtenus sont majoritairement de type « *b* » ou « *y* ». Les ions fils obtenus au cours de la fragmentation, également appelés « *transitions MRM* », sont ensuite triés en fonction de leur rapport  $m/z$  au niveau du troisième quadripôle (Q3 ou trappe ionique) puis détectés.



**Figure 2.15.** Principe du mode MRM : sélection de l'ion parent au niveau du premier quadripôle (Q1), suivie de la fragmentation de l'ion parent et de la production d'ions fils dans le second quadripôle (Q2) et d'une sélection de l'ion fils au niveau du troisième et dernier quadripôle avant sa détection.

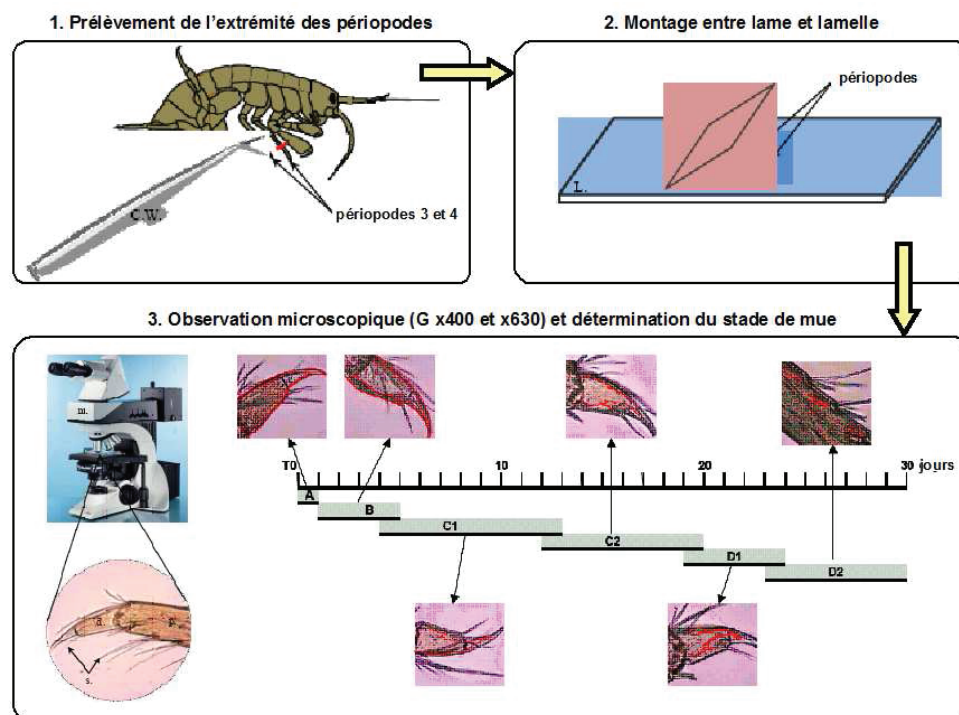
Les transitions MRM ont été prédites *in silico* à partir du logiciel MRM Pilot qui, à partir de la séquence protéique, peut prédire les peptides issus de la digestion à la trypsine ainsi que le rapport  $m/z$  de chacun de ces fragments au niveau de la cellule de collision (Q2). Cette approche a été utilisée pour prédire les transitions MRM à rechercher à partir des séquences de la Vg disponibles dans les banques

génomiques (GenBank et EMBL). Enfin, dans le but de confirmer la séquence des ions parents (peptides) d'intérêt, le mode MRM permet de réaliser des spectres de fragmentation des peptides (i.e., spectres MS/MS). Le décodage des spectres MS/MS a été réalisé de deux façon pour confirmer la séquence des peptides : (i) automatiquement via le logiciel Mascot basé sur la comparaison avec des spectres de référence et (ii) manuellement via le logiciel Gpmaw.

## 2.4.2. Les traits de vie chez *Gammarus fossarum*

### 2.4.2.1. Détermination du stade de mue

Le stade de mue des femelles a été déterminé par l'observation microscopique des tissus de l'extrémité des périopodes, selon la méthode décrite par Xuereb (2009b) et par Geffard et collaborateurs (2010). Les extrémités des périopodes des troisième et quatrième paires ont été sectionnées avec des ciseaux de Wecker et montées entre lame et lamelle. L'observation microscopique (microscope DM 2500® (Leica), grossissements x400 et x630) permet de déterminer le stade de mue (**Figure 2.16**).

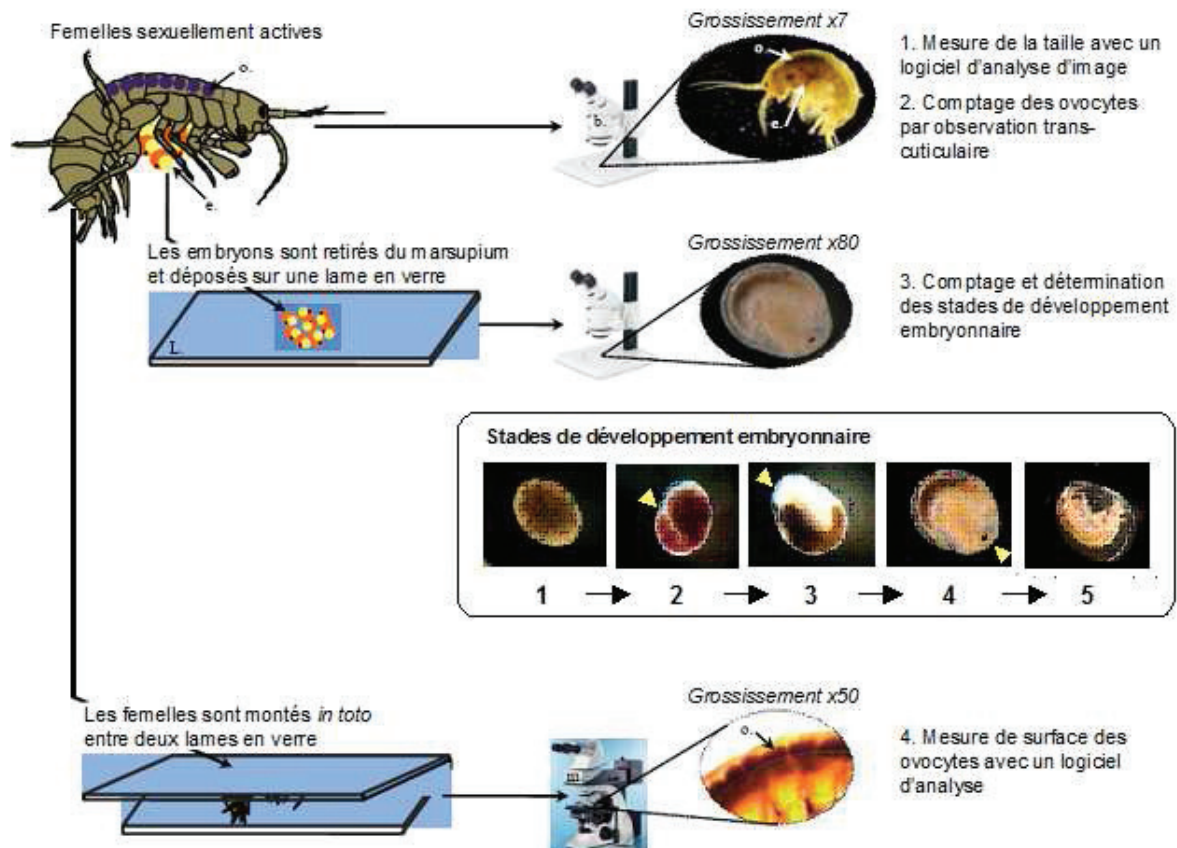


**Figure 2.16. Méthodologie de détermination du stade de mue chez la femelle : les changements tégumentaires du dactylopodite et du protopodite de la 3e et 4e paire de périopodes au cours du cycle de mue de *Gammarus fossarum* (modifié de Xuereb, 2009b ; Geffard *et al.*, 2010).**

Ici, le cycle de mue dure 30 jours à 12°C. c.w. : ciseaux de Wecker ; d. : dactylopodite ; L. : lame ; l. : lamelle ; m. : microscope ; p. : protopodite ; s. : soie. stade A : cuticule du dactylopodite fine et molle ; stade B : épaissement de la cuticule du dactylopodite ; stade C1 : rétractation de l'épiderme du dactylopodite ; stade C2 : formation de fentes circulaires sur l'épiderme du dactylopodite causée par son invagination ; stade D1 : formation d'une cuticule sur le dactylopodite néoformé ; stade D2 : formation d'une cuticule sur les soies néoformées du protopodite.

## 2.4.2.2. Mesure des paramètres de reproduction

La **Figure 2.17** présente les différentes étapes employées pour la mesure de marqueurs en lien avec la reproduction chez la femelle *Gammarus fossarum*, selon la méthodologie décrite et développée par le laboratoire d'écotoxicologie (Xuereb, 2009b ; Geffard *et al.*, 2010).



**Figure 2.17.** Méthodologie de mesure des « marqueurs macroscopiques » associée aux critères de détermination du stade de développement pour les embryons (d'après Xuereb, 2009b).

*b.* : loupe binoculaire ; *e.* : embryons contenus dans la poche incubatrice ; *L.* : lame ; *m.* : microscope ; *o.* : ovocytes en vitellogenèse secondaire visibles au travers de la cuticule. Stades de développement embryonnaire : stade 1 : embryon ovoïde, masse cellulaire homogène et opaque ; stade 2 : apparition de la ventro-flexion ; stade 3 : formation du bourgeon céphalique ; stade 4 : présence d'ommatidies complètement formées de couleur rouge ; stade 5 : juvénile.

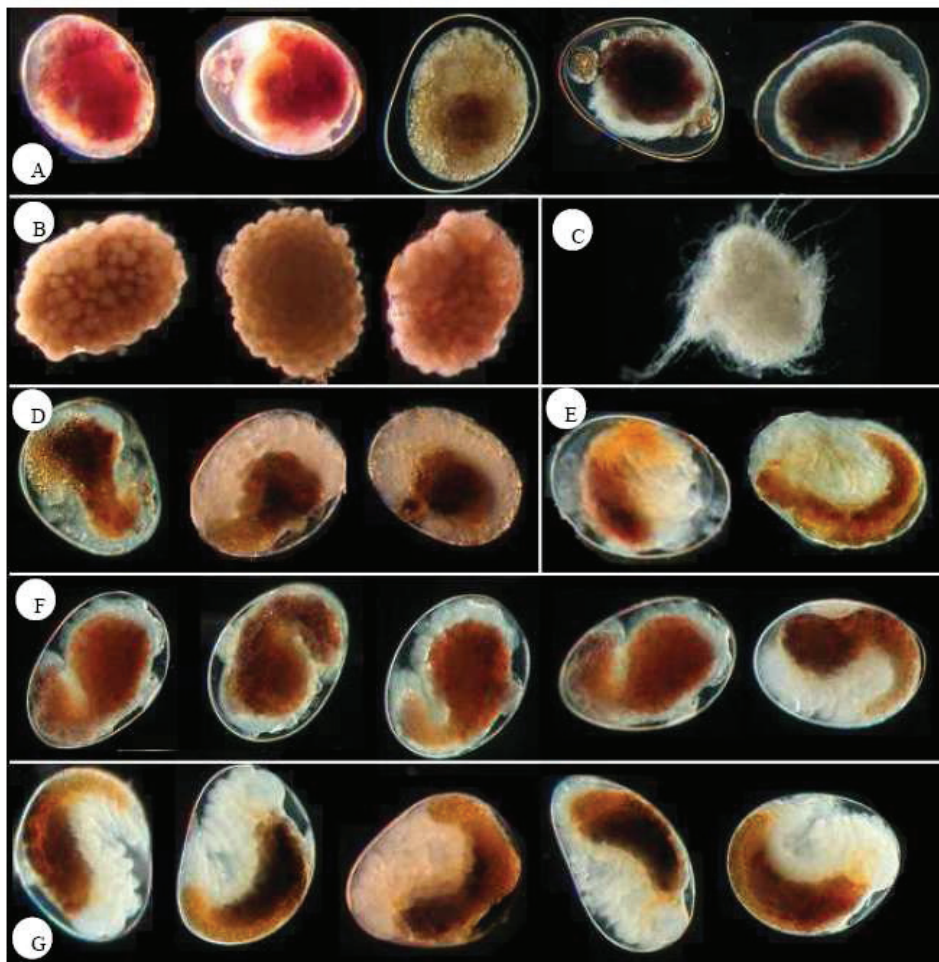
## 2.4.2.2.1. Vitellogenèse secondaire (croissance et production d'ovocytes)

Les ovocytes en vitellogenèse secondaire ont été comptés *in vivo* en observant les ovaires par transparence (grossissement x30). La femelle est ensuite photographiée sous une loupe binoculaire équipée d'un appareil photo numérique, pour mesurer la taille à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image (*i.e.*, SigmaScan® Pro v5.0, Systat Software). Enfin, la taille des ovocytes secondaires est mesurée par observation microscopique *in toto*. Pour cela, les femelles sont disposées entre deux lames de verre, dans

une goutte de milieu de stabulation. Les gonades ont été photographiées au grossissement x50 au moyen d'un microscope DM 2500® (Leica) associé à une caméra numérique Infinity2-1C (Lumenera). La surface des ovocytes est ensuite déterminée (en mm<sup>2</sup> ou µm<sup>2</sup>) à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan® Pro v5.0 (Systat Software).

#### 2.4.2.2.2. Développement embryonnaire

Le stade de développement embryonnaire a été évalué sur la base des critères définis par Geffard et collaborateurs (2010). Les anomalies de développement des embryons sont décrites et dénombrées (**Figure 2.18**). Il peut s'agir d'un décollement de la membrane de fécondation, d'un avortement, d'un retard de développement important, d'œdèmes, de malformations non spécifiques (Lacaze *et al.*, 2011c).



**Figure 2.18.** Photographie sous loupe binoculaire d'embryons de *Gammarus fossarum* présentant divers types d'anomalies après 21 jours de développement à 12°C (stade 3) (d'après Lacaze *et al.*, 2011c).

(A) Embryons avortés (quelques divisions cellulaires) et non fécondés, (B) embryons non différenciés dont les cellules ont dégénéré, (C) embryon moisi, (D et E) divisions cellulaires anarchiques, oedèmes, (F) retard de développement important (absence de céphalon), (G) anomalies non spécifiques, allongement, décollement de la membrane.



---

## CHAPITRE III

### 3. DEVELOPPEMENT ET GENERALISATION DE LA MESURE DE LA VITELLOGENINE PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS) CHEZ LES INVERTEBRES

---

3.1. Développement et validation d'un essai LC-MS/MS pour la quantification absolue de la vitellogénine chez l'amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum*

3.2. Développement et généralisation de la mesure de la vitellogénine chez les invertébrés par spectrométrie de masse (LC-MS/MS)

---



### **3.1. DEVELOPPEMENT ET VALIDATION D'UN ESSAI LC-MS/MS POUR LA QUANTIFICATION ABSOLUE DE LA VITELLOGENINE CHEZ L'AMPHIPODE DULÇAQUICOLE GAMMARUS FOSSARUM**

#### **3.1.1. Note 1 :**

##### **Séquençage partiel du gène de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum***

#### **Résumé :**

Chez les animaux ovipares et ovovivipares, la vitellogénine (Vg) est une protéine précurseur de la synthèse du vitellus (réserve énergétique nécessaire aux organismes au cours de leur développement embryonnaire) et par conséquent fortement impliquée dans la reproduction. Chez la femelle, la mesure de la vitellogénine peut être utilisée comme un indicateur de la qualité des ovocytes. Chez le mâle et le juvénile de poissons, l'induction de Vg est un effet bien connu des contaminants œstrogéniques et fait partie des outils validés et disponibles pour mettre en évidence la présence de ces contaminants dans le milieu. En revanche, chez les invertébrés, les Vg sont moins connues et caractérisées. Dans l'optique de développer ce biomarqueur chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, une méthode de mesure de la Vg basée sur la quantification d'un ou plusieurs peptides spécifiques de cette protéine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) nécessite de connaître au moins en partie la séquence de Vg chez cette espèce. Pour cela, une séquence partielle d'ARNm de Vg de *Gammarus fossarum* (539 pb) a été isolée et séquencée.





## SÉQUENÇAGE PARTIEL DU GÈNE DE LA VITELLOGÉNINE CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM*

### 1. INTRODUCTION

Une large gamme de contaminants organiques répandus dans les environnements aquatiques a été montrée pour avoir une activité de perturbation endocrinienne. La perturbation endocrinienne chez les invertébrés a reçu moins d'attention comparée aux poissons, en partie parce que les connaissances sur l'endocrinologie des invertébrés sont limitées (deFur *et al.*, 1999). Pourtant les invertébrés absorbent et bioaccumulent ces substances chimiques et sont sensibles à des concentrations environnementales.

Les méthodes employées pour doser la Vg d'invertébrés sont traditionnellement associées à deux stratégies méthodologiques : l'essai ALP (Blaise *et al.*, 1999) et les immunoessais (Volz & Chandler, 2004). Par ailleurs, plusieurs travaux ont isolé et séquencé le gène de la Vg (au moins en partie) afin de développer des méthodes basées sur l'utilisation de la PCR et constituent une approche alternative pour le développement d'outils plus spécifiques. Il existe donc dans les banques génomiques des séquences de Vg pour les invertébrés. Ces séquences génomiques peuvent être un support pour définir des peptides Vg spécifiques par un dosage en spectrométrie de masse. Cette approche protéique permet de développer des méthodologies alternatives, spécifiques et sensibles (van den Broek *et al.*, 2008).

L'objectif de cette étude était d'isoler et de séquencer un ARNm de Vg du crustacé amphipode *Gammarus fossarum* pour obtenir une séquence protéique partielle dans le but de développer une méthode de dosage de cette protéine par spectrométrie de masse. Récemment, Xuereb et collaborateurs (2011) ont développé une méthode de quantification des ARNm de Vg chez cette espèce en proposant des amorces à partir d'une portion de séquence Vg disponible chez une espèce proche : *Gammarus pulex*. A partir de cette séquence, il est donc possible de définir des amorces spécifiques de la Vg chez notre espèce d'intérêt en vue de séquencer les ARNm isolés. Ces travaux préalables ont permis d'appréhender le développement et la mesure de la vitellogénine par LC-MS/MS présentés dans la **Publication n°1**.

### 2. MATÉRIEL ET MÉTHODE

Des gammares ont été collectés en décembre 2008 à la Tour du Pin. Après deux semaines de stabulation, quatre femelles au stade de mue C2-D1 ont été échantillonnées (maximum d'expression du gène chez cette espèce (Xuereb *et al.*, 2011)), placées dans un tube contenant des inhibiteurs de RNase (RNA Later, Sigma-Aldrich-France), congelées dans l'azote liquide et stockées à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Deux paires d'amorces ont été définies avec le logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Les deux paires d'amorces ont été obtenues à partir d'une séquence nucléotidique (EST, 734 pb, n° accession genbank : EH275398) codant pour la vitellogénine de *Gammarus pulex*. Les oligonucléotides utilisés comme amorces PCR sont listés ci-dessous.

Amorce 1. 5'- CTC GCC AAG GGA CAA GAA C -3'

Amorce 2. 3'- CCT GGG AGG GGG TGT AGA TA -5'

Amorce 3. 5'- GAC AAG GAA CAT GGC ATC TG -3'

Amorce 4. 3'- CCT TTG GGA CTC CTC ATG TC -5'

Pour l'extraction des ARNm, les gammars ont été broyés directement dans un tube à l'aide d'un potter en plastique et 200 µL de tampon TE. 700 µL de phénol ainsi que 200 µL de chloroforme ont été ajoutés avant d'agiter vigoureusement et de centrifuger (16.000g / 10 min / 4°C). 700 µL d'isopropanol sont ajoutés au surnageant avant d'être congelés à -20°C. L'échantillon est ensuite centrifugé une seconde fois (16.000g / 30 min / 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 200 µL d'éthanol à 70%. L'échantillon est séché à température ambiante pendant environ 10 minutes, puis on ajoute 50 µL de tampon TE et enfin on réserve dans la glace jusqu'à la RT-PCR.

La synthèse d'ADNc a été effectuée avec 1 µg d'ARNm total (*i.e.*, étape de rétro-transcription). Ensuite, l'amplification des ADNc Vg a été effectuée en utilisant le mélange réactionnel PCR suivant : 5 µL de tampon TploX, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dNTPs, 0,25 µL de Taq DNA polymérase, 2 µL d'ADNc (échantillon) et 2 µL de chacune des deux amorces ; enfin, de l'eau « RNase free » est ajoutée pour avoir un volume final de 200 µL. Les conditions de PCR ont été fixées de la manière suivante : (1) 94 °C pendant 2 minutes, (2) 95 °C pendant 20 secondes, (3) 56 °C pendant 30 secondes, (4) 72°C pendant 1 minute, (5) répétition des étapes 2 à 4 35 fois et (6) 72 °C pendant 10 secondes.

La taille des produits de PCR a été vérifiée sur gel d'agarose 7%. Les produits PCR à la taille attendue ont été purifiés et séquencés (à la plate-forme technique du *DTAMB* « Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité », Université Lyon1).

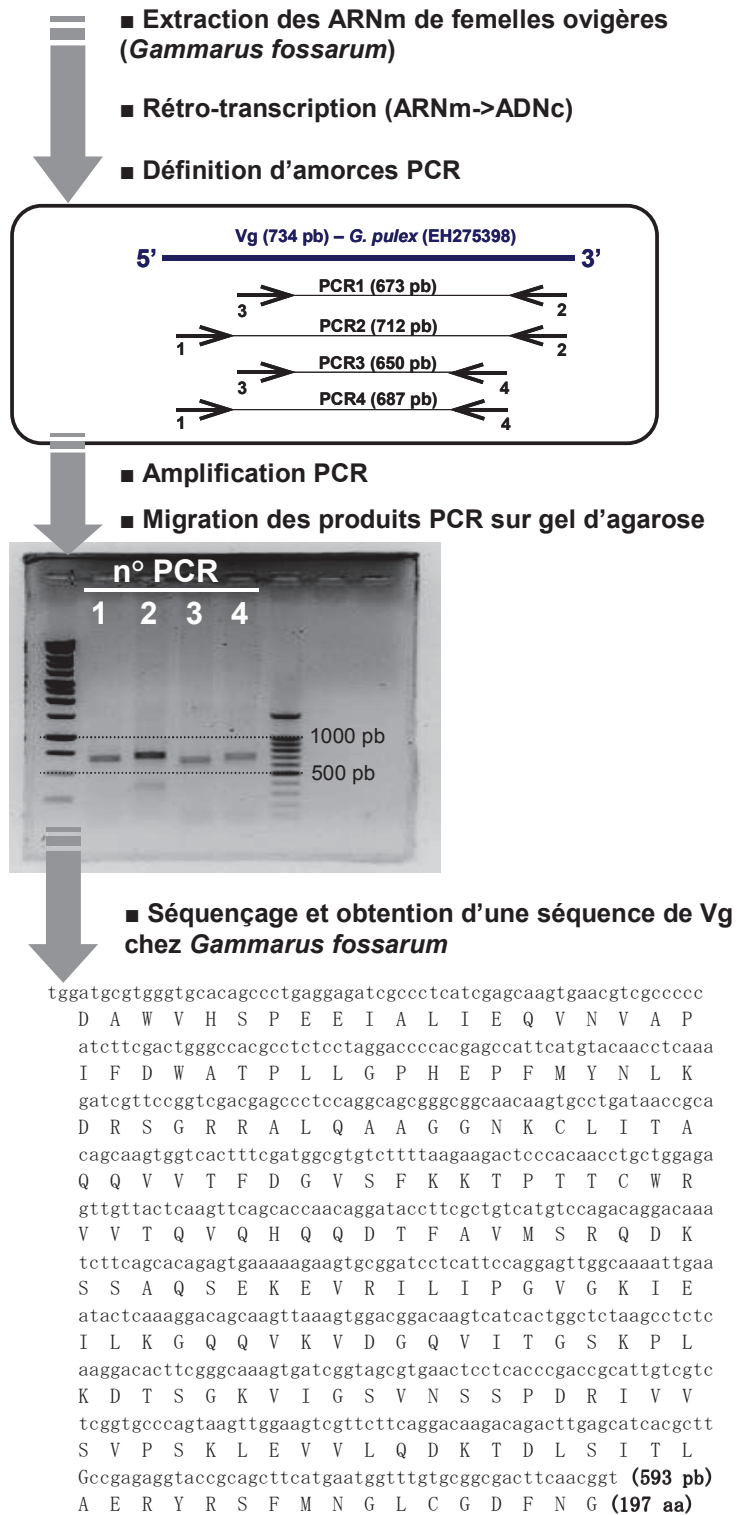
### 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les étapes et les résultats conduisant à l'obtention d'une séquence partielle de la Vg chez *Gammarus fossarum* sont présentés sur la **Figure 3.1**.

Les produits PCR 1, 2, 3, et 4 séparés sur gel d'agarose ont indiqué que les amorces PCR sont spécifiques de la Vg puisqu'après migration des produits PCR sur gel d'agarose, les bandes d'intérêt sont à la taille attendue. Ces produits ont été purifiés et séquencés. Enfin, le séquençage a permis d'obtenir une séquence génomique de 593 pb qui a été traduite à l'aide du logiciel Expasy en séquence peptidique (197 aa).

### 4. CONCLUSION

Un ADNc codant pour la Vg de *Gammarus fossarum* a été isolé, séquencé et déposé dans les banques de données génomiques (numéro d'accèsion Genbank : *GU985184*). L'obtention et la traduction de cette séquence en acides aminés a permis de s'intéresser au développement d'une méthode de dosage des peptides spécifiques de la Vg chez cette espèce.



**Figure 3.1.** Etapes conduisant au séquençage partiel de la Vg chez *Gammarus fossarum*.



### 3.1.2. Publication n°1 :

**L'essai LC-MS/MS en alternative à l'ELISA pour la quantification de biomarqueurs en écotoxicologie : application à la mesure de vitellogénine chez un crustacé (*Gammarus fossarum*)**

*Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 5109-5115

**Simon R.<sup>a</sup>, Jubeaux G.<sup>b</sup>, Chaumot A.<sup>b</sup>, Lemoine J.<sup>a</sup>, Geffard O.<sup>b</sup>, Salvador A.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> UMR 5180 Sciences Analytiques, Bât. CPE, Université de Lyon, Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, France

<sup>b</sup> Unité de Recherche MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, Lyon, France.

#### Résumé :

La mesure de vitellogénine (Vg) est un biomarqueur répandu pour détecter l'exposition à des perturbateurs endocriniens. La quantification de Vg est classiquement réalisée en utilisant la méthode ELISA. Ce test, étant spécifique à une protéine donnée, il ne peut que rarement être utilisé sur d'autres espèces en raison de la faible conservation des séquences protéiques entre espèces. Ainsi, des méthodes analytiques alternatives doivent être considérées étant donné que la mise au point d'un test ELISA spécifique et sensible pour chaque nouvelle espèce cible prend généralement beaucoup de temps et peut se révéler infructueuse. Cet article est centré sur le développement d'une méthode de dosage de la Vg par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) chez un invertébré aquatique (*Gammarus fossarum*) pour lequel aucun anticorps n'est disponible. La linéarité de la méthode a été testée sur une gamme de concentration allant de 2,5 à 25000 pg/mL et la limite de détection a été estimée à 0,75 pg/mL de Vg. Nous avons démontré que cette méthode représentait une alternative pertinente aux méthodes immunologiques existantes pour quantifier la Vg chez les invertébrés en raison de sa plus grande sensibilité, spécificité et reproductibilité (variabilité intra- et inter-essai inférieure à 15%). Cette méthode de dosage a alors été utilisée pour quantifier la Vg chez des femelles de *G. fossarum* exposées à un perturbateur endocrinien modèle chez les crustacés : le méthyle-farnesoate. La disponibilité d'un dosage quantitatif de la Vg par LC-MS/MS ouvre également la voie pour de futures études afin d'évaluer les effets des xénoestrogènes chez des mâles de *G. fossarum*.

#### Mots clés :

*biomarqueurs, quantification de protéine, crustacé, spectrométrie de masse, vitellogénine, perturbateur endocrinien, MRM.*





Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*)

Romain Simon<sup>a</sup>, Guillaume Jubeaux<sup>b</sup>, Arnaud Chaumot<sup>b</sup>, Jérôme Lemoine<sup>a</sup>,  
Olivier Geffard<sup>b</sup>, Arnaud Salvador<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR 5180 Sciences Analytiques, Bât. CPE, Université de Lyon, Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex, France

<sup>b</sup> Unité de Recherche MALY, Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, Lyon, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 29 March 2010

Received in revised form 17 May 2010

Accepted 4 June 2010

Available online 9 June 2010

## Keywords:

Biomarkers  
Protein quantification  
Crustacean  
Mass spectrometry  
Vitellogenin  
Endocrine disruptor  
MRM

## ABSTRACT

Vitellogenin (Vg) is a widespread biomarker for measuring exposure to endocrine disruptors. Vg quantification is usually done by using the ELISA test (enzyme-linked immunosorbent assay). Since this test is specific to a target protein, it can rarely be used with other species due to low cross-reactivity across species. Therefore alternative analytical methods have to be considered as the development of a specific and sensitive ELISA test for each new target is time-consuming and may prove unsuccessful. This paper focuses on the development of a quantitative assay by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) of vitellogenin in an invertebrate (*Gammarus fossarum*) for which no ELISA kit is available. The linearity of the method was within the concentration range 2.5–25,000 pg/mL and the limit of detection was estimated at 0.75 pg/mL of Vg. This method has been demonstrated to be an alternative to existing immunological methods for quantifying Vg in invertebrates due to its greater sensitivity, specificity and reproducibility (intra- and inter-assay below 15%). This assay was applied for Vg determination in female *G. fossarum* following exposure to a known endocrine disruptor, methyl farnesoate, in crustaceans. The availability of a quantitative *G. fossarum* LC-MS/MS assay should open the way for further studies to evaluate xenoestrogen effects in aquatic male *G. fossarum*.

© 2010 Published by Elsevier B.V.

## 1. Introduction

The egg yolk precursor protein vitellogenin (Vg) is produced by mature females of oviparous animals in response to circulating steroid hormones. Gene coding for Vg is also present in males but is normally silent. When exposed to endocrine disruptors, the Vg gene is turned on [1] and Vg protein is synthesized [2]. Therefore, the measurement of plasma Vg levels in immature females and males is now considered as a useful biomarker of exposure to endocrine disruptors [3]. The induction of vitellogenin in male vertebrates has been extensively used as a biomarker of estrogen exposure across fish species [4–6]. On the contrary, despite their obvious ecological importance, relatively few works have been carried out on invertebrates, and, consequently few tools are available for diagnosing exposure to endocrine disruptors and its effects in these organisms [7]. However, there is growing evidence that crustaceans, such as Amphipoda, may be susceptible to endocrine disruptors [8,9], but until now, no specific endocrine disruptor biomarkers related to

reproductive impairments have been available in freshwater crustaceans. In Europe, *Gammarus fossarum* (*G. fossarum*) is recognized as a relevant test species and has been intensively used in ecotoxicology [10,11]. It is widespread and common in West Palearctica, often occurring in high densities, and is easy to identify at species level. Finally, this species plays a major role in the leaf litter breakdown process and consequently in the entire food web [12].

Numerous strategies have been proposed for Vg quantitation in fish [13,14] and other vertebrates [15–17]. Among them, “in-house” or commercial enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA test) [13] have been developed for a variety of fish species. The ELISA method has proven to be a reliable and sensitive method of measuring Vg levels [18] and is now applied routinely to investigate the biological impact of endocrine disruptors on numerous vertebrate species (e.g., fish). In contrast, only a limited number of antibodies targeted against invertebrate Vg [19] are currently available [20,21]. Alternative indirect assays such as the organic alkali-labile phosphate (ALP) assay have been proposed [22,23]. The ALP method is based on the determination of labile phosphates released by Vg after hydrolysis in an alkali buffer, considering that Vg is the only protein containing phosphorous. Significant correlation has been demonstrated with other direct assays of Vg in fish species [24,25].

\* Corresponding author. Fax: +33 4 72 43 11 52.

E-mail address: [arnaud.salvador@univ-lyon1.fr](mailto:arnaud.salvador@univ-lyon1.fr) (A. Salvador).



The release of inorganic phosphates can therefore be considered as a biomarker of response to estrogen exposure, even though it provides neither a quantitative nor direct measurement of egg-yolk protein concentrations. The drawback of these chemicals is that they are indirect, relying on phosphorous concentrations and ALP measurement relies on the fact that Vg is the only protein containing phosphorous.

Hence, efforts should be directed towards the design of more specific, sensitive, robust and cost-effective methods to measure Vg levels in invertebrates. For this purpose, absolute quantitation of proteins by using mass spectrometry with selected reaction monitoring or multiple reaction monitoring (MRM) and stable isotope dilution, is an alternative to conventional immunoassays. Basically, the absolute quantitation of a protein is provided by concomitant monitoring of MRM signals corresponding to, respectively, one or many proteotypic peptides resulting from enzymatic hydrolysis (usually by trypsin) of the target protein and to its synthetic stable isotope-labeled isotopomer. Regarding this, we recently reported the first mass spectrometry-based clinical assay of a human protein (prostate specific antigen) in the ng/mL concentration of serum [26]. Zhang et al. [27] and Cohen et al. [28] applied a similar approach for quantifying Vg in fish, by tracking an *in silico* designed proteotypic peptide. In the present report, we describe the development and validation of an MRM assay aimed at quantitating Vg in *G. fossarum*, an aquatic invertebrate. The assay was then applied to the measurement of Vg expression in females exposed to methyl farnesoate, a known hormonal-mimetic endocrine disruptor in Crustaceans. Our method will allow more exhaustive investigations in the future into how the hormonal regulation of *G. fossarum* vitellogenesis can be disrupted by experimental or environmental exposure to chemicals.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and chemicals

Acetonitrile and water (LC–MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAM), formic acid (FA) (LC–MS grade), trypsin (type IX-S from Porcine Pancreas), urea and TRIS, EDTA, Triton X, sodium chloride, leupeptin and aprotinin were purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Isotopically labeled peptide ILIPGV\*(<sup>13</sup>C<sub>5</sub><sup>15</sup>N)K was purchased from Millegen (Labège, France) and VIGSVNSSPDR\*(<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>) was kindly synthesized by Biomérieux (Marcy l'Etoile, France). Methyl farnesoate was purchased from Tebu-Bio (Le Perray en Yvelines, France). Absolute ethanol and ethyl ether were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

### 2.2. Biological part

#### 2.2.1. Test organism collection and maintenance

Specimens of *G. fossarum* were sampled using a net (by kick sampling) from La Tour du Pin (Isère, France), upstream of the Bourbre River (mid-eastern France) and quickly transported to the laboratory (CEMAGREF, Lyon) in plastic bottles containing ambient fresh water. The organisms were kept during an acclimatization period of at least 10 days in 30-L tanks continuously supplied with drilled groundwater adjusted to the conductivity of the sampling site (i.e., 600  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) and under constant aeration. A 16/8 h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at  $12 \pm 1$  °C. Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*). The leaves were conditioned for at least  $6 \pm 1$  days in water. Freeze-dried Tubifex worms were given as a dietary supplement twice a week.

#### 2.2.2. Developmental plan

The aim of the first step of development was to detect peptides of interest obtained from the known amino acid sequence of *G. fossarum*. To do this, oocytes were obtained after dissection under binocular microscope of *G. fossarum* females at the end of vitellogenesis. Then, 20 oocytes of females at different levels (B, Ca, Cb, D1, D2) of vitellogenesis and entire male gonads were discarded in order to validate the choice of quantification and qualification peptide. A detailed description of the different developmental stages of *G. fossarum* oocyte maturation is given by Geffard et al. [29]. In addition, whole bodies of females at different levels (B, Ca, Cb, D1, D2) of vitellogenesis and males were sampled individually to validate the analytical methodology for individual measurements on whole bodies. Finally, in line with the reprotoxic test criteria defined [29], D2 females (hatched juveniles in brood pouches, visible gonads, guarding male) were selected and exposed to several concentrations of methyl farnesoate (crustacean hormone) for 21 days to identify the possible modulation of this protein in organisms previously exposed to endocrine disruptors.

#### 2.2.3. Extraction procedure

Gonads and whole bodies were homogenized, respectively in 250 and 1000  $\mu\text{L}$  icecold Tris buffer (Tris 50 mM; 100 mM NaCl; 0.01 mM EDTA) adjusted to pH 7.8 plus 10  $\mu\text{g}$  of each leupeptine and aprotinine per liter of buffer, with an Ultra-Turrax® T25 basic at 24,000 rpm for 35 s. All the homogenates were centrifuged at  $10,000 \times g$  at 4 °C for 15 min. 250  $\mu\text{L}$  of clear supernatant was collected and delipidated by adding 750  $\mu\text{L}$  of ethanol/diethylether solution (1/1, v/v). The mixture was vortexed and replaced on ice for 10 min. Afterwards, samples were centrifuged at  $10,000 \times g$  at 4 °C for 10 min. Clear supernatant was removed, the bottom was remixed with 250  $\mu\text{L}$  Tris buffer. 3 mL of ammonium bicarbonate 50 mM and DTT at a final concentration of 15 mM were added to the supernatant. Samples were incubated for 40 min at 60 °C. After cooling to room temperature, IAM was added (final concentration of 15 mM) and the samples were placed in the dark at room temperature for 40 min. 300  $\mu\text{g}$  of trypsin was added and samples were incubated for 4 h at 37 °C. Finally, 20  $\mu\text{L}$  of formic acid was added to stop the reaction. 10  $\mu\text{L}$  of each internal standard was added to 180  $\mu\text{L}$  of digested sample. The tubes were then vortexed for several seconds and the contents were transferred to glass autosampler vials.

### 2.3. Analytic part

#### 2.3.1. Liquid chromatography–mass spectrometry

LC–MS/MS analysis was performed with a system comprising an HP 1100 series HPLC device (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QTRAP® 5500 LC/MS/MS System hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo V™ ion source. Instrument control, data acquisition and processing were performed using the associated Analyst 1.5 software. The LC separation of the 20  $\mu\text{L}$  injected sample was carried out on a Symmetry C<sub>18</sub> column (100 mm  $\times$  2.1 mm, particle size 3.5  $\mu\text{m}$ ) from Waters (Milford, MA, USA). Elution was performed at a flow rate of 300  $\mu\text{L}/\text{min}$  with water containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent A and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent B, employing a linear gradient from 5% B to 10% B in 10 min, followed by a 5-min linear gradient 10–20% B, then a 2-min linear gradient from 20% to 95% B. Then, column re-equilibration was performed for 10 min. The injection duty cycle was 30 min, taking into account the column equilibration time. The mass spectrometer was initially tuned and calibrated using polypropylene glycol, reserpine and Agilent Tuning Mix (all Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according

to the manufacturer's instructions. Q1 resolution was adjusted to  $0.7 \pm 0.1$  a.m.u. FWHM, referred to as unit resolution. Q3 was also set to unit resolution in MRM mode. MS analysis was carried out in positive ionization mode using an ion spray voltage of 5500 V. The nebulizer and the curtain gas flows were set at 30 psi using nitrogen. The Turbo V<sup>TM</sup> ion source was set at 450 °C with the auxiliary gas flow (nitrogen) set at 50 psi. An MRM-Initiated Detection and Sequencing (MIDAS<sup>TM</sup> Workflow) experiment was used to scout for suitable MRM transitions using purified tryptic peptides. Q1 and Q3 masses as well as collision energy values were predicted from the partial Vg primary sequence by using MRMPilot 1.0 Software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). From the initial set of candidate MRM transitions, transition tracking peptides, respectively, ILIPGVGK (398.8/457.3; 398.8/570.4) and VIGSVNSSPDR (565.8/918.5; 565.8/675.4), were selected for the final assay. The collision energies 21 and 17 eV for ILIPGVGK transitions and 29 and 31 eV for VIGSVNSSPD, declustering potential (91 V for VIGSVNSSPDR and 126 V for ILIPGVGK), and collision cell exit potential were optimized for each MRM transition chosen. The MRM transitions were monitored and acquired at unit resolution in Q1 and Q3, with a dwell time of 135 ms used for each transition, to obtain between 25 and 30 data points per chromatographic peak.

### 2.3.2. Preparation of standard and quality control samples

Stock standard peptide solutions of ILIPGVGK and ILIPGV\*GK were prepared independently by dissolving accurately weighed standard compounds in an H<sub>2</sub>O/ACN (95/5, v/v) mixture containing 0.1% of formic acid to yield a concentration of 100 µg/mL. Both stock solutions were diluted further with an H<sub>2</sub>O/ACN (95/5, v/v) mixture containing 0.1% of formic acid to prepare the working solution. Then the peptides were spiked with 10 µL of working solution into digested whole bodies or extraction solvent to reach the desired concentrations of 2.5, 12.5, 25, 250, 2500 and 25,000 pg/mL to build the calibration curves. Quality controls were prepared from the 100 µg/mL stock solution to obtain the first solution close to the concentration found in whole males (i.e., QC<sub>1</sub> = 125 pg/mL) and the second solution close to the concentration found in whole females (i.e., QC<sub>2</sub> = 12500 pg/mL).

### 2.3.3. Digestion efficiency

Whole bodies were prepared as described previously (Section 2.2.3), except that they were removed from the bath at 37 °C following different incubation times (0, 1, 2, 4, 20, 28 and 88 h). 180 µL of digested bodies was taken and 10 µL of each internal standard was added. LC-MS/MS analysis was performed just after the addition of the internal standard. Urea (8 M) and formic acid were added to the reaction tube to unfold and block trypsin. Samples were then separated by 1D-SDS-PAGE and stained with Coomassie blue.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Peptide selection and MRM selection

Mass spectrometry in the so-called MRM mode is now considered a powerful alternative to the ELISA test for protein quantitation. It relies on monitoring MRM transition tracking proteotypic peptides as surrogates of the targeted protein after trypsin hydrolysis. Standardization is usually carried out internally by spiking the sample with the corresponding synthetic stable-isotope labeled peptide. The trypsin hydrolysis of a whole protein extract results in a highly complex peptide mixture. The sensitivity and specificity of the assay therefore obviously depend on the adequate selection of the proteotypic peptides that respond best. In the case of *G. fossarum* vitellogenin, only a partial gene sequence of 591 bases was obtained by Polymerase Chain Reaction (PCR) [30] (GenBank

DAVVHSPPEEIALIEQVNVAPIFDWATPLLGPHEPFMYNLKDRSGR  
RALQAAGGNKCLITAQQVVTDFGVSFKK **TP****TC****W****R** **V****V****T****Q****V****Q****H**  
**Q****Q****D****T****F****A****V****M****S****R** **Q****D****K****S****S****A****Q****S****E****K****E****V****R** **I****L****I****P****G****V****G****K** **I****E****I****L****K** **G****Q****Q****V****K**  
**V****D****G****Q****V****I****T****G****S****K****P****L****K** **D****T****S****G****K** **V****I****G****S****V****N****S****S****P****D****R** **I****V****S****V****P****S****K** **L****E****V**  
**L****Q****D****K** **T****D****L****S****I****T****L****A****E****R****Y****R****S****F****M****N****G****L****C****G****D****F****N****G**

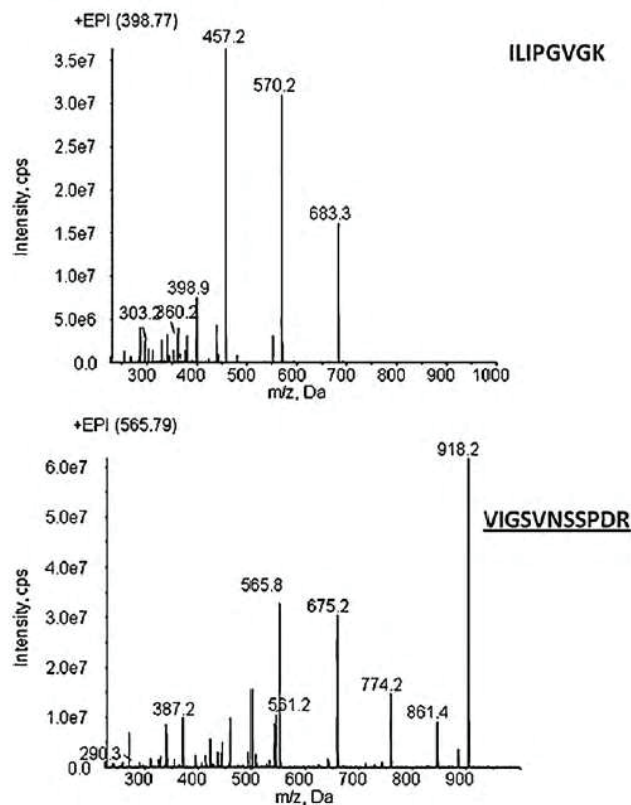


Fig. 1. Partial vitellogenin protein sequence of *G. fossarum* and the MS/MS spectra of two observed peptides. The bold and underlined amino acids in sequence represent peptides detected in the MRM assay.

accession number GU985184), which translates into a putative partial protein sequence of 197 amino acid residues (Fig. 1). Since the recombinant protein was not available, the putative proteotypic peptides and their proper MRM transitions were designed *in silico* using an adapted MRM-initiated Detection and Sequencing (MIDAS) approach. Using the MIDAS software tool, a set of MRM transitions was generated from doubly protonated molecular ions of the predicted tryptic. By selecting the most likely y fragment ions above the *m/z* precursor ion value, a selection of 82 transitions was used for LC-MS/MS evaluation. Furthermore, MS/MS scans were triggered on each compound detected in order to check that no fragment ion (y or b ion series) was selected in the MRMs giving a higher signal (endogenous peptides). The peptide selection was first evaluated with a sample of trypsin hydrolysate from female oocyte extract at D grade of vitellogenesis, which normally contains a high level of expressed Vg. Of the 23 putative peptides potentially generated by trypsin hydrolysis of the partial vitellogenin sequence, 8 were unambiguously detected (Fig. 1) owing to the peptide sequence deduced from their respective product ion spectra. The product ion mass spectra of these peptides were then checked manually to confirm the peptide sequence as reported in Fig. 1 for 2 peptides. For each unambiguously attributed peptide sequence, 3 MRM transitions were chosen from the most intense MS/MS fragment ions and optimized in order to detect the most sensitive channels. Proteotypic peptides giving rise to the highest signal to noise ratios on

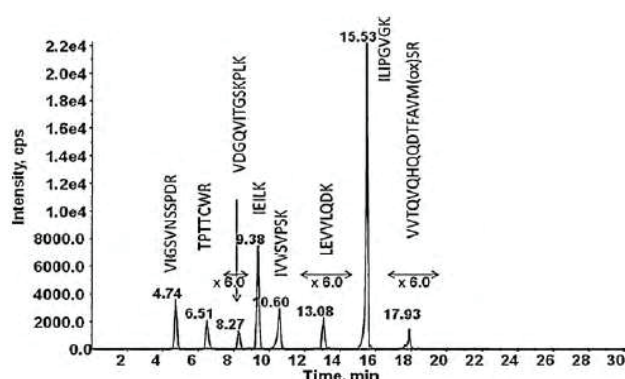


Fig. 2. Reconstructed chromatograms (TIC) showing the sum of the 8 tryptic peptides observed (3 MRM transitions per peptide) of Vg.

the reconstructed ion chromatogram were in the following order: ILIPGVGK > IEILK > VIGSVNSSPDR > IVVSPSK > TPTTCWR (Fig. 2).

Although the determination of an MRM assay would appear to be inherently specific, since at least two rounds of mass analysis were conducted, it fails to provide convincing evidence that the precursor and product ion  $m/z$  values chosen to detect the target are not redundant. This issue raises the potential for false positives since the MRM assays are used as a proxy for peptide and protein identities. This means that there is a strong likelihood that certain reported MRM assays are not exclusive, and may indeed map to multiple peptides in the sample. This is particularly the case if we wish to simplify the protocol by working on whole *G. fossarum* organisms instead of specific tissues such as oocytes. The most sensitive peptide is interesting for achieving the highest signal to noise (S/N) ratio, but it must also be specific to the target protein.

Indeed, selecting the tryptic peptides that can be used to quantify target proteins is a crucial step. These peptides must have three important characteristics. Firstly, their ionization must be sufficiently efficient to produce abundant ions in the mass spectrum, which is the case of the ILIPGVGK peptide. Secondly, as already mentioned, they should be discriminated against other more abundant proteins or matrix ions. Finally, as the quantification is carried out on a single peptide for one protein, this peptide must be specific to the protein considered, thus reducing the risk of false positives during the analysis. To conclude on the best peptide (sensitive and specific) for Vg quantitation, MRM transitions were finally tested against 20 protein extracts of *G. fossarum* oocytes at different grades of vitellogenesis (B, Ca, Cb, D1, D2) and entire male gonads. As seen in Fig. 3A and B, good correlations were observed, plotting the peptide area (1) ILIPGVGK versus VIGSVNSSPDR, and (2) ILIPGVGK versus TPTTCWR with corresponding correlation coefficients at 0.991 and 0.973, respectively. The same results with lower regression were obtained between ILIPGVGK/IVVSPSK (data not shown,  $R = 0.926$ ). These results demonstrate that whatever the sample, the ratios between reporter peptides are constant. This means that (1) specificity, ionization conditions and, more generally, matrix effects, are similar for each peptide and that (2) the sample preparation and above all digestion conditions are reproducible. The IEILK peptide is a good example of a bad reporter peptide. As illustrated in Fig. 3C, the correlation between IEILK and other peptides is low with a regression coefficient of 0.831 for the ILIPGVGK peptide and should be avoided for accurate quantification.

Based on the good sensitivity and analytical correlation found here, we concluded that the ILIPGVGK peptide could be used as a quantification peptide. MRM transitions signals were observed for the ILIPGVGK peptide sequence, corresponding to the  $[M+2H]^{2+}$  precursor ion at  $m/z$  398.8 and giving rise to  $y_5$ ,  $y_6$  and  $y_7$  fragment ions at  $m/z$  457.3, 570.4 and 683.5, respectively.

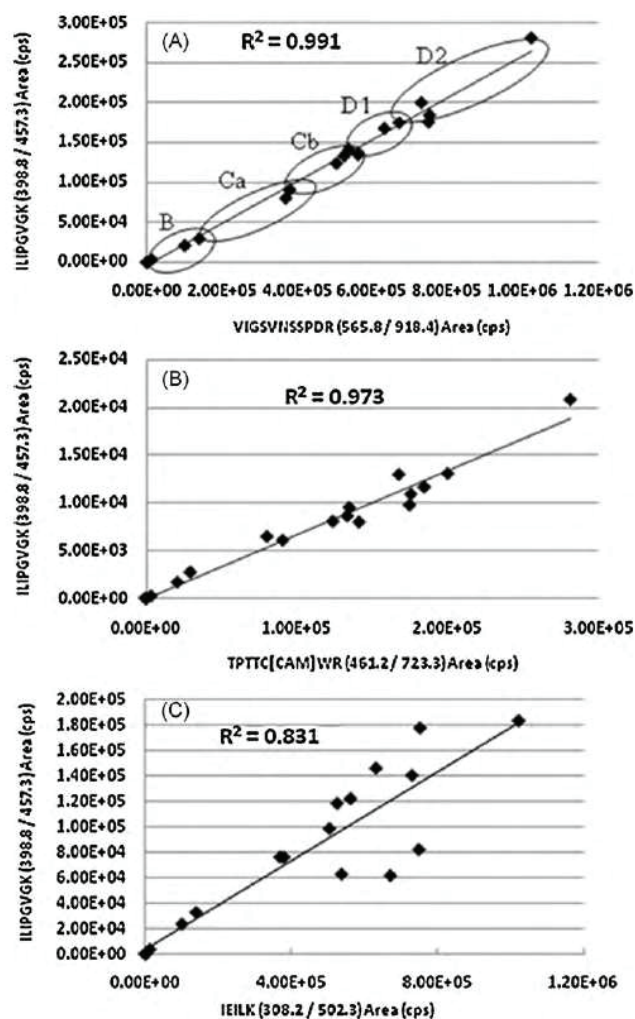


Fig. 3. Correlation of the chromatographic peak area between the ILIPGVGK peptide with other Vg peptides (A–C). Reproduction cycle times (from phase B to phase D2) are also presented (A). The same set of samples was used for the two other comparisons (B and C).

Although less sensitive peptides are not useful for quantification, they could be used as qualification peptides. When performing protein quantification, only unique peptides are taken into consideration, whereas peptides belonging to more than one protein sequence are used only to prove the identity of the corresponding proteins, therefore they are qualification peptides. The second most intense peptide of VIGSVNSSPDR/IVVSPSK/TPTTCWR can be used as a qualification peptide. However, due to its lower correlation with other peptides, IVVSPSK was not chosen later as a qualification peptide.

### 3.2. Digestion efficiency

VIGSVNSSPDR was preferred for ion qualification because it did not contain a cysteine residue. Indeed, this amino acid can form disulfide bridges that have the negative effect of decreasing the efficiency of the digestion step. Although digestion seemed reproducible, it was necessary to demonstrate digestion efficiency.

As the molar concentration of the protein to be measured is equal to the molar concentration of the selected peptide, the major requirement was that digestion had to be complete to ensure accurate quantification. This was challenging to attain in practice, especially if we consider performing quantification from an

entire organism (corresponding to a maximal amount of protein 1.15 mg in D2 females) because of the need to add an extremely large amount of trypsin to reach the conventionally accepted ratio of trypsin over protein, which must be in the range 1/20–1/100. In practice, the concentration of the protein is calculated by a calibration curve after spiking with the labeled reporter peptide and digestion. Therefore in the case of incomplete digestion, the response of the reporter peptide is lower than response expected for 100% digestion.

To evaluate the efficiency of Vg digestion by trypsin in an entire organism, a time course study was carried out with LC–MS/MS after different incubation times with trypsin at 37 °C. The concentration of the reporter peptide ILIPGVGK increased rapidly from 0 to 20 h, with the maximum around 20 h, and increased slightly from 20 to 28 h. For further analyses, a digestion time of 28 h was selected. It should be noted that the analyte area decreases if the digestion time is too long (88 h). This phenomenon could be explained by analyte degradation, as reported by Arsene et al. [31]. To complete the study of Vg trypsin digestion kinetics still further, digested samples were also analyzed by SDS-PAGE. No visible Vg were present after 28 h of tryptic digestion (data not shown).

### 3.3. Assay validation

The assay was developed to analyze Vg from entire *G. fossarum* species after grinding samples obtained after exposure to a chemical disruptor. Quantification of Vg was performed in MS by comparing the extracted ion signal (peak height or peak area) of the isotope-labeled and native forms of the proteotypic peptide ILIPGVGK. As a general rule, isotope dilution-based quantification methods display good linearity and excellent precision, regardless of the quantification standard used. Application of the isotope dilution principle to MS quantification of proteins by using isotope-labeled peptide analogues is termed AQUA [32] for “Absolute Quantification”. AQUA standards (ILIPGV\*GK) correspond to synthetic peptides that can be spiked into the samples after the proteolysis step (with the same elemental composition but with  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  to change the peptide mass). The retention time and fragmentation pattern of the native peptide ILIPGVGK formed by trypsinization are the same as that of the AQUA standards. Since an absolute amount of the AQUA peptide is added, the ratio of both peak areas is used to determine the precise amount of Vg in the sample extract. The internal standard is present after digestion as native peptides are formed, so that peptide extraction efficiency, absolute losses during sample handling (including sample concentration), and variability during introduction into the LC–MS system do not normally affect the determined ratio of native and AQUA peptide abundances.

Since we had no idea of the expected concentration of Vg, a wide range of concentrations for the peptide ILIPGVGK and the AQUA standard were evaluated. The range of the calibration curve was thus defined as wide as possible 2.5–25,000 pg/mL (4 decades of concentration). Linearity, LOD, LOQ, intra-run precision and accuracy were established to evaluate the method's performance. A calibration curve was generated for ILIPGVGK and the AQUA standard in both the protein extraction solvent used with and without the male *G. fossarum* organism. This was done in order to also evaluate the effect of sample loss and potential signal loss due to sample preparation and potential ion suppression in the system. Linearity, LOD and LOQ were calculated for these experiments individually.

#### 3.3.1. Linearity, LOD and LOQ in the protein extraction solvent

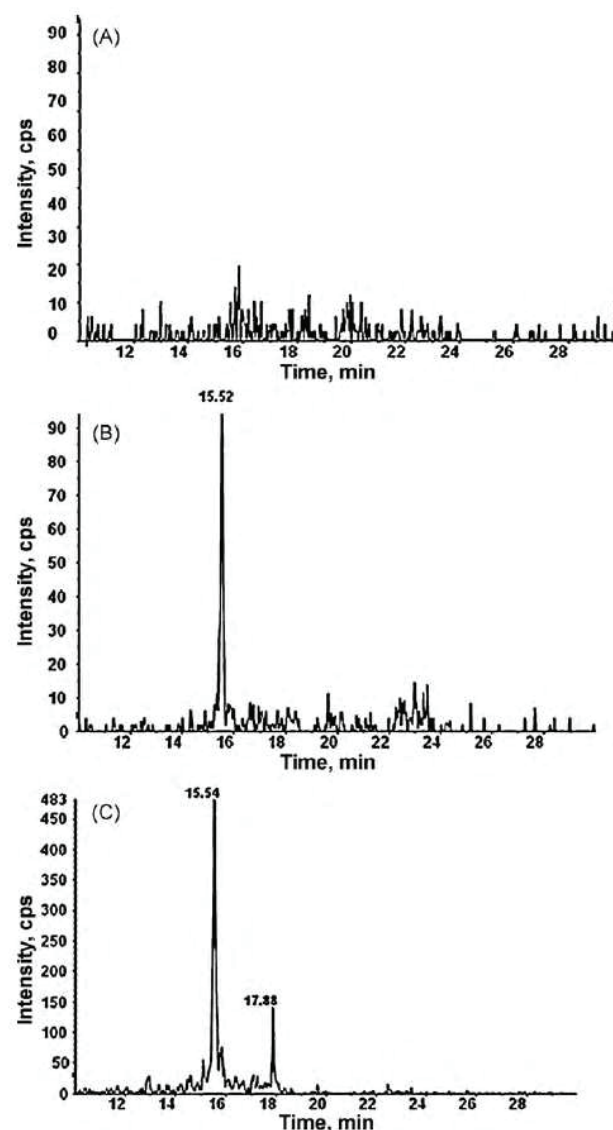
A weighted ( $1/x^2$ ) least-square linear regression of response versus concentration was used for the calibration. Both calibration curves based on the extraction samples analyzed confirmed the expected high degree of linearity ( $r^2 \sim 0.998$ ) (Table 1). Identical

**Table 1**  
Calibration curve regression parameters.

		Linear regression curve	$R^2$
Extraction solvent	ILIPGVGK	$y = 124x + 442$	0.998
	ILIPGV*GK	$y = 127x + 272$	0.998
Male	ILIPGVGK	$y = 157x + 3.89e3$	0.999
	ILIPGV*GK	$y = 139x + 744$	0.998

slopes for ILIPGVGK and heavy ILIPGV\*GK calibration demonstrates that the heavy peptide could be used for ILIPGVGK quantification whatever its concentration. The absolute quantification is determined by comparing the abundance of the known AQUA internal standard peptide added to the sample with the native peptide.

LOD was determined by loading a decreasing amount of the standard peptide onto the LC–MS/MS system until the signal reached three times the noise level. LOD and LOQ at 0.75 pg/mL or 1 pmol/L ( $S/N = 3$ ) and 2.5 pg/mL or 3.3 pmol/L ( $S/N = 10$ ) ILIPGVGK, respectively indicate that endogenous normal levels of ILIPGVGK could be measured under optimal conditions (Fig. 4). The compar-



**Fig. 4.** Extracted ion chromatogram of MRM transition (398.8 to >457.3) monitored for ILIPGVGK (A) protein extraction solvent, (B) protein extraction solvent spiked at 2.5 pg/mL, and (C) male *G. fossarum* extract.

**Table 2**  
Intra-day variation for ILIPGVGK (398.8/457.3) and ILIPGV\*GK (401.8/463.3) ( $n=6$ ).

	Nominal concentration (pg/mL)	Determined concentration (mean $\pm$ SD)	Precision (%) <sup>a</sup>	Accuracy (%) <sup>b</sup>	Matrix effect in male (mean $\pm$ SD)
Spiked blank (ILIPGVGK)	125	142.17 $\pm$ 5.08	3.57	12.08	
	12,500	13567 $\pm$ 1551	11.43	7.86	
Spiked blank (ILIPGV*GK)	125	140.17 $\pm$ 19.95	14.24	10.82	
	12,500	12567 $\pm$ 873	6.95	0.53	
Spiked male (ILIPGV*GK)	125	133.2 $\pm$ 6.05	4.55	6.16	106 $\pm$ 14.08
	12,500	12500 $\pm$ 303	2.43	0.00	109 $\pm$ 6.69

<sup>a</sup> Expressed as RSD: (SD/mean)  $\times$  100.

<sup>b</sup> Expressed as % difference: [(concentration found – concentration added)/concentration added]  $\times$  100.

ison of these LOD/LOQ values with those obtained from the ELISA assay for Vg in the mysid *Neomysis integer* by Ghekiere et al. [19] are in the same range of sensitivity (<10 pmol/L) or show an improvement of the S/N level using the MRM approach. Indeed their ELISA assay was capable of detecting Vg levels at 4 ng/mL, which corresponds to 5.7 pmol/L according of the molecular weight (700 kDa) of Vg previously published by the authors [33].

### 3.3.2. Linearity, precision and accuracy in the male *G. fossarum* extract

Male extracts were chosen in order to evaluate the response linearity of the biological matrix, as Vg is normally not present or is at a very low range of concentration. The slope of the calibration curve plotted with the heavy peptide (ILIPGV\*GK) standard spiked in the matrix of the male extract is similar to that observed when it is spiked in the protein extraction solvent. However, the slope of the calibration curve of non-labeled peptide ILIPGVGK is 25% higher than the calibration curve for the solvent extract. This small difference is due to the matrix effect and the presence of a small amount of Vg in the male extract (estimated at 17.8 pg/mL of the reporter peptide). Besides, the intercept ( $3.89e^3$ ) reflects endogenous Vg. Intra-assay precision and accuracy were assessed by preparing and analyzing six replicates of the standards at two concentrations levels (125 and 12,500 pg/mL). Intra-assay precision (expressed as percent relative standard deviation, %RSD) ranged from 2% to 15% and intra-assay accuracy (expressed as percent of nominal values) ranged from 0% to 13% (Table 2).

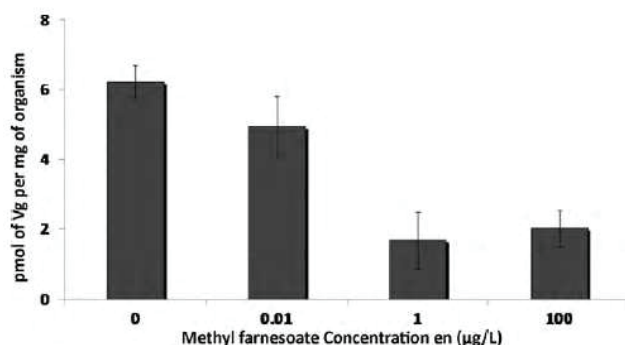
### 3.3.3. Matrix effect evaluation

The matrix effect in mass spectrometry expresses the influence of co-eluting compounds on the ionization yield of a targeted molecule. This matrix effect generally takes the form of either ion suppression or ion enhancement. In our case, the matrix effect was evaluated by comparing the relative areas of neat standards in the protein extraction solvent and that of *G. fossarum* male extracted and spiked with the heavy internal standard ( $n=6$ ) after protein digestion at two concentration levels (125 and 12,500 pg/mL).

The heavy peptide was chosen to evaluate the matrix effect in both the female and the male samples since only a small quantity of vitellogenin is present in the male. Based on the results given in Table 2, the amount of ion suppression (expressed as [(mean peak area of post-extraction spiked male samples/mean peak area of solvent samples)  $\times$  100] ranges from 6% to 9%.

### 3.4. Biological relevance

As shown in Fig. 3A, the concentration of Vg level increases throughout the reproductive cycle of females with the maximum occurring at stage D2, corresponding to mature organisms and just before egg laying. A strong increase appears during the C stage. This observation agrees with the results obtained by Geffard et al. [29] who showed that the highest oocyte growth occurs during C



**Fig. 5.** Vitellogenin concentration (in pmol of Vg/mg of organism, mean  $\pm$  SD,  $n=5$ ) in *G. fossarum* females exposed to methyl farnesoate concentrations ranging from 0 to 100 µg/L.

moulting stages. Moreover, Vg is also present in males but at very low levels compared to mature females (data not shown). Besides the analysis of the natural variation of Vg concentrations, we also checked that Vg production can be modulated after organisms were exposed to a hormonal-mimetic compound. Methyl farnesoate (MF) is an important terpenoid hormone present in crustaceans that plays a major role in a wide range of hormonally regulated crustacean reproduction processes [34]. Vg contents measured in control and exposed females by LC–MS/MS are presented in Fig. 5. The vitellogenin concentration calculated with the ILIPGVGK peptide is presented for each MF concentration. Vg protein concentrations are expressed in picomole of Vg per mg of organism. A dose-response relationship was observed between ILIPGVGK peptide levels and MF concentrations, showing that Vg synthesis can be modulated and inhibited after exposure to an endocrine disruptor. Similarly, Mak et al. [35] showed that MF concentrations inhibited Vg gene expression during specific stages of crab ovary and egg development. The correlation between LC–MS/MS and reference ELISA method has not been achieved as no assay was available for *G. fossarum*. However, we already demonstrated in the case of clinical samples [26] that LC–MS/MS amounts of a biomarker determined by MS across real sample were very closely correlated to those determined by a commercial ELISA test.

## 4. Conclusion

A sensitive and reliable LC–MS/MS method for the analysis of Vg in the species *G. fossarum* has been successfully developed and validated. The initial data obtained on the quantification of Vg in *G. fossarum* demonstrated that LC–MS/MS is a powerful and fast method for quantifying the Vg protein in invertebrate organisms, especially for organisms for which no enzyme-linked immunosorbent assay is available. LC–MS/MS should be a robust and relevant approach for proposing potential endocrine disruptor biomarkers in invertebrates for which high phylogenetic diversity is observed.

Also, ELISA assays cannot be generalised easily from one species to another. However, in *G. fossarum*, further studies are needed before proposing Vg measurement as a specific endocrine disruptor biomarker in gammarids and as an indicator of reproductive impairment. Similarly, analytical developments are still needed to significantly reduce the time of sample digestion by trypsin, which could be managed, for instance, substituting the classical aqueous buffer for buffer enriched with organic solvent.

### Acknowledgments

This research was funded by the French Ministry of Ecology, Energy, Sustainable Development, Territorial Development and the Sea (MEEDDM), through the national research programme on endocrine disruptors (PNRPE).

### References

- [1] G. Flouriot, F. Pakdel, B. Ducouret, Y. Valotaire, J. Mol. Endocrinol. 15 (1995) 143.
- [2] N.D. Denslow, M.C. Chow, K.J. Kroll, L. Green, Ecotoxicology 8 (1999) 385.
- [3] J.P. Sumpter, S. Jobling, Environ. Health Persp. 103 (1995) 173.
- [4] A.P. Scott, M. Sanders, G.D. Stentiford, R.A. Reese, I. Katsiadaki, Mar. Environ. Res. 64 (2007) 128.
- [5] K.A. Kidd, P.J. Blanchfield, K.H. Mills, V.P. Palace, R.E. Evans, J.M. Lazorchak, R.W. Flick, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (21) (2007) 8897.
- [6] J.-Y. Aoki, M. Nagae, Y. Takao, A. Hara, Y.-D. Lee, I.-K. Yeo, B.-S. Lim, C.-B. Park, K. Soyano, Sci. Total Environ. 408 (3) (2010) 600.
- [7] M. Oetken, J. Bachmann, U. Schulte-Oehlmann, J. Oehlmann, W.J. Kwang, International Review of Cytology, Academic Press, 2004, pp. 1–44.
- [8] M. Schirling, D. Jungmann, V. Ladewig, K.U. Ludwischowski, R. Nagel, H.R. Kohler, R. Triebkorn, Ecotoxicology 15 (2006) 143.
- [9] G. Yang, P. Kille, A.T. Ford, Aquat. Toxicol. 88 (2008) 81.
- [10] B. Xuereb, A. Chaumot, R. Mons, J. Garric, J.O. Geffard, Aquat. Toxicol. 93 (2009) 225.
- [11] B. Xuereb, E. Lefèvre, E.J. Garric, O. Geffard, Aquat. Toxicol. 94 (2009) 114.
- [12] D.M. Forrow, L. Maltby, Environ. Toxicol. Chem. 19 (2000) 2100.
- [13] M. Fenske, R. Van Aerle, S. Brack, C.R. Tyler, H. Segner, Comp. Biochem. Phys. C 129 (2001) 217.
- [14] M. Islinger, H. Yuan, A. Voelkl, T. Braunbeck, Biomarkers 7 (1) (2002) 80.
- [15] L.K. Irwin, S. Gray, E. Oberdörster, Aquat. Toxicol. 55 (2001) 49.
- [16] S.M. Brasfield, L.P. Weber, L.G. Talent, Environ. Toxicol. Chem. 21 (7) (2002) 1410.
- [17] B. Jiménez, G. Mori, M.A. Concejero, R. Merino, S. Casini, M.C. Fossi, Chemosphere 67 (2007) 375.
- [18] B.M. Nilsen, K. Berg, A. Arukweb, A.G. Ob, Mar. Environ. Res. 46 (1–5) (1998) 153.
- [19] A. Ghekiere, M. Fenske, T. Verslycke, C. Tyler, C. Janssen, Comp. Biochem. Phys. A 142 (2005) 43.
- [20] Q. Li, M. Osada, T. Suzuki, K. Mori, Invertebr. Reprod. Dev. 33 (1998) 87.
- [21] C. Blaise, F. Gagné, J. Pellerin, P.D. Hansen, Environ. Toxicol. 14 (1999) 455.
- [22] B. Gagnaire, F. Gagné, C. André, C. Blaise, K. Abbaci, H. Budzinski, M.-H. Dévier, J. Garric, Aquat. Toxicol. 92 (2009) 155.
- [23] V. Matozzo, F. Gagné, M. Gabriella Marin, F. Ricciardi, C. Blaise, Environ. Toxicol. Int. 34 (2008) 531.
- [24] J.J. Nagler, S.M. Ruby, D.R. Idler, Y.P. So, Can. J. Zool. 65 (1987) 2421.
- [25] F. Gagné, C. Blaise, J. Hellou, Comp. Biochem. Phys. C 138 (2004) 33.
- [26] T. Fortin, A. Salvador, J.-P. Charrier, C. Lenz, X. Lacoux, A. Morla, G. Choquet-Kastylevsky, J. Lemoine, Mol. Cell. Proteomics 8 (5) (2009) 1006.
- [27] F. Zhang, M.J. Bartels, J.C. Brodeur, K.B. Woodburn, Environ. Toxicol. Chem. 23 (6) (2004) 1408.
- [28] A.M. Cohen, A.A.H. Mansour, J.H. Banoub, J. Mass Spectrom. 41 (2006) 646.
- [29] O. Geffard, B. Xuereb, A. Chaumot, A. Geffard, S. Biagianti, C. Noël, K. Abbaci, J. Garric, G. Charmantier, M. Charmantier-Daures, Environ. Toxicol. Chem., in press, doi:10.1002/etc.268.
- [30] B. Xuereb, L. Bezin, H. Budzinski, R. Tutundjian, J. Garric, O. Geffard, Environ. Pollut., personal communication.
- [31] C.G. Arsene, O. Rüdiger, W. Burkitt, C. Pritchard, A. Henrion, G. O'Connor, D.M. Bunk, B. Güttler, Anal. Chem. 80 (2008) 4154.
- [32] S.A. Gerber, J. Rush, O. Stemman, M.W. Kirschner, S.P. Gygi, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (2003) 6940.
- [33] A. Ghekiere, T. Verslycke, L. De Smet, J. Van Beeumen, C.R. Janssen, Comp. Biochem. Physiol. A (2004) 427.
- [34] G.A. LeBlanc, Ecotoxicology 16 (2007) 61.
- [35] A. Mak, C.L. Choi, S.H.K. Tiu, J.H.L. Hui, S.S. Tobe, S.S. Chan, Mol. Reprod. Dev. 70 (2005) 288.



### **3.2. DEVELOPPEMENT ET GENERALISATION DE LA MESURE DE LA VITELLOGENINE CHEZ LES INVERTEBRES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE (LC-MS/MS)**

#### **Publication n°2 :**

**La vitellogénine au sein de la diversité des invertébrés : potentiel de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) pour le développement de biomarqueurs.**

*Environmental Science and Technology*, DOI ®:10.1021/es300550h

**Jubeaux G.<sup>a</sup>, Audouard-Combe F.<sup>a</sup>, Simon R.<sup>b</sup>, Tutundjian R.<sup>a</sup>,  
Salvador A.<sup>b</sup>, Geffard O.<sup>a</sup>, Chaumot A.<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Irstea, UR MALY, F-69336 Lyon, France.

<sup>b</sup> Université de Lyon, Lyon 1, UMR 5180 Institut des Sciences Analytiques, F-69622 Villeurbanne, France

#### **Résumé :**

La mise au point de méthodologies qui soient rapides, peu coûteuses et applicables sur une large gamme d'espèces constitue un enjeu majeur pour le développement de biomarqueurs en écotoxicologie. Avec l'apparition de techniques de génomique et de séquençage haut-débit bon marché, les outils « *omics* » pourraient alors faciliter l'évaluation des effets des contaminations pour l'ensemble de la biodiversité. Ainsi, nous avons testé le potentiel de quantification absolue de protéines, en utilisant la spectrométrie de masse, pour développer un dosage de protéines « *Vg-like* » chez les invertébrés. Pour cela, nous avons utilisé les séquences disponibles dans les bases de données publiques pour identifier rapidement les peptides protéotypiques de sept espèces provenant des principaux taxons des invertébrés protostomiens (mollusques bivalves ; crustacés amphipodes, branchiopodes, copépodes et isopodes ; insectes diptères). La validation fonctionnelle de la Vg a été réalisée en comparant les signaux protéomiques de tissus prélevés chez des femelles en reproduction et ceux provenant de contrôles négatifs (tissus mâles ou juvéniles). Dans une seconde partie, nous avons démontré chez des gammares, des daphnies, des drosophiles et des gastropodes que les tests validés chez des espèces séquencées pouvaient être transférés à des espèces non séquencées en raison de la bonne conservation des séquences protéiques de la Vg. Enfin, nous avons discuté de la pertinence de la spectrométrie de masse pour le développement de biomarqueurs (mesure spécifique, développement rapide, transférabilité entre espèces). Notre étude offre ainsi une illustration d'une stratégie prometteuse pour répondre au challenge de la biodiversité en écotoxicologie, qui consiste en l'utilisation des outils « *omics* » dans des perspectives comparatives et évolutives.

#### **Mots clés :**

*biomarqueur, perturbation endocrinienne, invertébrés, spectrométrie de masse, protéomique, vitellogénine.*





## Vitellogenin-like Proteins among Invertebrate Species Diversity: Potential of Proteomic Mass Spectrometry for Biomarker Development

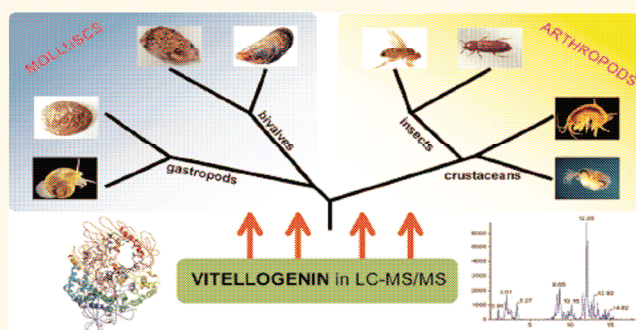
Guillaume Jubeaux,<sup>†</sup> Fabien Audouard-Combe,<sup>†</sup> Romain Simon,<sup>‡</sup> Renaud Tutundjian,<sup>†</sup> Arnaud Salvador,<sup>‡</sup> Olivier Geffard,<sup>†</sup> and Arnaud Chaumot<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Irstea, UR MALY, F-69336 Lyon, France

<sup>‡</sup>Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR 5280 Institut des Sciences Analytiques, F-69622 Villeurbanne, France

### Supporting Information

**ABSTRACT:** Cost-effective methodologies along with cross-species applicability constitute key points for biomarker development in ecotoxicology. With the advent of cheaper affordable genomic techniques and high throughput sequencing, omics tools could facilitate the assessment of effects of environmental contaminants for all taxa biodiversity. We assessed the potential of absolute quantification of proteins using mass spectrometry to develop vitellogenin(Vg)-like protein assays for invertebrates. We used available sequences in public databases to rapidly identify Vg-proteotypic peptides in seven species from different main taxa of protostome invertebrates (mollusk bivalves, crustacean amphipods, branchiopods, copepods and isopods, and insect diptera). Functional validation was performed by comparing proteomic signals from reproductive female tissue samples and negative controls (male or juvenile tissues). In a second part, we demonstrate in gammarids, daphnids, drosophilids, and gastropods that the assay validated in Vg-sequenced species can be applied to Vg-unsequenced species thanks to the evolutionary conservation of Vg-proteotypic peptide motifs. Finally, we discuss the relevance of mass spectrometry for biomarker development (specific measurement, rapid development, transferability across species). Our study supplies an illustration of the promising strategy to address the challenge of biodiversity in ecotoxicology, which consists in employing omics tools from comparative and evolutionary perspectives.



### 1. INTRODUCTION

As part of ecological risk assessment and environmental management, ecotoxicology is asked to provide data relating the effects of toxic substances within ecosystems. In this context, substantial efforts have been devoted in the last 25 years to developing and applying biomarkers.<sup>1</sup> Nevertheless, one of the main ongoing challenges is to supply information that will allow us to assess the toxic effects for all taxa of ecosystems biodiversity.<sup>2</sup> This is challenging because of the intertaxon heterogeneity in terms of their sensitivity to environmental contaminants,<sup>3</sup> which is partly explained by the molecular diversity of biological systems that emerged during evolution.<sup>4,5</sup> This variability makes mandatory the development of a multispecies approach in environmental biomonitoring with the use of sentinel species from distinct phylogenetic lineages. Time and cost-effective methodologies for biomarker development, as well as the cross-species applicability of biomarkers, are thus needed to address the challenge of biodiversity in ecotoxicology. This issue is highly challenging in invertebrates, for which the molecular divergence

between lineages is more significant than in vertebrates because of higher diversification rates and longer evolutionary times.<sup>6–8</sup>

Owing to the critical role of reproduction in population viability, biomarkers recording reproductive effects are widely used in environmental biomonitoring programs. In most oviparous organisms, vitellogenins (Vg) or other related proteins from the large lipid transfer protein superfamily (e.g., vitellogenin-like proteins) are the precursor of the major egg-yolk protein.<sup>9,10</sup> In fish, in which Vg production is controlled by the estrogen receptor pathway, the induction of Vg in males is a well-known effect of natural estrogens and xenoestrogenic contaminants and has become a useful biomarker for measuring specific exposure in field and laboratory experiments alike. The antibody-based “enzyme link immuno-sorbent assay” (ELISA) technique is currently the most widely used assay for Vg quantification in vertebrates, and

Received: February 10, 2012

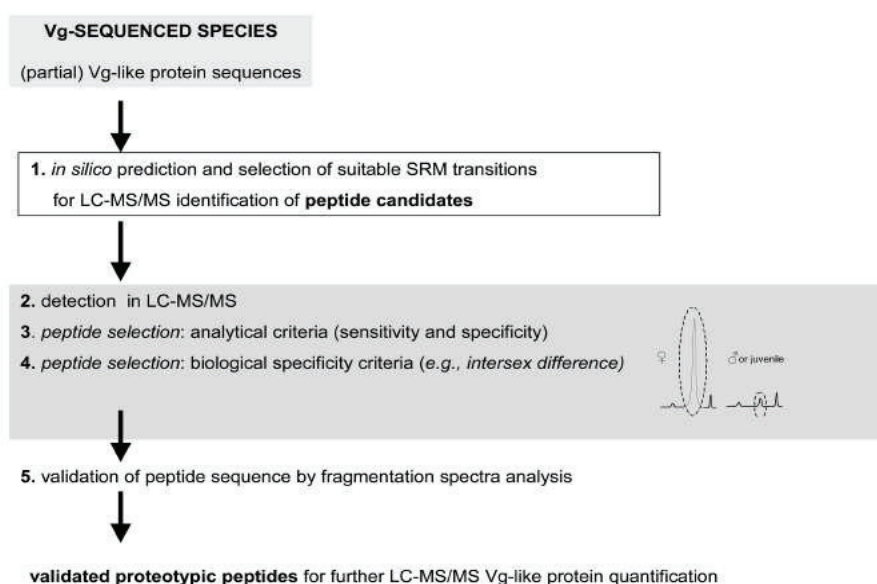
Revised: May 13, 2012

Accepted: May 13, 2012

Table 1. Identification of Vg-Proteotypic Peptides in Eight Protostome Invertebrate Species, for Which Vg-like Protein Sequences Were Available in Public Sequence Databases<sup>a</sup>

species	phylogenetic position	protein name	accession number	sequence length	tissue samples				number of validated Vg- proteotypic peptides (step 5)
					positive control (wet weight)	negative control (wet weight)	number of peptide candidates predicted <i>in silico</i> (step 1)	number of detected and selected peptides (steps 2,3,4)	
<i>Crassostrea gigas</i>	Mollusca Bivalvia	vlg	BAC22716	1583 aa	female gonad (483.2 mg)	male gonad (670.1 mg)	114	55	44
<i>Mytilus edulis</i>	Mollusca Bivalvia	vlg	AAI72932	237 aa	female gonad (390.1 mg)	male gonad (416.9 mg)	15	4	1
<i>Gammarus fossarum</i>	Arthropoda Crustacea Amphipoda	vlg	GU985184	197 aa	female whole-body (15.1 mg)	male whole-body (15.3 mg)	14	8	8
<i>Armadillidium vulgare</i>	Arthropoda Crustacea Isopoda	vlg	BAI803280	163 aa	female whole-body (183.0 mg)	male whole-body (253.5 mg)	15	8	8
<i>Daphnia magna</i>	Arthropoda Crustacea Branchiopoda	vlg1 vlg2	BAE94323 BAE94322	2001 aa 2002 aa	female whole-body (58.4 mg)	neonate whole-body (54.8 mg)	170	60	59
<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	Arthropoda Crustacea Copepoda	vlg1 vlg2	ABU41134 ABU41135	1965 aa 1903 aa	female whole-body (150.3 mg)	male whole-body (149.1 mg)	239	161	n.a.
<i>Tribolium castaneum</i>	Arthropoda Insecta Coleoptera	vlg1	XP_968334	231 aa	female whole-body (19.7 mg)	male whole-body (21.5 mg)	7	0	0
<i>Drosophila melanogaster</i>	Arthropoda Insecta Diptera	egg.yolk prot 1 egg.yolk prot 2 egg.yolk prot 5	NP_511103 NP_511102 NP_511148	439 aa 442 aa 420 aa	female whole-body (53.9 mg)	male whole-body (30.1 mg)	72	16	16

<sup>a</sup>The different steps of peptide identification are described in Figure 1. Numbers in bold correspond to Vg-proteotypic peptides considered for cross species application in gammarids, daphnids, and drosophilids (Figure 3). List of validated peptides are reported in Table S1.



**Figure 1.** The five steps followed for the identification of Vg-proteotypic peptides in species with known Vg-like protein sequences.

it constitutes a reliable, sensitive, and cost-effective method.<sup>11–13</sup> Useful laboratory and field applications of Vg biomarkers in fish have encouraged ecotoxicologists to study Vg-like proteins in invertebrates.

Applications of antibody-based techniques such as ELISA or Western blotting for Vg protein measurement are scarce in protostome invertebrates, and they are most often developed for model species of economic interest (e.g., decapods, bivalves). Such developments are indeed time-consuming and technically risky because, unlike vertebrates, most invertebrates are small in size, and model substances allowing a strong induction of Vg have not been identified for the majority of invertebrate taxonomic groups. This reflects the gap of knowledge on invertebrate endocrine systems, which are now recognized as being plastic and divergent among metazoan lineages.<sup>4,14,15</sup> The high level of evolutionary divergence between phylogenetic groups of invertebrates also explains the low interspecific cross reactivity of Vg antibodies. Absolute quantification of proteins using mass spectrometry with selected reaction monitoring (SRM) or multiple reaction monitoring (MRM) and stable isotope dilution, is an alternative to conventional immunoassays and indirect methods for Vg measurement.<sup>16,17</sup> This was successfully developed and validated for Vg quantification in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda).<sup>18</sup> Owing to the current increasing genomic area, this proteomic mass spectrometry method is promising for the rapid identification of peptides for Vg quantification in invertebrates, even in cases where only a partial Vg sequence is available. Moreover, comparative and evolutionary genomics revealed that partial conservation between homologous Vg-like proteins in different invertebrate lineages can persist.<sup>9,10,19</sup> Therefore, because mass spectrometry-based assays require small analyte peptides (from 5 to 20 amino acids), it might be possible to take advantage of this peptide motif conservation to build biomarkers valid for groups of phylogenetically related species, including species of ecotoxicological concern. Such an approach has already been used in the medical application of top-down proteomics for microorganism identification.<sup>20</sup>

We have previously demonstrated for one crustacean species the possibility to measure Vg levels by the quantification of Vg-proteotypic peptides.<sup>18</sup> Therefore, in order to assess the feasibility of mass spectrometry-based assays of Vg-like proteins in invertebrates, the present study first reports how we rapidly identified, thanks to Vg-like sequences available in public databases, Vg-proteotypic peptides in species from several different main taxa of protostome invertebrates: mollusks (bivalves), crustaceans (amphipod, branchiopod, copepod, and isopod), and insects (diptera). In the second part, we demonstrate how we can take advantage of the moderate phylogenetic conservation of Vg-like proteins to directly employ or adapt such Vg-proteotypic peptides identified in sequenced species, to unsequenced species that are more or less closely related phylogenetically. Finally, we discuss the relevance of mass spectrometry as a specific protein methodology for Vg measurement, which is useful for its rapid development and its transferability across invertebrate species.

## 2. MATERIAL AND METHODS

**2.1. Experimental Design. Identification of Vg-Proteotypic Peptides in Invertebrate Species with Known Vg-like Protein Sequences.** The first objective of the study was to validate whether we could easily and rapidly develop an LC-MS/MS assay of Vg-like proteins in any invertebrate for which a Vg-like gene has been sequenced, even partially, and is available in free-access databases (EMBL, GenBank). To address this issue, we selected eight marine, freshwater, and terrestrial species with available Vg-like protein sequences (see Table 1 for accession numbers). These species belong to different phylogenetic groups of invertebrate diversity that are of interest in ecotoxicology: two bivalves (*Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis*), one amphipod (*Gammarus fossarum*), one isopod (*Armadillidium vulgare*), one branchiopod (*Daphnia magna*), one copepod (*Lepeophtheirus salmonis*), and two insects (*Tribolium castaneum* and *Drosophila melanogaster*). For this last species, we used the annotated egg yolk proteins in the fruit fly genome, which are in fact not related to the metazoan Vg superfamily. Indeed, no Vg is identified in the

genome annotations of *D. melanogaster*, in agreement with the recruitment of lipase-like proteins as major yolk proteins in higher Diptera.<sup>9,21</sup> For convenience of writing, we include this protein in so-called Vg-like proteins throughout this paper.

The different steps we followed for the validation of Vg-proteotypic peptides are presented in Figure 1: (1) we predicted *in silico* trypsin Vg peptides from the known Vg-like protein sequence, and we selected *a priori* the most sensitive analytes for LC-MS/MS identification; (2) we sought five transitions for each one of these peptide candidates in the LC-MS/MS analyzer (see section below for technical details); (3) we picked out the peptides with strong analytical sensitivity and for which the detection of several transitions ensured the specificity of detection; (4) we selected the peptides that conformed to the biological specificity of Vg-like proteins, by comparing the profiles from positive vs negative control samples (e.g., intersex ratio); and finally (5) we confirmed the sequence of selected peptides by LC-MS/MS (fragmentation spectra). For the fourth point concerning biological specificity (i.e., validation of Vg peptide functionality), positive and negative controls were designed according to the body size and the mode of reproduction of each species (hermaphrodite, gonochorist, parthenogenetic). Positive vs negative controls therefore compared tissue samples from whole-body mature females vs males, female vs male gonads, or mature adults vs juveniles (see details in Table 1 and Table S1).

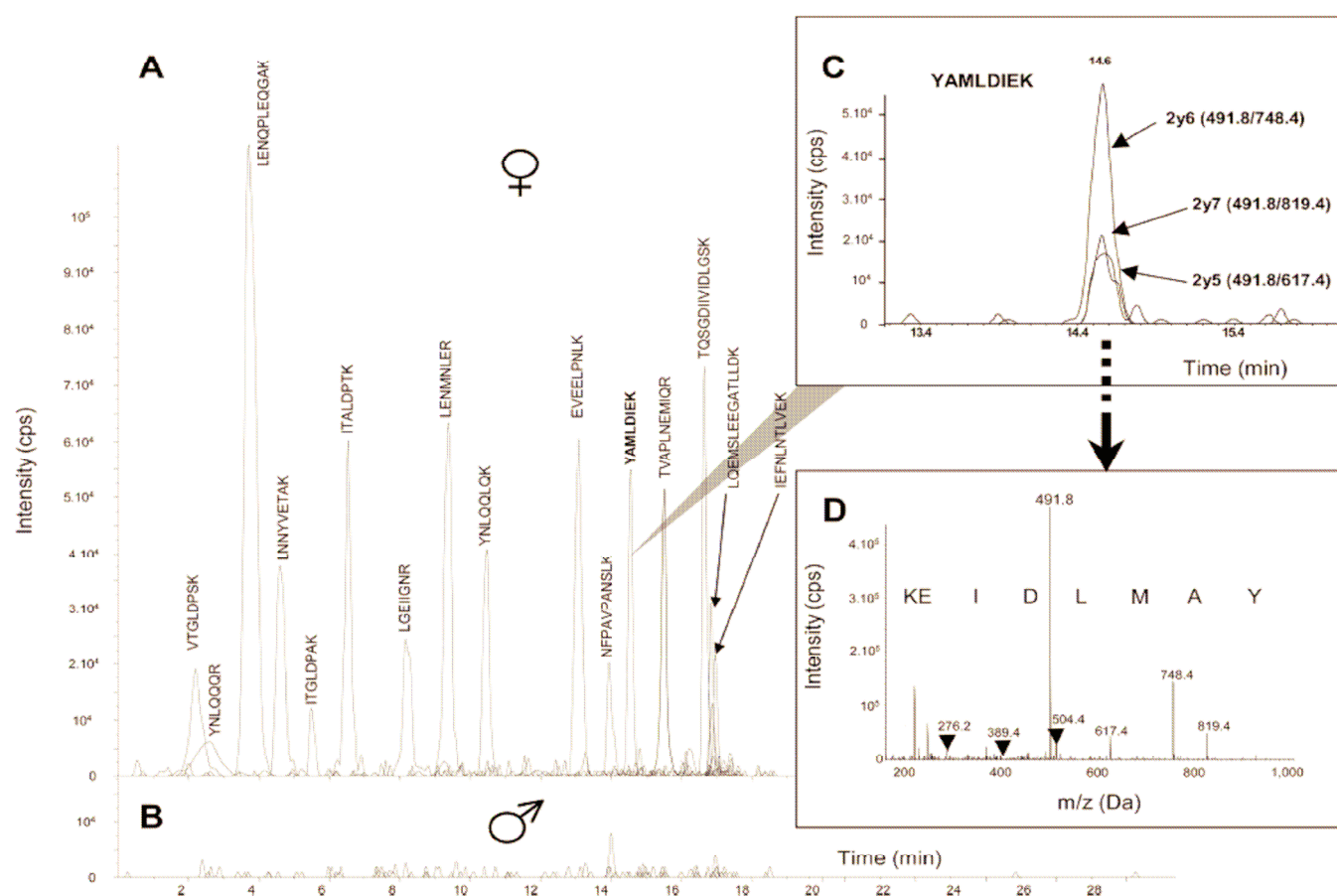
**Transferability of Vg-Proteotypic Peptides between Invertebrate Species.** We tested the transferability between species of the LC-MS/MS assay for the quantification of Vg-like proteins. For this, the proteotypic peptides validated in Vg-sequenced species during the first part of the study were sought in organisms from closely related species with no available Vg-like protein sequences. The peptides validated in *G. fossarum*, *D. magna*, and *D. melanogaster* were thus tested among gammarid, daphnid, and drosophilid species respectively (see Figure 3 for the list of species). The same selection criteria as for the reference sequenced species were applied for the validation of peptides in these new species (steps 2 to 5 in Figure 1). A modified strategy was followed in gastropods, for which one sequence was available from the Japanese *Haliotis discus*: Because we were not able to obtain tissue from this species and thus to validate Vg-proteotypic peptides in this Vg-sequenced species, we directly tested the peptide candidates defined using the *H. discus* sequence on tissue samples from the European *Haliotis tuberculata* and from the more phylogenetically distant *Biomphalaria glabrata*. Finally, in the case where multiple sequences were available for a phylogenetic group encompassing the Vg-unsequenced species of interest, we analyzed multispecies protein sequence alignment to identify evolutionary conserved and variable positions. This allowed us to define a degenerated consensus sequence of Vg protein in this group. Then, we designed for LC-MS/MS detection a list of possible peptide sequences, which should likely be present in the Vg-unsequenced species of interest. As a case study, this last strategy, which could increase the chances of detecting Vg-proteotypic peptides in Vg-unsequenced species, was applied to the *Drosophila* genus for which numerous genomic sequencing programs have been completed.

**2.2. Reagents, Chemicals, and Extraction Procedure.** Acetonitrile and water (LC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAM), formic acid (FA) (LC-MS grade), trypsin (type IX-S from porcine pancreas), urea, Tris, EDTA,

Triton X, sodium chloride, leupeptin, and aprotinin were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Absolute ethanol and ethylic ether were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France).

Whole-body organisms or gonads were homogenized in 1 mL of icecold Tris buffer (Tris 50 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0.01 mM) adjusted to pH 7.8 (set at 20 °C) plus 10 g each of leupeptin and aprotinin per liter of buffer, with an Ultra-Turrax T25 basic at 24,000 rpm for 35 s (Ika-werke GMBH & Co). Homogenates were centrifuged at 10,000 × g at 4 °C for 15 min. A 250- $\mu$ L sample of clear supernatant was collected and delipidated by adding 750  $\mu$ L of ethanol/diethylether solution (1/1, v/v). The mixture was vortexed and replaced on ice for 10 min. Afterward, samples were centrifuged at 10,000 × g at 4 °C for 10 min. Clear supernatant was removed, the bottom was remixed with 250  $\mu$ L Tris buffer, and 3 mL of ammonium bicarbonate 50 mM and DTT at a final concentration of 15 mM were added to the supernatant. Subsequently, samples were incubated for 40 min at 60 °C. After cooling to room temperature, IAM was added (final concentration of 15 mM), and the samples were placed in the dark at room temperature for 40 min. Trypsin (100 mg at 2  $\mu$ g $\mu$ L<sup>-1</sup>) was added, and samples were incubated for 4 h at 37 °C. Similarly, a second cycle of ammonium bicarbonate, DTT, IAM, and trypsin additions was carried out, and samples were then incubated for 20 h at 37 °C. Finally, 10  $\mu$ L of formic acid was added to stop the trypsin reaction. After protein digestion, 3 mL of each digested sample was purified and concentrated by solid phase extraction (SPE) with an HLB column (10 mg; Waters, Milford, MA, USA). One mL of eluted samples was evaporated in a SpeedVac concentrator (Thermo scientific, Savant) to obtain a volume of 20  $\mu$ L. Ten  $\mu$ L of acetonitrile and 270  $\mu$ L of water were added to a final volume of 300  $\mu$ L. The tubes were then vortexed for several seconds, and the contents were transferred to glass autosampler vials.

**2.3. Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Analysis.** LC-MS/MS analysis was performed with a system comprising an HP1290 series HPLC device (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) coupled to a QTRAP 5500 LC-MS/MS System hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo V ion source. Instrument control, data acquisition, and processing were performed using the Analyst 1.5.1 software. The LC separation of 10  $\mu$ L injected samples was carried out on a Symmetry C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm; particle size, 3.5  $\mu$ m) from Waters. Elution was performed at a flow rate of 300  $\mu$ L $\cdot$ min<sup>-1</sup> with water containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent A and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent B, employing a linear gradient from 5% B to 10% B in 10 min, followed by a 5 min linear gradient 10–20% B, and then a 2 min linear gradient from 20% to 95% B. Column re-equilibration was then performed for 6 min. The injection duty cycle was 26 min, taking into account the column equilibration time. The mass spectrometer was initially tuned and calibrated using polypropylene glycol, Reserpine, and Agilent Tuning Mix (all from AB Sciex) according to the manufacturer's instructions. Q1 resolution was adjusted to 0.7 ± 0.1 amu fwhm, referred to as unit resolution. Q3 was also set to unit resolution in SRM mode. MS analysis was carried out in positive ionization mode using an ion spray voltage of 5500 V. The nebulizer and the curtain gas flows were set at 30 psi using nitrogen. The Turbo V ion source was set at 450 °C with the auxiliary gas flow (nitrogen) set at 40 psi.



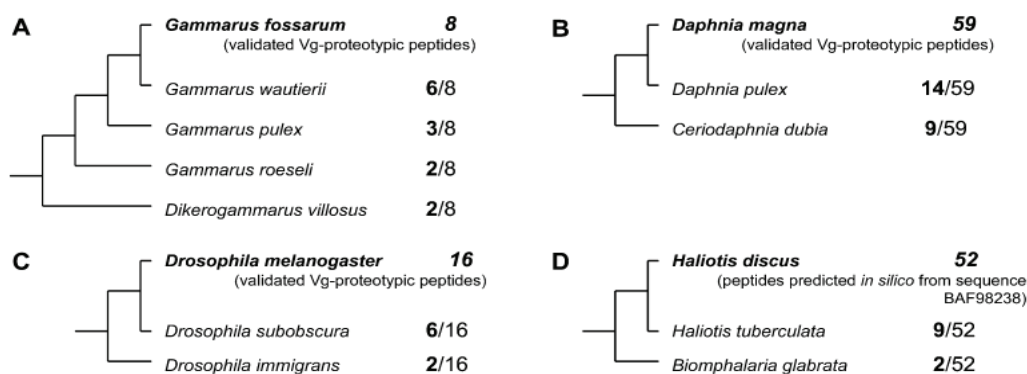
**Figure 2.** Illustration of the validation of Vg-proteotypic peptides in *Drosophila melanogaster*. Reconstructed chromatograms (TIC) in female (A) and male (B) showing the sum of the 16 validated peptides (only the most intense transition of each peptide is represented); (C) extracted ion chromatogram of the three most intense transitions monitored for YAMLDIEK peptide; (D) MS/MS fragmentation spectra for sequence validation.

According to step 1 in Figure 1, proteins were digested *in silico* with trypsin (no miss cleavage allowed and cysteines were carbamylated). An MRM-Initiated Detection and Sequencing (MIDAS Workflow) experiment was used to scout for suitable SRM transitions. Q1 and Q3 masses as well as collision energy values were predicted from the Vg primary sequences using MRMPilot 1.0 software (AB Sciex). Thus five transitions were chosen following step 1 in order to monitor each peptide candidate in step 2 (Figure 1). For all peptides, declustering potential, entrance potential and collision cell exit potential were set to 70 V, 10 V, and 15 V, respectively. A dwell time of 10 ms was used for each SRM transition, to obtain 20 or more data points per chromatographic peak. To ensure the analytical specificity of the detected peptide (step 3), we only selected peptides for which at least three transitions were unambiguously identified at a common retention time ( $\pm 0.1$  min). Furthermore, only peptides presenting a significant difference between positive and negative tissue samples were retained (step 4 in Figure 1): for this, a minimum threshold of ten was fixed for the ratio between the areas of chromatographic peaks detected in positive and negative samples (with the conservative rule to quantify any significant peak in the negative sample detected in  $\pm 1$  min around the retention time corresponding to the selected peak in the positive sample). Finally, a data acquisition experiment was designed for samples of positive tissues (step 5 in Figure 1), in which a product ion

scan is performed if a SRM transition is higher than 3000 counts per second. The MS/MS spectra allowed us to confirm the peptide sequence either automatically with Mascot or manually using Gpmaw software.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

**3.1. Identification of Vg-Proteotypic Peptides in Invertebrate Species with Known Vg-like Protein Sequences.** We successfully validated Vg-proteotypic peptides in seven of the eight selected species (Table 1, Figure 2, Table S2). We will later discuss the fact that we did not validate peptides for vtg1 in *T. castaneum*. If we exclude the mussel *M. edulis* (for which only a short sequence was available), the validated Vg-proteotypic peptides account for 20% to 60% of peptide candidates designed *a priori* from available sequences. After applying the rules, we defined for peptide detection and selection (Figure 1), we observed high rates of peptide sequence confirmation (step 5): 80% in *C. gigas*, 98% in *D. magna*, and 100% in *G. fossarum*, *A. vulgare*, and *D. melanogaster*. In most cases, unconfirmed peptides in step 5 were not true false-positives (i.e., unrelated sequence with *in silico* predictions), but they were explained by an insufficient quality of fragmentation spectra to allow for an unambiguous identification of the peptide sequence. These high rates of sequence validation in step 5 underline the high specificity of the MRM detection of the five transitions per peptide candidate



**Figure 3.** Transferability of Vg-proteotypic peptides from Vg-sequenced to Vg-unsequenced species. Panels A, B, and C report the results of successful identification in gammarids, daphnids, and drosophilids of Vg-proteotypic peptides, which were first validated in a reference Vg-sequenced species indicated in bold. Panel D reports the results in gastropods without a first validation in the Vg-sequenced species *Haliotis discus*. Peptides are reported in Table S2.

(step 2) combined with application of the conservative rules we followed for peptide selection: By considering only peptides (i) with at least three detected transitions among the five sought and (ii) with a positive/negative sample ratio of chromatographic peak areas over 10, we ensured good specificity for the identification of Vg-proteotypic peptides.

A significant proportion of nonvalidated candidate peptides can be explained first by the fact that the transitions monitored for each candidate were not detected in step 2. This can be explained by sampling factors such as insufficient tissue extraction or by analytical factors such as a weak sensitivity of the ions produced, a poor ionization yield, or by the existence of post-translational modifications. These analytical factors are probably not the only ones involved. For example, in the case of the mussel *M. edulis*, only one peptide was validated out of 15 candidates. Yet, some of these 14 peptides not detected in mussels present an identical sequence and were validated as Vg-proteotypic peptides in the oyster *C. gigas*. In fact, a strong similarity is observed between the available *M. edulis* and *C. gigas* sequences (only three positions different for 237 aa). This is surprising since a divergence of about 50% is documented between *C. gigas* and Pectinidae Vg sequences,<sup>22</sup> while Pectinidae and *Mytilus* are approximately equally divergent from oysters in molecular phylogenies of bivalves.<sup>23,24</sup> In addition, the experimental studies using the *M. edulis* sequence did not report intersex difference in expression levels.<sup>22,25</sup> Therefore, in order to explain our nondetection in mussels, we could thus hypothesize that the sequence available in public databases does not correspond to a mussel-specific Vg-like protein.

Another part of the nonvalidated peptides was detected and selected in steps 2 and 3, but they showed noncontrasted profiles between positive and negative samples (e.g., female vs male gonads). This may involve only some of the peptides identified for the protein of a given species. Beyond the difficulty of reading the chromatographic spectra for some peptides, it can also be assumed here that some of the functional motifs carried by the Vg sequence might be present in other proteins not related to the reproductive function. On the contrary, in the case of the beetle *T. castaneum*, all the candidate peptides identified from the annotated genome sequence *vtg1* were detected, and they were invalidated by the lack of contrast between levels in males and females. In this case, we can hypothesize that the protein *vtg1* does not play the

role of egg-yolk protein in *Tribolium* and that automatic functional annotation by sequence orthology could be abusive. Many other functions not related to reproduction have indeed been described for Vg-like proteins in insects<sup>26,27</sup> and other metazoans.<sup>28–35</sup> The function of storage protein in the egg may even be provided by other proteins of the large lipid transfer protein superfamily or by proteins unrelated phylogenetically to Vg.<sup>9,21</sup> The nonconservation of function between orthologous proteins in distinct lineages is now clearly demonstrated in different protein families,<sup>36</sup> and the case of Vg in decapod crustaceans also offers an example of this phenomenon. In decapods, the protein ortholog of Vg in most metazoans plays a role in clotting, while egg-yolk protein is produced by a Vg paralog gene belonging to the subfamily of apolipoproteins.<sup>37</sup> To address the problem of erroneous functional annotation performed by sequence similarity (potentially leading to the “street light syndrome” reported by Markov et al.),<sup>38</sup> we showed here the relevance of functional controls in the development of biomarkers based on high throughput technologies, as highlighted in a recent review on applications of genomics in aquatic toxicology.<sup>39</sup>

The results of the first part of the study demonstrate the facility and the rapidity of using peptide identification from Vg protein sequences in order to develop Vg measurement by LC-MS/MS in invertebrates: in only six weeks Vg-proteotypic peptides were identified in seven invertebrate species for further assay development, whereas immunoagglutination development would have been more time-consuming.<sup>40</sup> As a case study of the complete development of the assay, once Vg-proteotypic peptides are identified, we have developed and applied Vg quantification using a synthetic labeled peptide in *Gammarus fossarum* (males and females) in studies dedicated to ecotoxicological purposes.<sup>18,41</sup> In these studies, we demonstrated, that because of its high sensitivity in the quantification of protein vitellogenin levels, the LC-MS/MS methodology could be useful not only for monitoring endocrine disruption in males as a qualitative response (Vg induction) but also by assessing the alteration of reproduction status indicator in females.

Owing to the currently increasing sequence resources provided by next-generation DNA sequencing technologies, the mass spectrometry-based assay of Vg-like proteins should thus facilitate the development of Vg biomarkers in multiple nonmodel invertebrate species. Going further than the well-

known issue of the validity of sequences deposited in public databases (see *Mytilus* example), we have underlined here the importance of considering functional controls in the development of the MS assay in order to propose a relevant biomarker for reporting reproductive alterations. Indeed, as disclosed by previous comparative genomic studies, functional shifts occurred throughout the evolutionary history of Vg-like proteins in invertebrates (e.g., gain, loss and sharing of egg-yolk protein or nonreproductive functions within the large lipid transfer protein superfamily), and the reproductive role of the annotated Vg-like protein in public databases should be verified in each species. For more mechanistic studies, another interesting aspect of the LC-MS/MS tool is it allows protein quantification with easy discrimination between the products of different Vg duplicated genes or between isoforms produced by alternative splicing of a unique gene. For example, among the 59 Vg-proteotypic peptides validated in *D. magna*, 14 and six peptides were specific of the paralog genes *vtg1* and *vtg2*, respectively. Hence, the reported proteomic approach could also provide insight into a more mechanistic understanding of Vg-like protein functions throughout invertebrate biodiversity.

**3.2. Transferability of Vg-Proteotypic Peptides from Vg-Sequenced to Unsequenced Species.** The Vg-proteotypic peptides validated in *G. fossarum*, *D. magna*, and *D. melanogaster* were sought in phylogenetically close species: four species of gammarids for *Gammarus*, two species of daphnids for *Daphnia*, and two species of drosophilids for *Drosophila*. Figure 3 shows the number of Vg-proteotypic peptides successfully revalidated in these new species. We observed that the transfer between species is possible and that the number of common practicable Vg-proteotypic peptides clearly decreases with the phylogenetic distance between species. This pattern is totally congruent with the supposed conservation of protein sequence and thus of Vg-proteotypic peptides among each taxonomic group. Interestingly, some Vg peptide motifs are conserved in all species of each group (Table S2): ALQAGGNK in gammarids, YAMLDIEK and ITGLDPAK in drosophilids, and six peptides in daphnids. For the majority of peptides, their distribution conforms with species phylogeny, and some exceptions exist: three *D. magna* peptides are revalidated in *C. dubia* but not in *D. pulex*, or in gammarids, IEILK is present in the most distant species *D. villosus* while it was not validated in *G. pulex* and *G. roeseli*. Of note, for daphnids, we observed that conserved peptides are located in the two known evolutionary conserved regions of Vg sequence,<sup>9,10,19</sup> the N-terminal area (positions 30 to 1075) and the vWF area (positions 1724 to 1876). These results underline the transferability potential of LC-MS/MS assays and, thus, the possibility to develop a unique Vg quantification method for a group of related species. Moreover, unlike cross-reactive antibodies, such evolutionary conserved peptides could allow a quantitative assay to be developed with no loss of sensitivity between species. Of note, the maximal length of the peptides revalidated in the Vg-unsequenced species correlates with phylogenetic distance: numerous validated peptides possess about eight residues, but longer sequences are observed mainly in the less distant species (*G. wautierii*, *D. subobscura*, and *D. pulex*). This underlines that a compromise in the length of designed peptides has to be found between Vg specificity and cross-species transferability allowed by evolutionary conservation of Vg sequence.

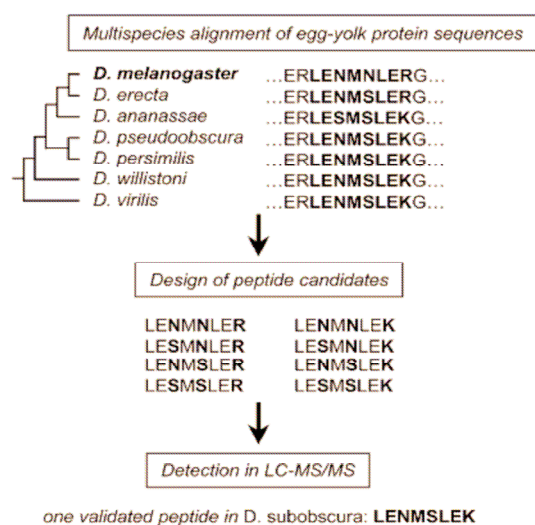
Concerning gastropods, because we were not able to obtain tissue samples from the Vg-sequenced *H. discus* (Japanese

species), we directly tested in *H. tuberculata* (European species) and *B. glabrata*, the Vg-proteotypic peptides, which we predicted *in silico* in the N-term and C-term regions of the Vg sequence of *H. discus*. We validated nine and two conserved peptides in *H. tuberculata* and *B. glabrata* respectively, here again in accordance with the phylogeny of species (Figure 3D). Thus, unlike drosophilids, gammarids, and daphnids, the *H. discus* Vg sequence allowed us to identify Vg-proteotypic peptides directly in two other gastropods. This result represents a great biological challenge because little information is available in the divergent taxon of gastropods. The identification of Vg peptides in *B. glabrata* highlights the transferability potential of this method even between phylogenetically distant species, thanks to evolutionary conserved areas in the protein of interest.

The loss of Vg-proteotypic peptides with increasing phylogenetic distance from the reference Vg-sequenced species may limit the transfer potential of the assay. As an illustration, we have shown in *G. fossarum*<sup>18</sup> that having several Vg-proteotypic peptides is helpful for developing a method for the precise quantification of protein levels. Indeed all identified peptides appeared not relevant for quantification because sensitivity and specificity (notably for short sequences) varies between peptides. Thus, we wanted to test the ability to identify peptides lost during the transfer between sequenced and unsequenced species due to possible mutations in Vg sequence during the evolutionary history of species. Different substitutions may affect positions in the sequence of Vg-proteotypic peptides. We can thus define *in silico* degenerated sequences for peptide candidates sought in the LC-MS/MS analyzer. To limit the number of possible combinations, we analyzed the patterns of evolutionary conservation of sequences and identified the most likely substitutions in regions where conservation is relatively good. We developed this strategy in *Drosophila*, a genus for which egg-yolk protein sequences are available in different species (seven species studied here). We considered as a case study the peptide LENMNLER, which was validated in *D. melanogaster* but undetected in *D. subobscura* (Figure 4). Given the sequence alignment between species, only three residues have emerged as unfixed in the group but with only two amino acid possibilities for each one of the polymorphic positions. We have thus defined eight very likely combinations as candidate peptides, and we were able to effectively detect and validate one of them (LENMSLEK) in *D. subobscura*.

To conclude, we have demonstrated that the assay validated in a Vg-sequenced species can be applied to phylogenetically related species thanks to the evolutionary conservation of Vg-proteotypic peptide motifs. Furthermore, because the mass spectrometry-based assay only required small peptides (from 5 to 20 amino acids), evolutionary functional constraints acting on specific clusters of amino acids in Vg sequence could facilitate the development of assays applicable in groups of phylogenetically related species. Since it is only based on the primary protein sequence, this cross-species transfer would be operational without loss of sensitivity. This easy transfer without new methodological developments for each given species could help overcome an important barrier in the application of ecotoxicological biomarkers for environmental monitoring. Because of the development of new sequencing technologies that allow sequence data sets to be potentially obtained in any species of interest, it may appear irrelevant to work on the transfer of the assay between species. However, in





**Figure 4.** From the validated peptide LENMNLER in *Drosophila melanogaster* to the identification of the peptide LENMSLEK in *D. subobscura* using the evolutionary conservation of egg-yolk protein sequences within drosophilids.

the context of biomarker application for environmental quality monitoring with sentinel species, the development of quantification methods based on the identification of common Vg-proteotypic peptides shared within a more or less narrow phylogenetic group of species is interesting for overcoming the issues of polymorphism within populations and variability between populations and between species, especially in invertebrates, where the definition and the identification of species can be complicated by such phenomena as hybridization or cryptism.<sup>42–44</sup> Proteomic mass spectrometry could offer applicable biomarkers for environmental quality monitoring without the need for new developments for each local population used as sentinel species during each specific case study in a particular region or habitat. Our study thus emphasizes that coupling proteomic tools with knowledge from the field of molecular evolution is a promising strategy to address the challenge of biodiversity in invertebrate ecotoxicology.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

Details for the establishment of positive/negative samples according to the biology of tested species (Table S1) and list of validated peptides (Table S2). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: 33 4 72208788. Fax: 33 4 78477875. E-mail: arnaud.chaumot@irstea.fr. Corresponding author address: Irstea, UR M<sup>2</sup>ALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by the French national research program PNRPE (Convention n° CV05000088 and Convention n° 0006942). We thank R. Allemand for kindly providing

samples of *Drosophila melanogaster*, *D. subobscura*, and *D. immigrans*, F. Bonneton for *Tribolium castaneum*, K. Glover and R. Skern for *Lepeophtheirus salmonis*, B. Gourbal for *Biomphalaria glabrata*, S. Huchette for *Haliotis tuberculata*, C. Souty for *Armadillidium vulgare*, and B. Xuereb for *Mytilus edulis*. We are grateful to H. Quéau for technical assistance, and we thank M. Coquery and P. Bados for experimental facilities at Irstea, Laboratoire d'analyses physicochimiques des milieux aquatiques.

## ■ REFERENCES

- (1) Forbes, V. E.; Palmqvist, A.; Bach, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* **2006**, *25* (1), 272–280.
- (2) Celander, M. C.; Goldstone, J. V.; Denslow, N. D.; Iguchi, T.; Kille, P.; Meyerhoff, R. D.; Smith, B. A.; Hutchinson, T. H.; Wheeler, J. R. Species extrapolation for the 21st century. *Environ. Toxicol. Chem.* **2011**, *30* (1), 52–63.
- (3) Von Der Ohe, P. C.; Liess, M. Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23* (1), 150–156.
- (4) Thomson, J. W. Nonmammalian nuclear receptors: Evolution and endocrine disruption. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75* (11–12), 1827–1839.
- (5) Hahn, M. E. Mechanistic research in aquatic toxicology: Perspectives and future directions. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *105* (3–4, Supplement), 67–71.
- (6) Douzery, E. J. P.; Snell, E. A.; Baptiste, E.; Delsuc, F.; Philippe, H. The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (43), 15386–15391.
- (7) Dunn, C. W.; Hejnal, A.; Matus, D. Q.; Pang, K.; Browne, W. E.; Smith, S. A.; Seaver, E.; Rouse, G. W.; Obst, M.; Edgecombe, G. D.; Sorensen, M. V.; Haddock, S. H. D.; Schmidt-Rhaesa, A.; Okusu, A.; Kristensen, R. M.; Wheeler, W. C.; Martindale, M. Q.; Giribet, G. Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life. *Nature* **2008**, *452* (7188), 745–749.
- (8) Peterson, K. J.; Lyons, J. B.; Nowak, K. S.; Takacs, C. M.; Wargo, M. J.; McPeck, M. A. Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101* (17), 6536–6541.
- (9) Smolenaars, M. M. W.; Madsen, O.; Rodenburg, K. W.; Van Der Horst, D. J. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *J. Lipid Res.* **2007**, *48* (3), 489–502.
- (10) Hayward, A.; Takahashi, T.; Bendena, W. G.; Tobe, S. S.; Hui, J. H. L. Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans. *FEBS Lett.* **2010**, *584* (6), 1273–1278.
- (11) Denslow, N. D.; Chow, M. C.; Kroll, K. J.; Green, L. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology* **1999**, *8* (5), 385–398.
- (12) Nilsen, B. M.; Berg, K.; Arukwe, A.; Goksøyr, A. Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* **1998**, *46* (1–5), 153–157.
- (13) Nilsen, B. M.; Berg, K.; Eidem, J. K.; Kristiansen, S. I.; Brion, F.; Porcher, J. M.; Goksøyr, A. Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378* (3), 621–633.
- (14) Oetken, M.; Bachmann, J.; Schulte-Oehlmann, U.; Oehlmann, J. Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *236*, 1–44.
- (15) Markov, G. V.; Tavares, R.; Dauphin-Villemant, C.; Demeneix, B. A.; Baker, M. E.; Laudet, V. Independent elaboration of steroid hormone signaling pathways in metazoans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106* (29), 11913–11918.
- (16) Cohen, A. M.; Mansour, A. A. H.; Banoub, J. H. Absolute quantification of Atlantic salmon and rainbow trout vitellogenin by the

'signature peptide' approach using electrospray ionization QqToF tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2006**, *41* (5), 646–658.

(17) Zhang, F.; Bartels, M. J.; Brodeur, J. C.; Woodburn, K. B. Quantitative measurement of fathead minnow vitellogenin by liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry using a signature peptide of vitellogenin. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23* (6), 1408–1415.

(18) Simon, R.; Jubeaux, G.; Chaumot, A.; Lemoine, J.; Geffard, O.; Salvador, A. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217* (31), 5109–5115.

(19) Chen, J. S.; Sappington, T. W.; Raikhel, A. S. Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry. *J. Mol. Evol.* **1997**, *44* (4), 440–451.

(20) Wynne, C.; Edwards, N. J.; Fenselau, C. Phyloproteomic classification of unsequenced organisms by top-down identification of bacterial proteins using capLC-MS/MS on an Orbitrap. *Proteomics* **2010**, *10* (20), 3631–3643.

(21) Sappington, T. W. The major yolk proteins of higher diptera are homologs of a class of minor yolk proteins in lepidoptera. *J. Mol. Evol.* **2002**, *55* (4), 470–475.

(22) Puinean, A. M.; Rotchell, J. M. Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* **2006**, *62* (Supplement 1(0)), S211–S214.

(23) Adamkewicz, S. L.; Harasewych, M. G.; Blake, J.; Saudek, D.; Bult, C. J. A molecular phylogeny of the bivalve mollusks. *Mol. Biol. Evol.* **1997**, *14* (6), 619–629.

(24) Kocot, K. M.; Cannon, J. T.; Todt, C.; Citarella, M. R.; Kohn, A. B.; Meyer, A.; Santos, S. R.; Schander, C.; Moroz, L. L.; Lieb, B.; Halanych, K. M. Phylogenomics reveals deep molluscan relationships. *Nature* **2011**, *477* (7365), 452–456.

(25) Ciocan, C. M.; Cubero-Leon, E.; Puinean, A. M.; Hill, E. M.; Minier, C.; Osada, M.; Fenlon, K.; Rotchell, J. M. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environ. Pollut.* **2010**, *158* (9), 2977–2984.

(26) Amdam, G. V.; Norberg, K.; Hagen, A.; Omholt, S. W. Social exploitation of vitellogenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100* (4), 1799–1802.

(27) Seehuus, S. C.; Norberg, K.; Gimsa, U.; Krekling, T.; Amdam, G. V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (4), 962–967.

(28) Chen, S.; Chen, D. F.; Yang, F.; Nagasawa, H.; Yang, W. J. Characterization and processing of superoxide dismutase-fused vitellogenin in the diapause embryo formation: A special developmental pathway in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Biol. Reprod.* **2011**, *85* (1), 31–41.

(29) Kato, Y.; Tokishita, S. I.; Ohta, T.; Yamagata, H. A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Gene* **2004**, *334* (1–2), 157–165.

(30) Li, Z.; Zhang, S.; Liu, Q. Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity. *PLoS One* **2008**, *3*, 4.

(31) Liu, M.; Pan, J.; Ji, H.; Zhao, B.; Zhang, S. Vitellogenin mediates phagocytosis through interaction with FcγR. *Mol. Immunol.* **2011**, *49* (1–2), 211–218.

(32) Liu, Q. H.; Zhang, S. C.; Li, Z. J.; Gao, C. R. Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*). *Immunobiology* **2009**, *214* (4), 257–267.

(33) Nakamura, A.; Yasuda, K.; Adachi, H.; Sakurai, Y.; Ishii, N.; Goto, S. Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, *264* (2), 580–583.

(34) Tong, Z.; Li, L.; Pawar, R.; Zhang, S. Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities. *Immunobiology* **2010**, *215* (11), 898–902.

(35) Zhang, S.; Sun, Y.; Pang, Q.; Shi, X. Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin. *Fish Shellfish Immunol.* **2005**, *19* (1), 93–95.

(36) Studer, R. A.; Robinson-Rechavi, M. How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ? *Trends Genet.* **2009**, *25* (5), 210–216.

(37) Avare, J. C.; Lubzens, E.; Babin, P. J. Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*.

(38) Markov, G.; Lecointre, G.; Demeneix, B.; Laudet, V. The "street light syndrome", or how protein taxonomy can bias experimental manipulations. *BioEssays* **2008**, *30* (4), 349–357.

(39) Nikinmaa, M.; Rytönen, K. T. Functional genomics in aquatic toxicology—Do not forget the function. *Aquat. Toxicol.* **2011**, *105* (3–4, Supplement), 16–24.

(40) Pan, S.; Aebersold, R.; Chen, R.; Rush, J.; Goodlett, D. R.; McIntosh, M. W.; Zhang, J.; Brentnall, T. A. Mass spectrometry based targeted protein quantification: Methods and applications. *J. Proteome Res.* **2009**, *8* (2), 787–797.

(41) Jubeaux, G.; Simon, R.; Salvador, A.; Quéau, H.; Chaumot, A.; Geffard, O. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquat. Toxicol.* **2012**, *112–113* (1), 72–82.

(42) Hilbish, T. J.; Carson, E. W.; Plante, J. R.; Weaver, L. A.; Gilg, M. R. Distribution of *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, and their hybrids in open-coast populations of mussels in southwestern England. *Mar. Biol.* **2002**, *140* (1), 137–142.

(43) Bickford, D.; Lohman, D. J.; Sodhi, N. S.; Ng, P. K. L.; Meier, R.; Winker, K.; Ingram, K. K.; Das, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends Ecol. Evol.* **2007**, *22* (3), 148–155.

(44) Westram, A. M.; Jokela, J.; Baumgartner, C.; Keller, I. Spatial Distribution of Cryptic Species Diversity in European Freshwater Amphipods (*Gammarus fossarum*) as Revealed by Pyrosequencing. *PLoS One* **2011**, *6* (8), art. no. e23879.

**Supporting information coversheet**

Guillaume Jubeaux, Fabien Audouard-Combe, Romain Simon, Renaud Tutundjian, Arnaud Salvador, Olivier Geffard, Arnaud Chaumot;

Vitellogenin-like proteins among invertebrate species diversity: potential of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development;

3 pages; 2 tables.

**TABLE S1**

Details for the establishment of positive / negative samples according to the biology of tested species.

Group	Species (Vg-sequenced in bold)	Mode of reproduction	Specimen for negative vs positive controls	Determination criteria between genders or life stages
bivalves	<i>C. gigas</i>	gonochorist	mature males/ females	binocular observation of gametes
	<i>M. edulis</i>	gonochorist	mature males/ females	binocular observation of gametes
gastropods	<i>H. tuberculata</i>	gonochorist	mature males/ females	sexual dimorphism (color of gonads), binocular observation of gametes
	<i>B. glabrata</i>	hermaphrodite	juveniles /mature adults	size
crustaceans	<i>G. fossarum</i>	gonochorist	mature males/ females	precopula separation, visible ovaries and embryos in marsupium
	<i>G. wautierii</i>	gonochorist	mature males/ females	precopula separation, visible ovaries and embryos in marsupium
	<i>G. pulex</i>	gonochorist	mature males/ females	precopula separation, visible ovaries and embryos in marsupium
	<i>G. roeseli</i>	gonochorist	mature males/ females	precopula separation, visible ovaries and embryos in marsupium
	<i>D. villosus</i>	gonochorist	mature males/ females	precopula separation and embryos in marsupium
	<i>A. vulgare</i>	gonochorist	mature males/ females	sexual dimorphism (observation of gonopods)
	<i>L. salmonis</i>	gonochorist	mature males/ females	sexual dimorphism (size)
	<i>D. magna</i>	parthenogenetic	neonates / mature females	size, presence of eggs in marsupium
	<i>D. pulex</i>	parthenogenetic	neonates/ mature females	size, presence of eggs in marsupium
	<i>C. dubia</i>	parthenogenetic	neonates/ mature females	size, presence of eggs in marsupium
insects	<i>T. castaneum</i>	gonochorist	mature males/ females	sexual dimorphism (bristles on the inside of the first pair of legs)
	<i>D. melanogaster</i>	gonochorist	mature males/ females	sexual dimorphism
	<i>D. subobscura</i>	gonochorist	mature males/ females	sexual dimorphism
	<i>D. immigrans</i>	gonochorist	mature males/ females	sexual dimorphism

## TABLE S2

List of validated peptides in the different species of the study (except *L. salmonis* for which sequence confirmation by MS/MS fragmentation has not been performed).

## Lophotrochozoan

species	peptide (most intense transition)
<i>C. gigas</i>	DFEMDVPYYPMIGK.2y8
	DIHHEADDPEWSVNVK.3b8
	DLLEHLK.2y5
	DSSSILQQSSDSLSTDK.2y9
	EDPSEITK.2y6
	EEQWR.2y3
	ELEDLK.2y4
	ELQMLMR.2y4
	EQSEPLR.2y5
	ETQEISVAK.2y6
	GEMEMDAEYFK.2y7
	HYPDDIQTTLLPLYFDQSEK.3y7
	ILSFK.2y3
	LADPSELLSDAYQR.2y7
	LDFAVR.2y4
	LHGTAAIK.2y6
	LLDLTR.2y4
	LLSGVSEODLK.2y9
	LSGQAVVR.2y6
	LVGPLGELTK.2y6
	MGAAAELGLVTTPEEFIPR.3y7
	MGVALK.2y5
	NIIDLIR.2y5
	NNSM[Oxi]GLIFNVIGIDQSR.3y6
	NYQHC[CAM]LDRPK.2y7
	QC[CAM]AEC[CAM]VR.2y4
	QEMIVTLSPGTDPOK.2y9
	QLLEMVAQSLHR.2y7
	QTLGLEIK.2y5
	SAESSQPSDPISQIHK.3y6
	SLVDVK.2y5
	STVFDDK.2y4
	SYDSLRL.2y4
	TADSESLR.2y6
	TGLNVEVHR.2y6
	TIGNAGLWEMIPTIR.2y7
	TLISQESR.2y6
	TMAHMETPLSLTASANLPK.3y6
	TSLSEPQSPTK.2y8
	TTSILLR.2y5
	WESSVLQR.2y6
	WIMLEEPR.2y6
	YC[CAM]ALLQQLIDQR.2y7
YPLPR.2y4	
<i>M. edulis</i>	LTFAK.2y3
<i>B. glabrata</i>	AFFK.2y2
	IATMSMAPR.2y8
<i>H. tuberculata</i>	ASPLFK.2y3
	KPGLIHVM[Oxi]NEAR.3y7
	QAATTSIQPK.2y8
	SIDIVR.2y3
	TC[CAM]GLC[CAM]SNM[Oxi]DCQQR.2y8
	TIIM[Oxi]K.2y3
	TIIMK.2y3
TLALTEGAQVR.2y9	
TVSYGEPAAAK.2y10	

Ecdysozoan

species	peptide (most intense transition)	species	peptide (most intense transition)
<i>D. melanogaster</i>	EVEELPNLK.2y7 IEFNLTLEK.2y8 ITALOPTK.2y6 ITGLDPAK.2y6 LENNLER.2y7 LENOPLGQAK.2y7 LGEIIGNR.2y7 LNNYVETAK.2y7 LOEMSLEEGATLLDK.2y9 NFFAVPANSK.2y8 TOSGDIIIDLGSK.2y8 TVAPLNEMIQK.2y7 VTGLDPSK.2y6 YAMLDIEK.2y8 YNLQQLQK.2y6 YNLQQQR.2y5	<i>D. subobscura</i>	ITGLDPAK.2y6 LGEIIGNR.2y7 LOEMSLEEGATLLDK.2y6 VTGLDPSK.2y6 YAMLDIEK.2y8 YNLQQQR.2y4
		<i>D. immigrans</i>	ITGLDPAK.2y6 YAMLDIEK.2y6
<i>D. magna</i>	paralog gene 1-2 AEETEVR.2y4 1 AESEDEWEALC[CAM]NLVR.3y8 1 AGFSEK.2y5 1 ALVTIEGM[Ox]DISGK.2y6 1 ALVTIEGMDISGK.2y8 1-2 ASNLVR.2b5 1-2 AVMTIK.2y4 2 C[CAM]NLVNGAGC[CAM]ENK.2y8 1-2 DESSISPELEK.2y6 1-2 DLNCC[CAM]R.2y4 1-2 EEPLWIVNFK.2y6 1-2 EVVVLASPIHR.2y9 1 EYIQGK.2y5 1-2 FAIEGDMK.2y5 1 FAVLSR.2y3 2 FFPLDLSFVR.2y6 1-2 FIDR.2y2 1-2 FVSGK.2y3 1 HPHYAIEGQK.2b8 1-2 IEIFPAQK.2y6 1-2 IEIFPAQK.2y7 1-2 IGFGK.2y4 1-2 IHEELK.2y4 1-2 INMLR.2y3 1-2 IQEEC[CAM]LK.2y6 1-2 IQTTWETLGDK.2y7 1-2 ISHSDTVR.3y5 1-2 ISYVEEPK.2y6 2 LAVLSR.2y5 1 LHTVPLVFALGC[CAM]VAAR.3y8 1-2 LLPAPELC[CAM]QNPVVEIVK.3y7 2 LMAETPFR.2y7 1-2 LMCIDIGK.2y7 1-2 LMMEQASISSPVK.3y8 1-2 LPVEVVEAEPK.2y8 1-2 LSSILNK.2b5 2 LLETAAPTR.2y8 1-2 MAVPR.2y2 1-2 MVVQDNK.2y4 1-2 NAENEVLAVIK.2y8 1-2 NILSEK.2y4 1 MVDLENR.2y4 1 MNSPMIMEVEPEIK.3y7 1-2 QC[CAM]AIPR.2y4 1-2 QETLGR.2b4 1-2 QFNEDVMEK.2b7 1-2 QILQSGFR.2y5 1 QVDMVR.2y3 2 QWAAALPGR.2y6 1-2 SEEDISPSLR.2y6 1 TFTGVPSR.2y6 1-2 THISSK.2y6 1-2 VETVAIGK.2y6 1-2 VLTDAK.2y5 1-2 VTDLTGPR.2y5 1 VTFOEK.2y4 1-2 YNEMPAVR.2y7 1-2 YSEVDPGQEVK.2y7 1 YWPLDLSFAR.2y6	<i>D. pulax</i>	ALVTIEGM[Ox]DISGK.2y6 ALVTIEGMDISGK.2y8 C[CAM]NLVNGAGC[CAM]ENK.2y7 DESSISPELEK.2y7 EVVVLASPIHR.3y7 FAVLSR.2y4 FIDR.2y3 IEIFPAQK.2y6 INM[Ox]LR.2y4 INMLR.2y4 IQEEC[CAM]LK.2y5 TFTGVPSR.2y6 VTDLTGPR.2y6 YSEVDPGQEVK.2y7
		<i>C. dubia</i>	DESSISPELEK.2y7 FAVLSR.2y4 FIDR.2y2 INMLR.2y3 LSSILNK.2y5 LLETAAPTR.2y7 MAVPR.2y4 VTDLTGPR.2y6 YSEVDPGQEVK.2y7
<i>A. vulgare</i>	AEGEVMSTK.2y8 C[CAM]TINVQVQDEK.2y8 GDVDC[CAM]ELR.2y5 IDYKPSIGHGK.2y8 IGFPEIR.2y4 LQDVEVGEFK.2y6 SEEVWITNIK.2y6 SIAQLFIVEPIR.2y7	<i>G. fossarum</i>	ALQAGGNK IEILK.2y3 ILIPGVGK.2y6 IVSVPSK.2y8 LEVVLQDK.2y6 TPPTC[CAM]WR.2y5 VIGSVNSPDR.2y9 VVTQVGHQDFTAVM[Ox]SR
		<i>G. wautleri</i>	ALQAGGNK IEILK ILIPGVGK IVSVPSK LEVVLQDK VIGSVNSPDR
		<i>G. roesei</i>	ALQAGGNK LEVVLQDK
		<i>G. pulax</i>	ALQAGGNK ILIPGVGK LEVVLQDK
		<i>D. villosus</i>	ALQAGGNK IEILK



# Chapitre IV

## 4. ETUDE DU BIOMARQUEUR Vg CHEZ L'AMPHIPODE DULÇAQUICOLE *GAMMARUS FOSSARUM*

---

4.1. Validation fonctionnelle de la mesure de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum*

4.2. Utilisation *in situ* et pertinence du biomarqueur Vg chez le mâle

---





#### **4.1. VALIDATION FONCTIONNELLE DE LA MESURE DE LA VITELLOGENINE CHEZ GAMMARUS FOSSARUM**

##### **Publication n°3 :**

**Les protéines « vitellogénine-like » chez l'amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) : caractérisation fonctionnelle au cours des processus reproductifs et utilisation potentielle comme un indicateur de la qualité des ovocytes et comme un biomarqueur de la perturbation endocrinienne chez les mâles.**

*Aquatic Toxicology*, 112– 113 (2012) 72– 82

Jubeaux G.<sup>a</sup>, Simon R.<sup>b</sup>, Salvador A.<sup>b</sup>, Quéau H.<sup>a</sup>, Chaumot A.<sup>a</sup>, Geffard O.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Irstea, Unité de Recherche Milieux Aquatiques (UR MALY), 3 bis Quai Chauveau – CP 220, F-69336 Lyon, France

<sup>b</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire des Sciences Analytiques, UMR-CNRS 5280, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

##### **Résumé :**

Ce travail est centré sur la validation de la spécificité biologique de l'essai quantitatif de la vitellogénine (Vg) par LC-MS/MS en étudiant la variabilité naturelle des niveaux de Vg au cours du cycle de reproduction de *Gammarus fossarum* (*i.e.*, en incluant l'ovogenèse et l'embryogenèse). Des tests au laboratoire ont été menés durant 21 jours en conditions contrôlées pour évaluer la modulation de la Vg chez des gammares mâles et femelles après l'exposition à un facteur de stress chimique. Les femelles ont été exposées à deux hormones de crustacés : la 20-hydroxyecdysone (0,01 ; 1 et 100 µg.mL<sup>-1</sup>) et le méthyle-farnesoate (0,01 ; 1 et 100 µg.mL<sup>-1</sup>). Nous n'avons pas détecté d'effets pour la 20-hydroxyecdysone alors que chez les femelles exposées au méthyle-farnesoate, des impacts délétères sur la synthèse de Vg ont été observés. Les mâles ont été exposés à deux hormones de crustacés : la 20-hydroxyecdysone (0,01 ; 1 et 100 µg.mL<sup>-1</sup>) et le méthyle-farnesoate (0,01 ; 1 et 100 µg.mL<sup>-1</sup>) ; un insecticide : le méthoxyfénozide (0,001 ; 0,1 et 100 µg.mL<sup>-1</sup>) ; un fongicide : le propiconazole (0,001 ; 0,1 ; 10 et 1000 µg.mL<sup>-1</sup>) et à des produits pharmaceutiques : la benzophénone, la carbamazépine, la cyprotérone et le *R*-propranolol (0,001 ; 0,1 ; 10 et 1000 µg.mL<sup>-1</sup>). Des inductions de la synthèse de Vg ont été montrées chez les mâles exposés à la cyprotérone, au méthoxyfénozide, au méthyle-farnesoate et au propiconazole. Enfin, nous avons validé la fonction du peptide ILIPGVGK utilisé pour tracer la Vg chez *G. fossarum* en le dosant chez les femelles au cours des différents processus reproductifs (vitellogenèse et embryogenèse), et les résultats confirment le rôle de protéine de réserve de la Vg durant le développement embryonnaire. Nous avons montré que les surfaces ovocytaires étaient directement corrélées à la quantité de Vg dans les ovocytes, constituant ainsi un indicateur pertinent de la qualité des œufs chez *G. fossarum*. Ainsi, ce marqueur pourrait être utilisé comme un outil pertinent lors de programmes de biomonitoring. Nous avons également montré des inductions de Vg chez des mâles de *G. fossarum* ; toutefois, l'utilisation de cet outil comme un biomarqueur spécifique de l'exposition à des perturbateurs endocriniens devra être confirmée dans de futures recherches.

##### **Mots clés :**

embryogenèse, perturbateur endocrinien, *Gammarus fossarum*, spectrométrie de masse, surface ovocyttaire, vitellogénine, quantification de protéine.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Aquatic Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquatox](http://www.elsevier.com/locate/aquatox)

## Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males

Guillaume Jubeaux<sup>a</sup>, Romain Simon<sup>b</sup>, Arnaud Salvador<sup>b</sup>, Hervé Quéau<sup>a</sup>, Arnaud Chaumot<sup>a</sup>, Olivier Geffard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Irstea, Unité de Recherche Milieux Aquatiques (UR MALY), 3 bis Quai Chauveau – CP 220, F-69336 Lyon, France

<sup>b</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, Laboratoire des Sciences Analytiques, UMR-CNRS 5280, 43 Boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 November 2011

Received in revised form 6 January 2012

Accepted 15 January 2012

#### Keywords:

Embryogenesis  
Endocrine disruptor  
*Gammarus fossarum*  
Mass spectrometry  
Oocyte surface  
Vitellogenin  
Protein quantitation

### ABSTRACT

This work focused on the validation of biological specificity of the quantitative LC–MS/MS assay by checking the natural variability of Vg levels during the reproductive cycle in *Gammarus fossarum* (i.e., including oogenesis and embryogenesis). Laboratory tests were performed for 21 days under controlled conditions to assess Vg changes in male and female gammarids after exposure to chemical stress. Females were exposed to two crustacean hormones, 20-hydroxyecdysone (0.01, 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and methyl-farnesoate (0.01, 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). No effect was recorded for 20-hydroxyecdysone, whereas in females exposed to methyl-farnesoate a deleterious impact on Vg production was observed. Males were exposed to crustacean hormones 20-hydroxyecdysone (0.01, 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and methyl-farnesoate (0.01, 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), the insecticide methoxyfenozide (0.001, 0.1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), the fungicide propiconazole (0.001, 0.1, 10 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and the pharmaceutical products benzophenone, carbamazepine, cyproterone, and *R*-propranolol (0.001, 0.1, 10 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Induction of Vg synthesis was recorded in males exposed to cyproterone, methoxyfenozide, methyl-farnesoate, and propiconazole. Finally, we validated the function of the ILIPGVGK peptide used to track vitellogenin in *G. fossarum* across reproductive processes (vitellogenesis and embryogenesis), and results confirmed the energy reserve role of Vg during embryo development. We show that oocyte surface measurement is directly related to Vg levels in the oocyte, constituting a reliable indicator of egg quality in *G. fossarum*. Consequently, it could be used as a reliable tool for biomonitoring programs. We recorded induction of Vg in male *G. fossarum*; however, the possible use of this tool as a specific biomarker of exposure to endocrine disruption should be confirmed in further studies.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Contaminants released into the environment ultimately enter aquatic systems and may have various short-term and long-term deleterious effects. Among these pollutants, some are known to act as endocrine disruptors (EDs) that may adversely affect the health of humans, wildlife, fish, and their progenies by interaction with the endocrine system (Colborn et al., 1993; Kavlock et al., 1996). *In situ*, the occurrence of EDs has usually been related to sewage treatment plant effluents that contain xenoestrogens as well as synthetic and natural hormones (Desbrow et al., 1998).

However, the potential endocrine-disrupting effects of pollutants from industrial and agricultural sources have not been fully examined.

Studies on the impacts of EDs on wildlife focus particularly on the hormonal regulation related to the reproductive function, because of its critical role in population dynamics. The availability and the biological effects of EDs in aquatic vertebrates, notably in fish, have been reported in numerous publications (Matthiessen, 2003; Langston et al., 2005). These studies have led to the development of biomarkers to measure alterations in reproductive function, such as abnormal concentrations in steroid hormones or induction of vitellogenin synthesis in male and juvenile organisms. However, despite their obvious ecological importance, this issue has received much less attention in aquatic invertebrates (deFur et al., 1999; deFur, 2004; Oetken et al., 2004). This is largely

\* Corresponding author.

E-mail address: [olivier.geffard@cemagref.fr](mailto:olivier.geffard@cemagref.fr) (O. Geffard).

attributed to the lack of knowledge of endocrine regulation of the reproductive process in invertebrate species that are routinely used in ecotoxicology, in particular in crustaceans for which hormonal regulation is based on ecdysteroids and juvenoid hormones in female and androgenic gland hormone in male (Charniaux-Cotton, 1954). Moreover, given the phylogenetic distance between species and the molecular divergence through bilaterian animal evolution, ED biomarkers available in fish cannot be easily used and/or should not be directly applied to the majority of invertebrates. However, there is growing evidence that crustaceans may also be susceptible to EDs (reviewed in LeBlanc, 2007). Field studies reported abnormal sex ratio and intersexuality frequency in natural populations exposed to pollution sources (e.g., Moore and Stevenson, 1991, 1994; Takahashi et al., 2000; Ford et al., 2004; Ayaki et al., 2005; Yang et al., 2008). In the same way, laboratory studies report deleterious effects of xenoestrogens and growth regulator insecticides on the reproduction rate, sexual behavior and sexual development of crustaceans (Baldwin et al., 1995; Olmstead and Leblanc, 2000; Gross et al., 2001; Watts et al., 2001; Schirling et al., 2006; Linton et al., 2009). Although changes in these endpoints may indicate a response to ED exposure, they can also vary in response to a wide range of other factors such as parasite occurrence and other environmental conditions. To date, few specific ED biochemical markers related to reproductive impairment are available in freshwater crustaceans (Xuereb et al., 2011).

In most oviparous species, vitellogenin and vitellogenin-like proteins (Vg) are the precursors of the egg-yolk proteins that provide energy reserves during embryogenesis, and consequently these proteins have a key role in reproduction (Byrne et al., 1989). Vg levels are high in sexually mature females, displaying a progressive increase during vitellogenesis, where Vg is strongly synthesized and accumulated in developing oocytes. In fish species, the hormonal regulation of Vg production has been intensively studied and its physiological role in female reproduction well documented. The production of Vg protein is under the control of the estrogen receptor pathway and the egg quality and quantity are directly related to the amount of this protein in organisms (Tyler and Sumpter, 1996; Arukwe and Goksøyr, 2003). Therefore, the measurement of this protein in females has been used as a relevant indicator for predicting reproductive success at population level (Murphy et al., 2005; Miller et al., 2007). Conversely, Vg has no known physiological function in males, and gene expression of this protein is normally silent or weak. Nevertheless, under chemical exposure (e.g., estrogens and mimetic-estrogens), Vg gene expression is turned on and Vg protein is produced in males (Sumpter and Jobling, 1995), constituting a relevant and reliable marker for assessing the exposure and effects of these pollutants in fish, both in laboratory (Flouriot et al., 1995; Hemmer et al., 2001; Seki et al., 2003) and field experiments (Sumpter and Jobling, 1995; Folmar et al., 1996; Harries et al., 1997; Routledge et al., 1998; Larsson et al., 1999).

In female crustaceans, Vg production is highly related to molting cycle (Jayasankar et al., 2002; Xuereb et al., 2011). Consequently, molt stage of females should be clearly known to allow a reliable interpretation of data using Vg levels in terms of pollutant impacts. In males, differentiation and maintenance of sex characteristics are positively controlled by androgenic gland hormone (AGH). This includes masculinization of pleopod and cheliped morphology, development of the male gonopore complexes and conversion of ovarian to testicular tissue (Charniaux-Cotton, 1954). AGH also negatively regulates vitellogenin synthesis (Suzuki et al., 1990). Consequently, the induction of *Vtg* in males could be used as a biomarker of androgenic gland hormone pathway disruption (LeBlanc, 2007). The number of studies on Vg are mainly focused on its molecular characterization and on the assessment of its role

(Vazquez-Boucard et al., 1986; Oberdörster et al., 2000; Okumura et al., 2004; Hannas et al., 2011). Few studies have been conducted on the use of these proteins as a specific biomarker of ED exposure, and most of them have been done on females (Gagné and Blaise, 2004; Martín-Díaz et al., 2004; Volz and Chandler, 2004; Gagné et al., 2005a; Ghekiere et al., 2006; Huang et al., 2006; Poynton et al., 2007), showing that Vg synthesis is susceptible to different contaminants (e.g., xenoestrogens, pesticides, metals or complex mixtures like urban and industrial waste). However, females display natural fluctuations of Vg levels during their reproductive cycle (Meusy and Junera, 1974; Jasmani et al., 2000; Okumura and Aida, 2000; Jayasankar et al., 2002). Therefore, accurate use and reliable interpretation of data using Vg measurements in females requires a detailed knowledge of their reproductive cycle to discriminate between natural fluctuations and chemical-induced variations; however, this is rarely the case in the literature (Lee and Noone, 1995; Gagné and Blaise, 2004; Ghekiere et al., 2006). To our knowledge, only the studies of Xuereb et al. (2011) in *Gammarus fossarum* and Sanders et al. (2005) in *Palaemon elegans* have developed and used Vg measurement as an ED biomarker in male crustaceans.

In crustaceans, the use of specific methods for Vg assessment in an ecotoxicological context has been limited to the measurement of gene expression of this protein in only a few species, such as *Daphnia magna* (Tokishita et al., 2006) and the copepod *Tigriopus japonicus* (Lee et al., 2008). Vg production has been commonly assessed at the protein level, using indirect methods such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Sagi et al., 1999; Oberdörster et al., 2000; Volz and Chandler, 2004; Ghekiere et al., 2006) or alkali-labile phosphate (ALP) measurement (Gagné and Blaise, 2004; Huang et al., 2004; Gagné et al., 2005b; Huang et al., 2006). Recently, a method based on liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (i.e., LC-MS/MS) has been developed allowing absolute quantification of this protein in the freshwater amphipod *G. fossarum* (Simon et al., 2010).

The aim of the present study was to assess the reliability of the Vg LC-MS/MS assay as an indicator of oocyte quality in females and a specific ED biomarker in males in the amphipod crustacean *G. fossarum*. The amphipods of the *Gammarus* genus are commonly used in freshwater risk assessment (Rinderhagen et al., 2000). Among freshwater species, crustacean amphipods are suitable organisms for ecotoxicological assessment of environmental pollutants (Kunz et al., 2010). They are ecologically relevant species since they are an important reserve of food for macroinvertebrate, fish, bird, and amphibian species and they play a major role in leaf litter breakdown processes (MacNeil et al., 2002; Maltby et al., 2002). Moreover, many subindividual and individual markers are now available in this species, allowing assessment of the impact of pollutants with diverse modes of action such as neurotoxic (Xuereb et al., 2009), genotoxic (Lacaze et al., 2010), and digestive impairments (Dedourge-Geffard et al., 2009) and on life traits playing a key role in population dynamics such as reproduction (Geffard et al., 2010), feeding, and locomotor behavior (Felten et al., 2008; Coulaud et al., 2011).

We constructed our experimental process in three steps. First we described the pattern of Vg levels in control organisms (in females and embryos during the molting cycle and in males). Next, we assessed the effects of two crustacean hormones, 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate, on various reproductive markers (molting and oocyte growth, Geffard et al., 2010), in order to check the relevance of oocyte surface measurement as an indicator of oocyte quality in female gammarids. Finally, we evaluated the potential use of this protein in male organisms as a biomarker of ED exposure by exposing gammarids to known or susceptible ED compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and chemicals

Acetonitrile, methanol and water (LC–MS grade) were obtained from Thermo Fisher Scientific® (Strasbourg, France). Dithiothreitol, iodoacetamide, formic acid (LC–MS grade), nitric acid (LC–MS grade), trypsin (type IX-S from Porcine Pancreas), urea, Tris, EDTA, Triton X, sodium chloride, leupeptin, aprotinin, 20-hydroxyecdysone, methoxyfenozide, propiconazole, benzophenone, carbamazepine, cyproterone, and R-propranolol were purchased from Sigma–Aldrich® (St Quentin-Fallavier, France). Methyl-farnesoate was purchased from Tebu-Bio® (Le Perray en Yvelines, France). Isotopically labeled ILIPGV\*(<sup>13</sup>C<sub>5</sub><sup>15</sup>N)GK peptide was purchased from Millegen® (Labège, France). Absolute ethanol and diethyl-ether were obtained from Carlo Erba® (Val de Reuil, France).

### 2.2. Test organism collection and maintenance

*G. fossarum* were sampled using a net, by kick sampling, from La Tour du Pin (Isère, France), upstream of the Bourbre River (mid-eastern France) and quickly transported to the laboratory in plastic bottles containing ambient fresh water. During an acclimatization period of at least 10 days the organisms were kept in 30 L tanks continuously supplied with drilled groundwater adjusted to the conductivity of the sampling site (i.e., 600  $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) and under constant aeration. A 16/8 h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at  $12 \pm 1^\circ\text{C}$ . Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*). The leaves were conditioned for  $6 \pm 1$  days in water. Freeze-dried worms (*Tubifex tubifex*) were given as a dietary supplement twice a week.

### 2.3. Vg content and oocyte surface in control gammarids

In amphipod crustaceans, the molt and reproductive cycles of sexually active females are synchronized. At the beginning of each molt cycle, simultaneous oocyte maturation and embryo development in the marsupium take place in females. Molt stages and embryo stages have previously been described in *G. fossarum*: two postmolt stages A and B, two intermolt stages C1 and C2, two premolt stages D1 and D2 and five embryo stages (Geffard et al., 2010). The Vg level was individually measured using quantitative LC–MS/MS assay in males ( $n = 15$ ), females ( $15 \geq n \geq 9$  for each of the 5 molt stages: AB group, C1, C2, D1, D2). For embryos, Vg levels were determined on pool of organisms (from 6 to 10 organisms for each of the 5 embryonic development stages). Detailed data on molt and embryo stages and oocyte surfaces have been reported by Geffard et al. (2010). Briefly, molt stage was determined by integumental morphogenesis analysis of the first and second periopod pairs (dactylopodite and protopodite) mounted on a microscope slide with a coverslip and observed under an optical microscope ( $\times 200$ ). Embryo stage was determined by morphological analysis of embryos manually recovered from the female marsupium, and placed on a slide with water under the binocular microscope. The oocyte surface was measured by placing the female laterally between two glass blades and placing it under the optical microscope ( $\times 50$ ) where the oocytes were photographed. The surface of each oocyte was then measured after analysis of the image with Sigma Scan Pro 5 software. Finally, males, females, and embryo broods were individually sampled, frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until Vg quantification (see below).

### 2.4. Vg content and oocyte surface in females and Vg content in males under chemical exposure

#### 2.4.1. Female exposure

Semi-static reproductive toxicity tests were performed, using the method described by Geffard et al. (2010). Briefly, precopulatory D2 molt stage females (i.e., hatched juveniles in brood pouches, visible oocytes) paired with males were exposed to chemical compounds for 21 days at a temperature of  $12.6 \pm 1^\circ\text{C}$  and under a 16/8 h light/dark photoperiod. Organisms were exposed to two crustacean hormones, 20-hydroxyecdysone (0.01, 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and methyl-farnesoate (0.01, 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Stock solutions were prepared in acetone at concentrations ranging from  $2.10^{-5}$  to  $2 \text{ g L}^{-1}$ . The contaminated media were obtained by adding 100  $\mu\text{L}$  of stock solutions in 2.5 L of uncontaminated drilled ground water (i.e.,  $600 \pm 50 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). Solvent-free and solvent controls (i.e., water and acetone 0.005%) were included. For each condition tested, 18 precopulatory pairs of similar size ( $11.1 \pm 1.1 \text{ mm}$ ) were placed equally in three 500 mL glass beakers. A piece of net (mesh size: 200  $\mu\text{m}$ ; 6 cm  $\times$  5 cm) was added in the vessel to provide a resting surface and to prevent cannibalism. Media were renewed every day, and at the same time the surviving organisms were assessed and the dead ones were removed. Organisms were fed *ad libitum* with conditioned alder leaves (*A. glutinosa*) and freeze-dried worms (*T. tubifex*). Water quality parameters (pH, conductivity, temperature and dissolved oxygen) were recorded before and after the renewal of the test solutions. At the end of the exposure and for each condition, females were collected and reproductive toxicity markers (molting stage, oocyte surface) were directly assessed using the method described above and criteria defined by Geffard et al. (2010). Because reproductive status of female gammarids is dependent on the molt cycle, only C2 molt stage females were used to determine mean oocyte surface in order to minimize the natural variability between individual animals (Geffard et al., 2010). Females were then individually frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until Vg measurement (see below).

#### 2.4.2. Male exposure

Today, a strong limit in the development of specific biomarkers of ED exposure in male organisms is the choice of model molecules with which to validate these biomarkers. Therefore, in this study, we chose to test several families of compounds, (1) crustacean hormones, 20-hydroxyecdysone and methyl farnesoate, for which data were only available for females in the literature; (2) pharmaceutical products, such as anti-cancer agents (cyproterone),  $\beta$ -blockers (R-propranolol), antiepileptic drugs (carbamazepine), and UV filters (benzophenone), currently detected and quantified in sewage treatment plant effluents and for which the impact on aquatic invertebrates is of great concern (Ferrari et al., 2003; Fent et al., 2006); and, (3) pesticides with the methoxyfenozide, acting on the ecdysone complex receptor (EcR-USP) in lepidopteran insects (Carlson et al., 2001) and propiconazole, an azole fungicide that is largely used in agriculture and that inhibits Vg gene expression in *D. magna* (Soetaert et al., 2006).

A similar exposure method to the one used for females was applied. The main differences were that for each condition tested, 21 males of similar size ( $11.1 \pm 1.1 \text{ mm}$ ) were placed equally in three 500 mL glass beakers. Organisms were exposed to two crustacean hormones, 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate (0.01, 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), the insecticide methoxyfenozide (0.001, 0.1 and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), the fungicide propiconazole (0.001, 0.1, 10 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and the pharmaceutical products benzophenone, carbamazepine, cyproterone, and R-propranolol (0.001, 0.1, 10 and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Stock solutions were prepared in acetone at concentrations ranging from  $2 \times 10^{-5}$  to  $2 \text{ g L}^{-1}$ , except for carbamazepine and R-propranolol solutions that were prepared in

water. The contaminated media were obtained by adding 125  $\mu\text{L}$  of stock solutions in 2 L of uncontaminated drilled ground water (*i.e.*,  $600 \pm 50 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). At the end of exposure and for each replicate, 15 males (5 randomly collected in each replicate) were individually weighted, frozen in nitrogen liquid and stored at  $-80^\circ\text{C}$  until Vg measurement.

### 2.5. Extraction procedure

Females were individually homogenized in 1 mL icecold Tris buffer (Tris 50 mM; 100 mM NaCl; 0.01 mM EDTA) adjusted to pH 7.8 plus leupeptine and aprotinine ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) in a 2 mL tube placed in a ball mill at  $4.5 \text{ m s}^{-1}$  for 20 s. Pool of embryos (from 12 to 18) were homogenized with same buffer volume that used for females. Finally, males were individually homogenized in (1/25-w/v). Homogenates were centrifuged at  $10,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 15 min. A sample of 250  $\mu\text{L}$  clear supernatant was collected and delipidated by adding 750  $\mu\text{L}$  of 1/1-ethanol98%/diethyl-ether solution. The mixture was vortexed and placed on ice again for 10 min. Samples were then centrifuged at  $10,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. Clear supernatant was removed, the bottom was mixed with 250  $\mu\text{L}$  Tris buffer. Subsequently, 3 mL of ammonium bicarbonate 50 mM and 355  $\mu\text{L}$  of dithiothreitol (150 mM) were added to the supernatant. Then samples were incubated for 40 min at  $60^\circ\text{C}$ . After cooling to room temperature, 395  $\mu\text{L}$  of iodoacetamide (150 mM) was added and samples were placed in the dark at room temperature for 40 min. We then added 150  $\mu\text{L}$  of trypsin mixed in 50 mM ammonium bicarbonate ( $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) and samples were incubated for 4 h at  $37^\circ\text{C}$ . Similarly, a second cycle of 150 mM dithiothreitol (455  $\mu\text{L}$ ), 150 mM iodoacetamide (505  $\mu\text{L}$ ), and trypsin ( $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ ) was added and samples were finally incubated for 20 h at  $37^\circ\text{C}$ . To stop the reaction, 10  $\mu\text{L}$  of formic acid was added. Then, 100  $\mu\text{L}$  of standard-labeled ILIPGV\*( $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}$ )GK at  $25 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  was added to female and embryo samples, and 100  $\mu\text{L}$  of standard-labeled ILIPGV\*( $^{13}\text{C}_5^{15}\text{N}$ )GK at  $1 \text{ pg } \mu\text{L}^{-1}$  was added in male samples. Standard-labeled stock was prepared independently by dissolving accurately weighed standard compounds in 95/5-water/acetonitrile mixture containing 0.1% formic acid. Female and embryo samples were vortexed and transferred to glass auto-sampler vials for LC-MS/MS measurement; 3 mL of male samples was purified and concentrated on an HLB 30 mg solid phase extraction column (Waters®, USA). Columns were conditioned by successively adding 1 mL of methanol and 1 mL of water acidified with 0.5% formic acid. After adding 3 mL of digested samples, columns were washed by adding 1 mL of 95/5-water/methanol mixture acidified with 0.5% formic acid. Finally, columns were eluted by adding 1 mL of 20/80-water/methanol mixture acidified with 0.5% formic acid. Eluted samples were evaporated in a Savant-SpeedVac concentrator from Thermo Fisher scientific® to obtain 100  $\mu\text{L}$  of sample. Tubes were then vortexed and male samples were transferred to glass auto-sampler vials for LC-MS/MS measurement.

### 2.6. Liquid chromatography–mass spectrometry

LC-MS/MS was performed with a system comprising an HP1290 series HPLC device (Agilent Technologies®, Germany) coupled to a QTRAP 5500 LC-MS/MS System hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex®, USA) equipped with a Turbo V™ ion source. For instrument control, data acquisition and processing, the associated Analyst 1.5 software was used. LC separation of the 10  $\mu\text{L}$  injected sample was carried out on a Symmetry C<sub>18</sub> column (100 mm  $\times$  2.1 mm, particle size 3.5  $\mu\text{m}$ ) from Waters. Elution was performed at a flow rate of  $300 \mu\text{L min}^{-1}$  with water containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent A and acetonitrile containing 0.1% (v/v) formic acid as eluent B, employing a linear gradient from

5% B to 13% B in 20 min. Column was washed for 5 min with 95% B and re-equilibrated for 5 min. The injection duty cycle was 30 min, taking into account the column equilibration time. The mass spectrometer was initially tuned and calibrated using polypropylene glycol, reserpine and Agilent Tuning Mix from AB Sciex according to the manufacturer's instructions. Q1 resolution was adjusted to  $0.7 \pm 0.1$  a.m.u. FWHM, referred to as unit resolution. Q3 was also set to unit resolution in MRM mode. MS analysis was carried out in positive ionization mode using an ion spray voltage of 5500 V. The nebulizer and the curtain gas flows were set at 40 psi using nitrogen. The Turbo V™ ion source was set at  $450^\circ\text{C}$  with the auxiliary gas flow (nitrogen) set at 40 psi. From the initial set of candidate SRM transitions, transitions tracking peptide ILIPGVGK (*i.e.*, 398.8/457.3; 398.8/570.4) were selected for the assay. The collision energies (20 and 17 eV), declustering potential (60 V), and collision cell exit potentials (13 and 17 V) were optimized for each SRM transition chosen. The SRM transitions were monitored and acquired at unit resolution in Q1 and Q3, with a dwell time of 100 ms used for each transition, to obtain between 25 and 30 data points per chromatographic peak. The two tracked ILIPGVGK transitions are highly correlated and so the 398.8/457.3 ILIPGVGK transition was selected for data processing and analysis.

Results were expressed in pmol of ILIPGVGK peptide per mg of wet weight for males and in pmol of ILIPGVGK peptide per organism for embryos. In females results were expressed in pmol of ILIPGVGK peptide in whole body normalized by the number of oocytes which were determined before the extraction.

### 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was made with the R software (R Development Core Team, 2008). Normality and variance homogeneity were checked, respectively, using the Shapiro–Wilk and Bartlett tests. For experiment 1, inter-group comparisons of Vg levels were made by nonparametric analyses (Mann–Whitney test). For experiment 2, nonparametric analyses were performed (Kruskal–Wallis rank sum tests, Mann–Whitney tests).

## 3. Results

### 3.1. Vg content in control gammarids

The mean Vg level in males was  $0.02 \pm 0.02$  pmol of ILIPGVGK peptide/mg (Table 1). In females, a significant increase of Vg production (Mann–Whitney test  $p < 0.05$ ) occurred during the molting cycle, with values ranging from  $0.35 \pm 0.3$  to  $15.3 \pm 3.5$  pmol of ILIPGVGK peptide/oocyte in AB and D2 females, respectively. The same pattern was observed for oocyte surfaces (Mann–Whitney test  $p < 0.05$ ), with values from  $0.001 \pm 0.010$  to  $0.17 \pm 0.02 \text{ mm}^2/\text{oocyte}$  during the molt cycle (Table 1). A positive and significant relationship (adjusted *R*-squared: 0.89,  $p < 0.001$ ) was noted between these two last parameters (Vg levels and oocyte surface) during the reproductive cycle of females (Fig. 1). Finally, in embryos, there was conversely a significant (Mann–Whitney test  $p < 0.05$ ) decrease of Vg levels during embryogenesis, with a marked decrease during the first stages. Vg levels in embryos ranged from  $21.4 \pm 3.4$  to  $0.07 \pm 0.04$  pmol of ILIPGVGK peptide/embryo at stages 1 and 5, respectively (Table 1).

### 3.2. Vg levels in females exposed to crustacean hormones

The survival rates and molt stages for each condition are summarized in Table 2. No significant mortality was observed, with values higher than 80% after 21 days of exposure. The percentage of C2 molt-stage females used for measurement of Vg levels and oocyte surface were higher than 80% in controls, and

**Table 1**

*Gammarus fossarum* Vg level in males and embryos throughout the embryonic development cycle (from 1 to 5 embryonic stage), and Vg level and mean oocyte surface in females throughout the reproductive–molt cycle (from AB to D2 molt stage). AB, C1, C2, D1 and D2 correspond to five molt stages and 1, 2, 3, 4 and 5 correspond to five developmental stages characterized in *G. fossarum* (Geffard et al., 2010). Table presents mean ± standard error values of Vg level quantified by LC–MS/MS (expressed in pmol ILIPGVGK peptide per mg in male, per oocyte in female, and per embryo), and values of mean oocyte surface measured after analysis of oocyte images with Sigma Scan Pro 5 software in females (expressed in mm<sup>2</sup>). Statistical analyses are reported in the text. nd = not determined. 7 ≥ n ≥ 15 per condition.

	Stage	n	Vitellogenin level (in pmol ILIPGVGK peptide)	Mean oocyte surface/female (in mm <sup>2</sup> )
Male	nd	15	0.02 ± 0.02/mg	nd
Female	AB	15	0.35 ± 0.3/oocyte	0.001 ± 0.01/oocyte
	C1	9	2.9 ± 1.3/oocyte	0.04 ± 0.01/oocyte
	C2	10	8.5 ± 3.8/oocyte	0.09 ± 0.02/oocyte
	D1	9	12.3 ± 2.9/oocyte	0.13 ± 0.02/oocyte
	D2	14	15.3 ± 3.5/oocyte	0.17 ± 0.02/oocyte
Embryo	1	10	21.4 ± 3.3/embryo	nd
	2	9	15.9 ± 7.6/embryo	nd
	3	6	1.54 ± 1.2/embryo	nd
	4	9	0.25 ± 0.2/embryo	nd
	5	7	0.07 ± 0.04/embryo	nd

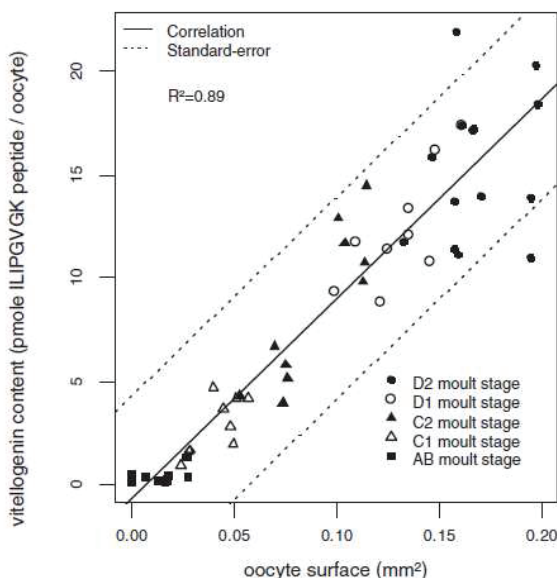
ranged from 70 to 95% for 20-hydroxyecdysone (0.01, 1, and 100 µg L<sup>-1</sup>) and methyl-farnesoate (0.01, 1, and 100 µg L<sup>-1</sup>). Vg levels (expressed in pmol of ILIPGVGK peptide/oocyte) and oocyte surfaces (expressed in mm<sup>2</sup>) recorded in females after a 21-day exposure to the two crustacean hormones 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate (0.01, 1, and 100 µg L<sup>-1</sup>) are presented in Fig. 2. 20-hydroxyecdysone had no effect either on Vg production or on oocyte growth (Kruskal–Wallis rank sum test, p > 0.05). Conversely, methyl-farnesoate had a significant (Kruskal–Wallis rank sum test, p < 0.05) impact on these two parameters, inhibiting Vg production and oocyte growth, with a dose–response relationship.

Fig. 3 shows the Vg levels and mean oocyte surface values obtained in females exposed to methyl-farnesoate compared to the relationship observed in control organisms (see Section 3.1; Fig. 1). Values recorded in control organisms and females exposed

to 0.01 µg L<sup>-1</sup> methyl-farnesoate were similar to those previously obtained in C2 molt stage females (see Section 3.1). In females exposed to 1 and 100 µg L<sup>-1</sup> methyl-farnesoate, the Vg levels and oocyte surfaces correspond to the values previously obtained in AB and C1 organisms.

3.3. Vg inductions in males exposed to EDCs

Vg levels in males (expressed in square root of pmol of ILIPGVGK peptide/mg of fresh weight) after a 21-day exposure to the crustacean hormones 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate (0.01, 1, and 100 µg L<sup>-1</sup>), the insecticide methoxyfenozide (0.001, 0.1, and 10 µg L<sup>-1</sup>), the fungicide propiconazole (0.001, 0.1, 10, and 1000 µg L<sup>-1</sup>), and the safe care products benzophenone, carbamazepine, cyproterone, and R-propranolol (0.001, 0.1, 10, and 1000 µg L<sup>-1</sup>) are presented in Fig. 4. No mortality was observed, with survival rates higher than 80%, except at the highest cyproterone concentration (i.e., 1000 µg L<sup>-1</sup>) where a mortality of 50% was recorded. Vg levels recorded in both solvent-free and solvent controls did not display difference (Mann–Whitney test, p > 0.05), and consequently values were pooled. 20-hydroxyecdysone, carbamazepine, benzophenone, and R-propranolol did not induce Vg production in males (Kruskal–Wallis rank sum test, p > 0.05). Conversely, a significant Vg induction (Mann–Whitney test, p < 0.05) was observed in organisms exposed to methyl-farnesoate, cyproterone, propiconazole, and methoxyfenozide.



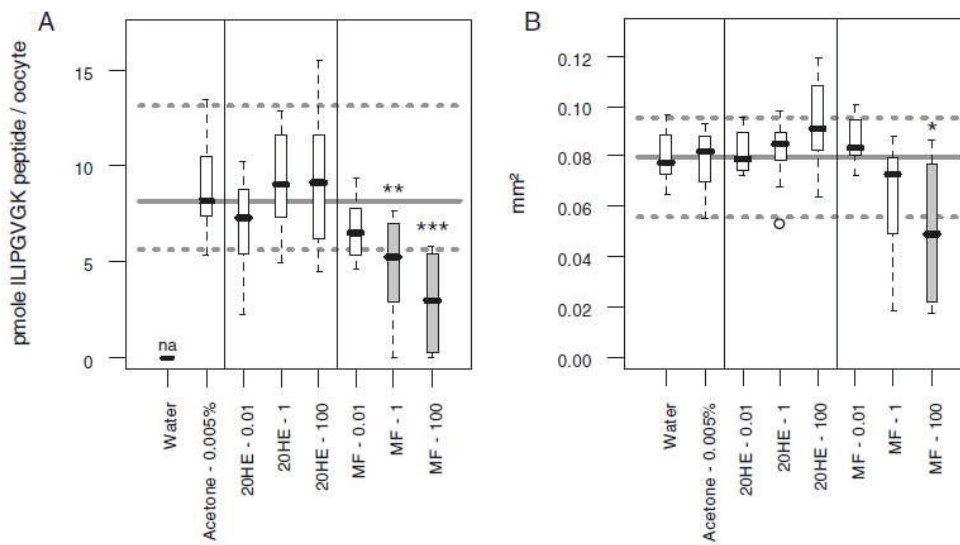
**Fig. 1.** Correlation of *Gammarus fossarum* Vg level (expressed in pmol ILIPGVGK peptide per oocyte) and mean oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup>) throughout the reproductive–molt cycle of sexually active females (from AB to D2 molt stage). AB, C1, C2, D1 and D2 correspond to five molt stages characterized in *G. fossarum* (Geffard et al., 2010). Symbols: AB stage (solid square), C1 stage (empty triangle), C2 stage (solid triangle), D1 stage (empty circle) and D2 stage (solid circle). Black solid and dashed lines illustrate linear correlation and standard error (adjusted R-squared: 0.89; p-value < 1e<sup>-16</sup>). 9 ≥ n ≥ 15 females per molt stage.

**Table 2**

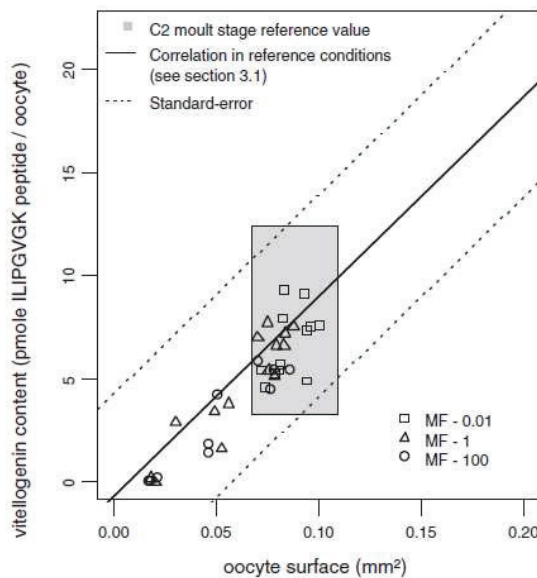
*Gammarus fossarum* survival rates (%) and C1, C2 and D1 molt stages (%) in females after 21 days of exposure: solvent-free control (i.e., water), solvent control (i.e., acetone 0.005%), 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate (0.01, 1, and 100 µg L<sup>-1</sup>).

Condition	Survival (%)	Molt stages (%)		
		C1	C2	D1
Control				
Water	89	14	86	0
Acetone 0.005%	86	20	80	0
20-Hydroxyecdysone				
0.01 µg L <sup>-1</sup>	83	30	70	0
1 µg L <sup>-1</sup>	86	30	70	0
100 µg L <sup>-1</sup>	97	7	73	20
Methyl-farnesoate				
0.01 µg L <sup>-1</sup>	86	20	80	0
1 µg L <sup>-1</sup>	94	5	95	0
100 µg L <sup>-1</sup>	89	21	79	0





**Fig. 2.** Vg level (expressed in pmol ILIPGVGK peptide per oocyte, A) and mean oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup>, B) in C2 molt stage *Gammarus fossarum* females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100 μg L<sup>-1</sup>) and methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100 μg L<sup>-1</sup>). Solvent-free control = water; solvent control = Acetone 0.005%; na = not available. Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. The p-values of the global effect of treatment are reported in the text. \*\*, \*\*\*, \*\*\* = significant difference (p < 0.05, p < 0.01, p < 0.001) from the overall control groups (solvent control only for Vg content, and both solvent-free control and solvent control for mean oocyte surface), in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines represent median and quartiles 95% of all controls combined. 9 ≥ n ≥ 14 C2 molt stage females per condition.



**Fig. 3.** Correlation of *Gammarus fossarum* Vg level (expressed in pmol ILIPGVGK peptide per oocyte, Y axis) and mean oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup>, X axis) in C2 molt stage females after 21-day exposure to methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100 μg L<sup>-1</sup>). Symbols: MF – 0.01 μg L<sup>-1</sup> (empty square), MF – 1 μg L<sup>-1</sup> (empty triangle) and MF – 100 μg L<sup>-1</sup> (empty circle) exposed females. Gray box delimits C2 molt stage from Vg content (Y axis) and mean oocyte surface (X axis), previously characterized in control group through the reproductive-molt cycle of sexually active females (from AB to D2 molt stages) (see Section 3.1, Table 1 and Fig. 1). Black solid and dashed lines show linear correlation and standard error of Vg content and mean oocyte surface in control group through the reproductive-molt cycle of sexually active females (from AB to D2 molt stages, see Section 3.1, Fig. 1). 10 ≥ n ≥ 14 C2 molt stage females per condition.

**4. Discussion**

**4.1. Pattern of Vg levels in control gammarids**

In the first part of this study, the Vg levels of males, sexually active females and embryos were determined and compared in order to establish the normal pattern of Vg contents in control organisms. In males, the production of Vg was very low, but not completely null and, as expected, a strong inter-sex difference was observed with male values being from 10 to 10<sup>3</sup> times lower than the ones observed in females (values are expressed in pmol of ILIPGVGK peptide/mg of fresh weight). In one of our previous studies on Vg gene expression, values of 10<sup>2</sup> to 10<sup>3</sup> times higher in females than in males were also obtained (Xuereb et al., 2011). However, this marked inter-sex difference is not always observed in the literature. In the crayfish *Cherax quadricarinatus* Sagi et al. (1999) have shown that secondary vitellogenic females exhibited levels of Vg 10<sup>3</sup> times higher than in males, whereas Shechter et al. (2005), using real-time PCR, detected no evidence of transcription of the *Vtg* gene in males of this species. To a lesser extent, Volz and Chandler (2004) observed Vg protein levels only tenfold higher in vitellogenic females in comparison to males in the copepod *Lep-tocheirus plumulosus*.

Significant differences in Vg levels were also observed in females during their reproductive molt cycle, with values ranging from 0.35 ± 0.3 to 15.3 ± 3.5 pmol/oocyte in AB and D2 stage females, respectively. The highest Vg production was observed for C2 and D1 stages, with Vg increases of 6 and 4 pmol of peptide/oocyte, respectively. These findings are consistent with our previous results (Geffard et al., 2010; Xuereb et al., 2011), which demonstrated that in *G. fossarum* females the strongest growth of secondary oocytes and the highest expression of Vg gene take place between the end of the intermolt stage (i.e., C2) and the beginning of the premolt period (i.e., D1). It is well known that vitellogenesis and oocyte production are closely related to the molt cycle in numerous crustacean groups (Hannas et al., 2011) and particularly in peracarids (e.g., amphipods, mysids and isopods) (Charniaux-Cotton, 1973; Subramoniam, 2000). In this study, results showed that there was

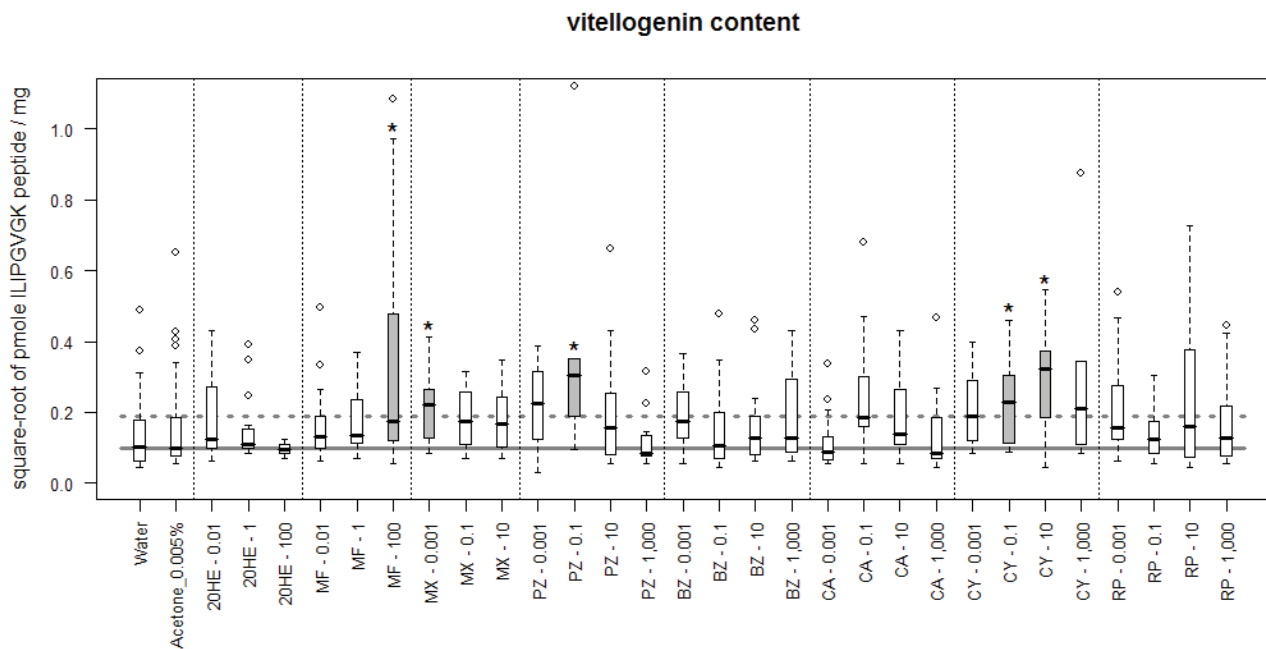


Fig. 4. Square-root of Vg level (expressed in pmol ILIPGVGK peptide per mg) in *Gammarus fossarum* males after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and R-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Solvent-free control=water; solvent control=acetone 0.005%. Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. The *p*-values of the global effect of treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control groups (solvent free control and solvent control) in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines represent median and superior confidence interval of all controls combined.  $n = 15$  males per condition, except for CY-1,000 ( $n = 9$ ).

a significant and positive relationship between surface and Vg contents in oocytes during the reproductive cycle in this species (Fig. 1). Many authors have reported that Vg synthesis and ovarian development are highly related during the reproductive molt cycle in amphipods (Blanchet-Tournier, 1980) and decapods (Okumura and Aida, 2000; Jayasankar et al., 2002; Jasmani et al., 2004); however, few studies have characterized this relationship in greater detail. These results show that a reliable interpretation of data using Vg in females requires detailed knowledge of their reproductive cycle to discriminate between natural fluctuations and chemical-induced variations, yet this is rarely reflected in the literature (Lee and Noone, 1995; Gagné and Blaise, 2004; Ghekiere et al., 2006). These results also clearly demonstrate that measurement of the oocyte surface is a good and reliable indicator of Vg contents of the oocyte, and thereby a reliable indicator of oocyte quality in this species.

Except for insects, ticks, and decapod crustaceans, consumption of vitellin or lipovitellin during embryogenesis has rarely been documented in other arthropods, and to our knowledge no data are available for amphipods. In the present study, the Vg levels recorded in embryos of *G. fossarum* varied greatly during their development, with values ranging from  $21.4 \pm 3.4$  to  $0.07 \pm 0.04$  pmol/embryo in stage 1 and 5, respectively. Vg was mainly used during the first stages of embryonic development, with a consumption of 50% at the end of stage 2 and of 90% at the end of stage 3. This pattern is in agreement with organogenesis observed during embryonic development. Indeed, in stage 3, the development of the main organs is almost complete. In comparison, the consumption rate of lipovitellin in decapod crustaceans was slower in early embryogenesis and then rapid in later embryonic stages also coinciding with active embryo organogenesis (Walker et al., 2006; García et al., 2008). For example, in *Macrobrachium borellii*,

there was a significant decrease of lipovitellins between stages 5 and 6, representing more than 70% of total lipovitellin consumption.

Results obtained in the first part of this study confirm the physiological role of this protein in the reproductive process of this species, particularly as an energy reserve for embryonic development, and validate the use of ILIPGVGK peptide as a specific Vg candidate to measure and quantify Vg levels in *G. fossarum* by LC-MS/MS.

#### 4.2. Modulation of Vg levels and oocyte growth in females exposed to crustacean hormones

In crustaceans, ecdysteroids are signaling molecules that control various physiological functions such as molting, embryonic development (Subramoniam, 2000; Mu and LeBlanc, 2002, 2004) and possibly reproduction (Gunamalai et al., 2004). In this study, results show that 20-hydroxyecdysone did not interfere with the development of the first molting stages (from AB to C2), with oocyte growth and with Vg production in females exposed to concentrations up to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , suggesting that this hormone has no role, or only a limited one, in the vitellogenesis process in this species. However, some studies have underlined relationships between ecdysteroid titers and Vg levels during ovarian maturation in isopods (Suzuki et al., 1996; Steel and Vafopoulou, 1998) and decapods (Jayasankar et al., 2002). During ovarian maturation in the crab *E. asiatica*, an increase of hemolymph 20-hydroxyecdysone titers has been observed up to the intermolt period, followed up by a rapid decrease during the premolt period just before the end of vitellogenesis and egg fertilization (Gunamalai et al., 2004). In the lobster *H. americanus*, Tiu et al. (Tiu et al., 2010) showed that

20-hydroxyecdysone alone or in combination with farnesoic acid stimulates Vg gene expression in females. In contrast, Hannas et al. (2011) clearly found that Vg mRNA levels in *D. magna* are negatively regulated by ecdysteroids and mimetic ecdysteroids compounds.

The major terpenoid hormone, methyl-farnesoate (*i.e.*, the unepoxidized form of insect III juvenile hormone), is a signaling molecule that has been measured in many crustaceans (Laufer and Biccferst, 2001). Several studies have been undertaken to understand the hormonal role of methyl-farnesoate in crustacean reproduction and they indicated that it stimulates or enhances processes such as gametogenesis (*e.g.*, increased gonad mass of both males and females) or vitellogenesis (Laufer and Biccferst, 2001; Nagaraju et al., 2003). In this study, results clearly show that methyl-farnesoate inhibited vitellogenesis, leading to females with smaller oocytes and Vg depletion as compared to control organisms. Our results confirm previous data obtained in *G. fossarum* females exposed to methyl-farnesoate concentrations ranging from 0.01 to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Simon et al., 2010). As vitellogenesis is directly related to molting (Fig. 1; Geffard et al., 2010; Hannas et al., 2011), it is essential to take into account the molting stage of females for an accurate interpretation of oocyte surface measurements. With methyl-farnesoate, no molting cycle delay was observed in females, showing that this molecule specifically disturbs the production of Vg in this species. A similar observations was made in the red crab *Charybdis feriatus*, demonstrating that the effect of methyl-farnesoate on Vg production depends on the maturation stage of the oocyte (Mak et al., 2005). Indeed, methyl-farnesoate stimulates Vg in organisms with early vitellogenic-stage oocytes, whereas it inhibits it in females with middle vitellogenic-stage oocytes. However, a most of the studies in decapods showed opposite effects, such as an increase of oocyte growth, Vg levels and egg production (Borst et al., 1987; Tsukimura and Kamemoto, 1991; Laufer and Biccferst, 2001; Rodríguez et al., 2002; Mak et al., 2005). Conversely, Hannas et al. (2011) did not detect any effect of several juvenoids, including methyl farnesoate, on *D. magna* Vg mRNA levels exposed to concentration up to 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

The present work underlines the close relationship, previously discussed (see Section 4.1), existing between the oocyte surface and Vg levels in oocytes. Egg quality is closely related to Vg uptake in oocytes because the amino acids, energy (phosphate bonds), lipid, and calcium needed for embryo development mainly originate from this storage protein (Brooks et al., 1997). For the methyl-farnesoate experiment, the surface and Vg levels of oocytes observed in control organisms and females exposed to a concentration of 0.01  $\mu\text{g L}^{-1}$  were similar to those obtained with control C2 females in Section 4.1, showing the robustness and reliability of these markers. On the contrary, in organisms exposed to 1 and 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  methyl-farnesoate, a simultaneous inhibition of the surface and Vg contents of oocytes was observed. Under these conditions, C2 females have oocyte surfaces and Vg levels corresponding to females with less advanced molting stages (C1 and AB). These data show that the oocyte surface constitutes a reliable indicator of oocyte quality and could be used as a marker of the deleterious effects of pollutants on this physiological process. The measurement of this parameter is much easier and less expensive than the analytical analysis needed for quantification of this protein, regardless of the methods used. Consequently, and in the context of EDs in aquatic systems, the measurement of oocyte surfaces could prove to be a relevant and interesting biomonitoring tool, particularly for caged organisms in which the molting stages could be controlled at the beginning of the experiment. To our knowledge, no similar data are available for crustaceans in the literature in order to compare them with the data from this work. However, in vertebrates, some papers show that Vg is a predominant part of the egg components, up to over 90% of the final volume (Tyler and Sumpter, 1996). Uptake of yolk proteins by the oocyte is

positively correlated with oocyte growth (Christians and Williams, 2001), and under chemical stress, a decrease in egg size can be linked with depletion of yolk protein production (Williams, 2001).

#### 4.3. Vg in males as endocrine disruption biomarker

In crustaceans, the effects of 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate were exclusively studied in females. To our knowledge, this is the first paper that investigates their effects on Vg induction in male crustaceans. 20-Hydroxyecdysone did not affect Vg synthesis, while methyl-farnesoate significantly induced it. According to amphipod endocrinology, one hypothesis is that such molecules may interfere with the androgenic gland hormone that negatively regulates Vg synthesis. Most pesticides are designed to mimic the role of these two hormones, in order to control the growth, the development or the reproduction of arthropod pests in agriculture. Methoxyfenozide is a recent diacylhydrazine insecticide that has a very strong affinity to the ecdysone receptor complex (EcR-USP) in lepidopteran insects (Carlson et al., 2001). It functions as a potent agonist of the insect molting hormone, 20-hydroxyecdysone. Evidence collected to date indicates that methoxyfenozide has an excellent margin of safety in nontarget organisms, such as the beetle (Trisyono et al., 2000) or acarid (Villanueva and Walgenbach, 2005). Nevertheless, there has been no assessment of methoxyfenozide toxicity at a larger phylogenetic scale. In this study, Vg induction was observed in males exposed to the lowest concentration of methoxyfenozide; however, no induction was observed for the highest concentrations. No data are available in the literature on the potent endocrine disruption of methoxyfenozide in other nontarget invertebrates in order to compare them with this study. The second pesticide tested was propiconazole, an azole fungicide largely used in agriculture. A nonmonotonic concentration–response curve was obtained with a significant induction of Vg production in males exposed to a concentration of 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . In contrast, Soetaert et al. (2006) observed an inhibition of transcription of Vg gene in *D. magna* at a concentration of 1  $\text{mg L}^{-1}$ . However, it is noteworthy that this study was conducted with high concentrations and in females, and no data were available for males to directly compare them with the present study.

Personal care products have been currently detected in sewage treatment plant effluents. Some pharmaceutical effects on aquatic organisms have been investigated with acute toxicity assays. However, chronic toxicity and sublethal effects are only marginally known (Fent et al., 2006). The vertebrate antiandrogen cyproterone is a synthetic derivative of progesterone, which has an antiandrogenic action in vertebrates. In fact, the antagonizing effect of dihydro-testosterone on androgen receptors results in a reduction of testosterone synthesis. In this study, cyproterone exposure induced Vg synthesis in males at environmentally realistic concentrations. Induction of Vg gene expression has also been recorded in *G. fossarum* males exposed to a high cyproterone concentration (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) for 4 days (Xuereb et al., 2011). In fish, cyproterone has been shown to alter testicular development and gametogenesis at 1 or 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  and to reduce the circulating levels of estradiol and testosterone for levels as low as 10  $\text{ng L}^{-1}$  (Kiparissis et al., 2003; Sharpe et al., 2004). Two other pharmaceutical compounds were tested, a  $\beta$ -blocker (R-propranolol) and an antiepileptic drug (carbamazepine). These two compounds appear to be the most problematic from an environmental risk point of view (Ferrari et al., 2003; Fent et al., 2006). In this study, no Vg production changes were observed in males exposed to these two compounds. To our knowledge, no data are available in the literature on the ED effects of these molecules in other crustacean species.

Finally, the ED effects of benzophenone in *G. fossarum* were investigated. Benzophenone is an ultraviolet (UV) screen. Its use has

increased as a result of the growing concern over the link between UV radiation and skin cancer. Benzophenones are also added to cosmetics and other products for light stability. In invertebrates, only the nematode *Caenorhabditis elegans* has been used for benzophenone toxicity testing with a 24 h-LC<sub>50</sub> of 56.8 mg L<sup>-1</sup> (Ura et al., 2002). To date, no data on its ED effect in invertebrates have been reported. In this study, no Vg induction was observed in organisms exposed to BZ concentrations ranging from 0.001 to 1000 µg L<sup>-1</sup>.

In all cases, Vg inductions observed during this study did not follow a classic concentration–response relationship. Indeed, inductions occurred at low but not at the highest concentrations tested. This specific pattern can be explained by possible sublethal toxic effects occurring at highest concentrations. Sanders et al. (2005) observed a similar pattern with nonylphenol that significantly enhances the vitellin-like protein synthesis in zoe larvae stages of *P. elegans*, at concentrations ranging from 0.2 to 20 µg L<sup>-1</sup>, the lowest concentration exerting the most consistent stimulatory effects. Several EDs, particularly xenoestrogens, have unequivocally been shown to have biological effects, displaying nonmonotonic concentration–response curves, also called the low-dose effect (Markey et al., 2003), that complicate their use as biomarkers in field situations. Results of this study clearly show that measurement of Vg levels in males highlights a stress in the exposed organisms, which can lead to Vg levels (1 pmol of ILIPGVGK peptide/mg) similar to those observed in AB stage of females. However, it is difficult to conclude on the possible use of Vg measurement as a specific ED biomarker in males. Indeed, the highest induction factor observed in this study is 10, which is much lower compared to that observed in fish, which can reach values up to 10<sup>4</sup> (Van den Belt et al., 2001).

## 5. Conclusion

This study provides: (1) a description of the natural pattern of Vg in *G. fossarum* during reproductive processes and validation of the ILIPGVGK peptide for Vg quantification by LC–MS/MS; (2) information on the use of Vg production and oocyte surface in female crustaceans as an indicator of oocyte quality; and (3) data on developing the use of Vg production in male crustaceans as a biomarker of ED exposure. Vg levels are very different in males, females, and embryos, displaying marked modulations in females during the reproductive cycle and in embryos during the embryonic development cycle. On the one hand, female gammarids exposed under laboratory-controlled conditions showed that under chemical stress Vg synthesis and the oocyte surface were modulated in a similar way. Both of these markers can be proposed as a reliable indicator of egg quality. On the other hand, male gammarids exposed under laboratory-controlled conditions showed that under chemical stress Vg synthesis may be induced in males. These chemicals, which are poorly studied in crustaceans, may disturb the Vg production pathway, showing that pollutants may impact normal function of androgenic gland, leading a Vg production in males. Future research is necessary to study the impact of toxic stressors in the field by measuring egg quality and male Vg induction. Finally, it seems important to consider independently of the group of species the endocrine-disrupting effects caused by chemicals, since some potent EDs that have been identified in vertebrates may have no effect on invertebrates, because of the relatively high divergence of their endocrine systems.

## Acknowledgment

The authors wish to thank the French National Research Programs PNRPE (Convention no. CV05000088 and Convention no. 0006942) for partial financial support.

## References

- Arukwe, A., Goksøyr, A., 2003. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comp. Hepatol.* 2, 21 (Article number 4).
- Ayaki, T., Kawauchino, Y., Nishimura, C., Ishibashi, H., Arizono, K., 2005. Sexual disruption in the freshwater crab (*Geothelphusa dehaani*). *Integr. Comp. Biol.* 45, 39–42.
- Baldwin, W.S., Milam, D.L., Leblanc, G.A., 1995. Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 945–952.
- Blanchet-Tournier, M.F., 1980. Mue et vitellogenèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (Pallas): contrôle endocriné et interactions Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), p. 175.
- Borst, D.W., Laufer, H., Landau, M., Chang, E.S., Hertz, W.A., Baker, F.C., Schooley, D.A., 1987. Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development. *Insect Biochem.* 17, 1123–1127.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fish.* 7, 387–416.
- Byrne, B.M., Gruber, M., Ab, G., 1989. The evolution of egg yolk proteins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 53, 33–69.
- Carlson, G.R., Dhadialla, T.S., Hunter, R., Jansson, R.K., Jany, C.S., Lidert, Z., Slawewski, R.A., 2001. The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist. *Pest Manag. Sci.* 57, 115–119.
- Charniaux-Cotton, H., 1954. Discovery in, an amphipod crustacean (*Orchestia gammarellus*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. [Découverte chez un crustacé amphipode (*Orchestia gammarellus*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation de caractères sexuels primaires et secondaires mâles.]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 239, pp. 780–782.
- Charniaux-Cotton, H., 1973. Description et contrôle de l'ovogénèse chez les Crustacés supérieurs. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.* 13, 21–30.
- Christians, J.K., Williams, T.D., 2001. Interindividual variation in yolk mass and the rate of growth of ovarian follicles in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J. Comp. Physiol., B: Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 171, 255–261.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* 101, 11–55.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011. *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res.* 45, 6417–6429.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: an *in situ* experiment. *Chemosphere* 77, 1569–1576.
- deFur, P., Crane, M., Ingersoll, C., Tattersfield, L., 1999. Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology Testing and Assessment. SETAC Press, Pensacola.
- deFur, P.L., 2004. Use of invertebrates in testing for endocrine disruptors. *Inst. Lab. Anim. Res. J.* 45, 484–493.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549–1558.
- Felten, V., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aujoulat, F., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* 147, 189–197.
- Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76, 122–159.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrate acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 359–370.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Valotaire, Y., 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 15, 143–151.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillet Jr., L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* 104, 1096–1101.
- Ford, A.T., Fernandes, T.F., Rider, S.A., Read, P.A., Robinson, C.D., Davies, I.M., 2004. Endocrine disruption in a marine amphipod? Field observations of intersexuality and de-masculinisation. *Mar. Environ. Res.* 58, 169–173.
- Gagné, F., André, C., Blaise, C., 2005a. Increased vitellogenin gene expression in the mussel *Elliptio complanata* exposed to estradiol-17β. *Presenius Environ. Bull.* 14, 861–866.
- Gagné, F., Blaise, C., 2004. Shell protein characteristics and vitellogenin-like proteins in brine shrimp *Artemia franciscana* exposed to municipal effluent and 20-hydroxycyclohexane. *Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol.* 138, 515–522.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., 2005b. Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus* sp. collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environ. Res.* 98, 89–99.
- García, F., Cunningham, M.L., Garda, H., Heras, H., 2008. Embryo lipoproteins and yolk lipovitellin consumption during embryogenesis in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae). *Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol.* 151, 317–322.

- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagiatti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2249–2259.
- Ghekiere, A., Verslycke, T., Janssen, C., 2006. Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 190–195.
- Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morrill, D., Crane, M., 2001. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1792–1797.
- Gunamalai, V., Kirubakaran, R., Subramoniam, T., 2004. Hormonal coordination of molting and female reproduction by ecdysteroids in the mole crab *Emerita astatica* (Milne Edwards). *Gen. Comp. Endocrinol.* 138, 128–138.
- Hannas, B.R., Wang, Y.H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H., LeBlanc, G.A., 2011. Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquat. Toxicol.* 101, 351–357.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tylor, T., Zaman, N., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 534–542.
- Hemmer, M.J., Hemmer, B.L., Bowman, C.J., Kroll, K.J., Folmar, L.C., Marcovich, D., Hoglund, M.D., Denslow, N.D., 2001. Effects of p-nonylphenol, methoxychlor, and endosulfan on vitellogenin induction and expression in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 336–343.
- Huang, D.J., Chen, H.C., Wu, J.P., Wang, S.Y., 2006. Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane. *Chemosphere* 64, 11–16.
- Huang, D.J., Wang, S.Y., Chen, H.C., 2004. Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). *Chemosphere* 57, 1621–1627.
- Jasmani, S., Kawazoe, I., Shih, T.W., Suzuki, Y., Aida, K., 2000. Hemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fish. Sci.* 66, 535–539.
- Jasmani, S., Ohira, T., Jayasankar, V., Tsutsui, N., Aida, K., Wilder, M.N., 2004. Localization of vitellogenin mRNA expression and vitellogenin uptake during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Exp. Zool., A: Comp. Exp. Biol.* 301, 334–343.
- Jayasankar, V., Tsutsui, N., Jasmani, S., Saïdo-Sakanaka, H., Yang, W.J., Okuno, A., Hien, T.T.T., Aida, K., Wilder, M.N., 2002. Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Exp. Zool.* 293, 675–682.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., Tilson, H.A., 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104, 715–740.
- Kiparissis, Y., Metcalfe, T.L., Balch, G.C., Metcalfe, C.D., 2003. Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 63, 391–403.
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 205, 1–76.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 700, 32–38.
- Langston, W.J., Burt, G.R., Chesman, B.S., Vane, C.H., 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in aquatic environment. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 85, 1–31.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.E., Förlin, L., 1999. Ethinylloestradiol – an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45, 91–97.
- Laufer, H., Biccferst, W.J., 2001. Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development. 1. *Am. Zool.* 41, 442–457.
- LeBlanc, G.A., 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16, 61–81.
- Lee, K.W., Hwang, D.S., Rhee, J.S., Ki, J.S., Park, H.G., Ryu, J.C., Raisuddin, S., Lee, J.S., 2008. Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol.* 150, 395–402.
- Lee, R.F., Noone, T., 1995. Effect of reproductive toxicants on lipovitelin in female blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Mar. Environ. Res.* 39, 151–154.
- Linton, S., Barrow, L., Davies, C., Harman, L., 2009. Potential endocrine disruption of ovary synthesis in the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* by the insecticide pyriproxyfen. *Comp. Biochem. Physiol., A: Mol. Integr. Physiol.* 154, 289–297.
- MacNeil, C., Dick, J.T.A., Bigsby, E., Elwood, R.W., Montgomery, W.I., Gibbins, C.N., Kelly, D.W., 2002. The validity of the *Gammarus:Asellus* ratio as an index of organic pollution: abiotic and biotic influences. *Water Res.* 36, 75–84.
- Mak, A.S.C., Choi, C.L., Tiu, S.H.K., Hui, J.H.L., He, J.G., Tobe, S.S., Chan, S.M., 2005. Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 288–300.
- Maltby, L., Clayton, S.A., Wood, R.M., McLoughlin, N., 2002. Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: robustness, responsiveness, and relevance. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 361–368.
- Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 2003. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83, 235–244.
- Martin-Diaz, M.L., Sales, D., Del Valls Casillas, T.Á., 2004. Influence of salinity in hemolymph vitellogenin of the shore crab *Carcinus maenas*, to be used as a biomarker of contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 870–877.
- Matthiessen, P., 2003. Endocrine disruption in marine fish. *Pure Appl. Chem.* 75, 2249–2261.
- Meusy, J.-J., Junera, H.Y.C., 1974. Données sur la synthèse de la fraction protéique femelle chez *Orchestia gammarella* Palas (Crustacé Amphipode), au cours de l'intermue et chez les femelles en repos sexuel. *C.R. Acad. Sci. Paris* 279, 587–590.
- Miller, D.H., Jensen, K.M., Villeneuve, D.L., Kahl, M.D., Makynen, E.A., Durhan, E.J., Ankley, G.T., 2007. Linkage of biochemical responses to population-level effects: a case study with vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 521–527.
- Moore, C.G., Stevenson, J.M., 1991. The occurrence of intersexuality in harpacticoid copepods and its relationship with pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 22, 72–74.
- Moore, C.G., Stevenson, J.M., 1994. Intersexuality in benthic harpacticoid copepods in the Firth of Forth, Scotland. *J. Nat. Hist.* 28, 1213–1230.
- Mu, X., LeBlanc, G.A., 2002. Environmental antiectodysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J. Exp. Zool.* 292, 287–292.
- Mu, X., LeBlanc, G.A., 2004. Cross communication between signaling pathways: juvenile hormones modulate ecdysteroid activity in a crustacean. *J. Exp. Zool., A: Comp. Exp. Biol.* 301, 793–801.
- Murphy, C.A., Rose, K.A., Thomas, P., 2005. Modeling 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.
- Nagaraju, G.P.C., Suraj, N.J., Reddy, P.S., 2003. Methyl farnesoate stimulates gonad development in *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 76, 1171–1178.
- Oberdörster, E., Rice, C.D., Irwin, L.K., 2000. Purification of vitellin from grass shrimp *Palaemonetes pugio*, generation of monoclonal antibodies, and validation for the detection of lipovitelin in Crustacea. *Comp. Biochem. Physiol., C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 127, 199–207.
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., Kwang, W.J., 2004. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *Int. Rev. Cytol.* 236, 1–44.
- Okumura, T., Aida, K., 2000. Fluctuations in hemolymph ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish. Sci.* 66, 876–883.
- Okumura, T., Yoshida, K., Nikaido, H., 2004. Ovarian development and hemolymph vitellogenin levels in laboratory-maintained protandric shrimp, *Pandalus hypsinotus*: measurement by a newly developed time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA). *Zool. Sci.* 21, 1037–1047.
- Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2000. Effects of endocrine-active chemicals on the development of sex characteristics of *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2107–2113.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Caviglioglio, G., Chan, S., Holman, P.S., Loguinov, A.V., Bauer, D.J., Komachi, K., Theil, E.C., Perkins, E.J., Hughes, O., Vulpe, C.D., 2007. *Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 41, 1044–1050.
- R Development Core Team, 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 2000. Crustaceans as bioindicators. In: Gerhardt, A. (Ed.), *Biomonitoring of Polluted Water—Reviews on Actual Topics*. Environmental Research Forum, pp. 161–194.
- Rodríguez, E.M., López Greco, L.S., Medesani, D.A., Laufer, H., Fingerman, M., 2002. Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 125, 34–40.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559–1565.
- Sagi, A., Khalaila, I., Abdu, U., Shoukrun, R., Weil, S., 1999. A newly established ELISA showing the effect of androgenic gland on secondary-vitellogenin-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115, 37–45.
- Sanders, M.B., Billingham, Z., Depledge, M.H., Clare, A.S., 2005. Larval development and vitellin-like protein expression in *Palaemon elegans* larvae following xeno-oestrogen exposure. *Integr. Comp. Biol.* 45, 51–60.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K.U., Nagel, R., Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2006. Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology* 15, 143–156.
- Seki, M., Yokota, H., Maeda, M., Tadokoro, H., Kobayashi, K., 2003. Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1507–1516.
- Sharpe, R.L., MacLatchy, D.L., Courtenay, S.C., Van Der Kraak, G.J., 2004. Effects of a model androgen (methyl testosterone) and a model anti-androgen (cyproterone acetate) on reproductive endocrine endpoints in a short-term adult mummichog (*Fundulus heteroclitus*) bioassay. *Aquat. Toxicol.* 67, 203–215.
- Shechter, A., Afalo, E.D., Davis, C., Sagi, A., 2005. Expression of the reproductive female-specific vitellogenin gene in endocrinologically induced male and intersex *Cherax quadricarinatus* crayfish. *Biol. Reprod.* 73, 72–79.
- Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O., Salvador, A., 2010. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent

- assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). J. Chromatogr., A 1217, 5109–5115.
- Soetaert, A., Moens, L.N., Van Der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R., De Coen, W.M., 2006. Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol. 142, 66–76.
- Steel, C.G.H., Vafopoulou, X., 1998. Ecdysteroid titres in haemolymph and other tissues during moulting and reproduction in the terrestrial isopod, *Oniscus asellus* (L.). Invert. Reprod. Dev. 34, 187–194.
- Subramoniam, T., 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. Comp. Biochem. Physiol., C: Toxicol. Pharmacol. 125, 135–156.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. Environ. Health Perspect. 103, 173–178.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Fujita, T., Mamiya, Y., Sonobe, H., 1996. Ovarian and hemolymph ecdysteroids in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (malacostracan crustacea). Gen. Comp. Endocrinol. 104, 129–138.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Katakura, Y., 1990. Vitellogenin synthesis in andrectomized males of the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (malacostracan crustacea). Gen. Comp. Endocrinol. 77, 283–291.
- Takahashi, T., Araki, A., Nomura, Y., Koga, M., Arizono, K., 2000. The occurrence of dual-gender imposex in Japanese freshwater crab. J. Health Sci. 46, 376–379.
- Tiu, S.H.K., Chan, S.M., Tobe, S.S., 2010. The effects of farnesoic acid and 20-hydroxyecdysone on vitellogenin gene expression in the lobster, *Homarus americanus*, and possible roles in the reproductive process. Gen. Comp. Endocrinol. 166, 337–345.
- Tokishita, S., Kato, I., Kobayashi, Y., Nakamura, T., Ohta, S., Yamagata, T.H., 2006. Organization and repression by juvenile hormone of a vitellogenin gene cluster in the crustacean, *Daphnia magna*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 345, 362–370.
- Trisyono, A., Puttler, B., Chippendale, G.M., 2000. Effect of the ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the lady beetle, *Coleomegilla maculata*. Entomol. Exp. Appl. 94, 103–105.
- Tsukimura, B., Kamemoto, F.I., 1991. In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture 92, 59–66.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rev. Fish Biol. Fish. 6, 287–318.
- Ura, K., Kai, T., Sakata, S., Iguchi, T., Arizono, K., 2002. Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. J. Health Sci. 48, 583–586.
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H., 2001. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 41, 458–467.
- Vazquez-Boucard, C., Ceccaldi, H.J., Benyamin, Y., Roustan, C., 1986. Identification, purification, et caractérisation de la lipovitelline chez un crustacé décapode natantia *Penaeus japonicus* (Bate). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 97, 37–50.
- Villanueva, R.T., Walgenbach, J.F., 2005. Development, oviposition, and mortality of *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae) in response to reduced-risk insecticides. J. Econ. Entomol. 98, 2114–2120.
- Volz, D.C., Chandler, G.T., 2004. An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in Copepods: a screening tool for endocrine toxicity. Environ. Toxicol. Chem. 23, 298–305.
- Walker, A., Ando, S., Smith, G.D., Lee, R.F., 2006. The utilization of lipovitellin during blue crab (*Callinectes sapidus*) embryogenesis. Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol. 143, 201–208.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001. Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. Water Res. 35, 2347–2352.
- Williams, T.D., 2001. Experimental manipulation of female reproduction reveals an intraspecific egg size-clutch size trade-off. Proc. R. Soc. Lond. B 268, 423–428.
- Xuereb, B., Bezin, L., Chaumont, A., Budzinski, H., Augagneur, S., Tutundjian, R., Garric, J., Geffard, O., 2011. Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males. Ecotoxicology, 1–14.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard, O., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquat. Toxicol. 94, 114–122.
- Yang, G., Kille, P., Ford, A.T., 2008. Infertility in a marine crustacean: have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? Aquat. Toxicol. 88, 81–87.



## 4.2. UTILISATION *IN SITU* ET PERTINENCE DU BIOMARQUEUR Vg CHEZ LE MALE

### Publication n°4 :

**Mesure de la vitellogénine chez les mâles *Gammarus fossarum* engagés comme un biomarqueur d'exposition à des perturbateurs endocriniens : une expérience peu concluante.**

*Aquatic Toxicology*, soumise et révisée

Jubeaux G.<sup>a</sup>, Simon R.<sup>b</sup>, Salvador A.<sup>b</sup>, Lopes C.<sup>a</sup>, Lacaze E.<sup>a</sup>, Quéau H.<sup>a</sup>,  
Chaumot A.<sup>a</sup>, Geffard O.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Irstea, UR MALY, F-69336 Lyon, France.

<sup>b</sup> Université de Lyon, Lyon 1, UMR 5180 Institut des Sciences Analytiques, F-69622 Villeurbanne, France

### Résumé :

Un dosage de la vitellogénine (Vg) par spectrométrie de masse a été récemment développé pour diagnostiquer et évaluer chez l'amphipode *Gammarus fossarum* l'exposition à des perturbateurs endocriniens dans les hydrosystèmes aquatiques. Cet article a pour objectif de proposer une utilisation pertinente de ce biomarqueur, ce qui nécessite une bonne connaissance des niveaux de base chez les mâles et de leur variabilité naturelle liée aux facteurs intrinsèques et environnementaux. Pour obtenir une variabilité de la réponse du biomarqueur qui soit la plus faible possible, nous avons d'abord étudié l'influence d'un certain nombre de ces facteurs confondants. Nous avons ainsi observé que la spermatogenèse n'avait pas d'impact sur les niveaux de Vg, ce qui permet une plus grande flexibilité lors de la sélection des organismes à transplanter. Dans la seconde partie de l'article, nous avons engagé des mâles *G. fossarum* dans deux stations de référence pendant 21 jours à différentes saisons, avec des résultats qui nous indiquent une variabilité spatiale et temporelle des niveaux de Vg. Ces variations n'ont pas pu être corrélées avec des facteurs environnementaux tels que la température. Enfin, l'induction de Vg chez les mâles a été évaluée lors d'un programme de biosurveillance active via la transplantation d'organismes dans 21 stations de référence ou impactées en juin 2010. Des inductions ont été observées dans seulement deux des stations impactées. Durant ces expositions, une importante variabilité inter-individuelle des niveaux de Vg a été observée, ce qui limite fortement la sensibilité de ce biomarqueur et sa capacité à détecter les effets de perturbation endocrinienne. Ceci s'explique probablement par l'influence de facteurs confondants non identifiés durant cette étude et qui devront être caractérisés pour améliorer l'utilisation de la Vg comme un biomarqueur chez les mâles *G. fossarum*. De plus, comme nous le discutons dans cet article, les avancées récentes concernant les fonctions pléiotropiques du gène de la Vg chez certaines espèces pourraient compliquer l'application de ce biomarqueur chez le mâle.

Mots clés : vitellogénine, perturbateur endocrinien, *Gammarus fossarum*, variabilité intrinsèque, biosurveillance in situ.







ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Aquatic Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aquatox](http://www.elsevier.com/locate/aquatox)

## Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: Inconclusive experience

Guillaume Jubeaux<sup>a</sup>, Romain Simon<sup>b</sup>, Arnaud Salvador<sup>b</sup>, Christelle Lopes<sup>a</sup>, Emilie Lacaze<sup>a</sup>, Hervé Quéau<sup>a</sup>, Arnaud Chaumot<sup>a</sup>, Olivier Geffard<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Irstea, UR MALY, F-69336 Lyon, France

<sup>b</sup> Université de Lyon, Université Lyon 1, UMR 5280 Institut des Sciences Analytiques, F-69622 Villeurbanne, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 April 2012

Received in revised form 11 May 2012

Accepted 22 May 2012

#### Keywords:

Vitellogenin

Endocrine disrupting

*Gammarus fossarum*

Intrinsic variability

Field survey

### ABSTRACT

A vitellogenin (Vg) mass spectrometry-based assay was recently developed to actively biomonitor and assess the exposure of the amphipod *Gammarus fossarum* to endocrine-disrupting chemicals in freshwater hydrosystems. This paper focuses on the appropriate use of this biomarker, which requires good knowledge of its basal level in males and its natural variability related to intrinsic biotic and environmental abiotic factors. To obtain the lowest biomarker variability, we first studied some of these confounding factors. We observed that the spermatogenesis stage did not have an impact on the Vg level, allowing flexibility in the choice of transplanted gammarids. In the second part of the study, males were transplanted in two clean stations for 21 days, with results indicating a spatial and temporal variability of Vg levels. These Vg changes could not be correlated to environmental factors (e.g., temperature, pH and hardness of waters). Vg induction was then assessed in 21 stations having various levels of contamination. Inductions were observed for only two of the impacted stations studied. Under reference and contaminated conditions, a high interindividual variability of Vg levels was observed in caged organisms, severely limiting the sensitivity of the biomarker and its ability to detect a significant endocrine-disruptor effect. This may be explained by unidentified environmental factors that should later be determined to improved the use of Vg as a biomarker in male *G. fossarum*. Moreover, as discussed in this paper, recent advancements regarding the pleiotropic functions of the Vg gene in some species may complicate the application of this biomarker in males of invertebrate species.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

In oviparous species, vitellogenins (Vg) or other related proteins from the large lipid transfer protein superfamily (vitellogenin-like proteins) are precursors of the egg-yolk proteins that ensure normal embryonic development and consequently play a key role in reproduction (Hayward et al., 2010; Smolenaars et al., 2007). In female vertebrates, Vg production is under the control of the estrogen receptor pathway, and the quality and quantity of eggs are directly related to the amount of this protein in organisms (Brooks et al., 1997; Tyler and Sumpter, 1996). Conversely, the Vg gene is silent or poorly expressed in males, and Vg induction is a well-known effect of exposure to endocrine disruptors (ED; e.g., estrogens and mimetic-estrogens) (Sumpter and Jobling, 1995). Consequently, measurement of Vg mRNA or protein level in male

fish is currently proposed as a relevant tool for diagnosing ED effects. Indeed, clear relationships have been established between abnormal Vg inductions and testosterone level changes (Folmar et al., 1996), testicular abnormalities (Lye et al., 1997), and intersex incidence (Jobling et al., 2002). On the contrary, despite their obvious ecological importance, this issue has received far less attention in crustaceans currently used in aquatic ecotoxicology, such as branchiopods, copepods, isopods, amphipods, and mysids, and therefore few tools are available to diagnose ED exposure and/or ED effects in these organisms (deFur et al., 1999; deFur, 2004; Oetken et al., 2004). However, several field observations have suggested the occurrence of ED within wild crustacean populations. One of the most convincing and well documented of these observations is the occurrence of intersex individuals among a wide range of taxa (LeBlanc, 2007). Hormonal regulation of reproduction in crustaceans is mainly based on ecdysteroid and terpenoid hormones in females and on the androgenic gland hormone (AGH) in males (Charniaux-Cotton, 1954). The AGH positively controls the differentiation and maintenance of male sexual characteristics, such as masculinization of pleopods and cheliped morphology, development of male gonopore complex, and conversion of ovarian tissue

\* Corresponding author at: Irstea, UR MALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France. Tel.: +33 472208785; fax: +33 478477875.

E-mail addresses: [olivier.geffard@irstea.fr](mailto:olivier.geffard@irstea.fr), [olivier.geffard@cemagref.fr](mailto:olivier.geffard@cemagref.fr) (O. Geffard).

to testicular tissue, in particular by inhibiting the synthesis and production of Vg (Ford, 2008; Ventura et al., 2011). Consequently and by analogy to the method applied in aquatic vertebrates, the measurement of Vg in crustaceans has been proposed as a biomarker of AGH pathway disruption (LeBlanc, 2007).

A review of the literature showed that the relevance and reliability of Vg measurement as a specific biomarker of ED exposure in crustaceans is unclear. In their review, Matozzo et al. (2008) indicated that Vg synthesis and induction in crustaceans can be used as a reliable biomarker of exposure to xenoestrogenic contaminants. However, several studies in marine crustaceans showed that vertebrate-estrogenic compounds have few effects on survival, development, and reproduction (Andersen et al., 2001; Lye et al., 2008; Tatarazako et al., 2002). Finally, Hannas et al. (2011) clearly demonstrated that the measurement of Vg mRNA levels in *Daphnia magna* can be used in biomonitoring the exposure of daphnids to some environmental chemicals but it is not useful as an indicator of exposure to estrogenic chemicals. These *a priori* contradictory observations can be partly explained by various drawbacks that limit a robust and reliable deployment of Vg measurements in invertebrates.

In crustaceans and in an ecotoxicological context, the use of specific methods for Vg assessment has been limited. To our knowledge, measurement of the expression of the gene encoding this protein was only applied to a few species, such as *D. magna* (Tokishita et al., 2006), the copepod *Tigriopus japonicus* (Lee et al., 2008), and the amphipod *Gammarus fossarum* (Xuereb et al., 2011). Vg production was more commonly assessed at the protein level, using indirect methods such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Ghekiere et al., 2006) and alkaline phosphatase (ALP) measurement (Gagné et al., 2005). However, this latter method, largely used in ecotoxicology approaches, can lead to surprising observations, such as similar basal levels in control male and female organisms (Aarab et al., 2004; Quinn et al., 2004, 2006).

As underlined by Ford (2008), nearly all the studies related to Vg measurements in crustaceans following chemical exposure in the field and the laboratory have focused mainly on females. However, females display natural fluctuations of Vg levels during their reproductive-molt cycle (e.g., Jubeaux et al., 2012; Okumura and Aida, 2000; Xuereb et al., 2011). Therefore, accurate use and reliable interpretation of data require detailed knowledge of the reproductive cycle of crustaceans to discriminate between natural changes and chemical-induced variations (e.g., Jubeaux et al., 2012; Xuereb et al., 2011). However, such knowledge is rarely reported in the literature (e.g., Gagné et al., 2005; Lee and Noone, 1995). Moreover, Vg is a protein naturally produced in females and its modulation cannot be directly related to a specific exposure to ED compounds, indeed it could be the result of indirect effects related, for example, to energy depletion, impacting the molt or reproductive cycle. To our knowledge, very few studies have developed and proposed Vg measurement as a specific ED biomarker in male crustaceans as done, for example, by Xuereb et al. (2011) in *G. fossarum* and Sanders et al. (2005) in *Palaemon elegans*.

The diversification and nonconservation of functions between orthologous proteins during animal evolution (e.g., neofunctionalisation, subfunctionalisation) is another source of misuse or misinterpretation of Vg-annotated genes or proteins as ED biomarkers in invertebrates. Many other biological functions not related to reproduction have been discovered during the last decade for Vg-like proteins in several metazoan lineages (see Zhang et al., 2011). Such pleiotropy can even be accompanied by loss or gain of function as exemplified by the protein ortholog of Vg, which plays a role in clotting in decapods, while egg-yolk protein is produced by a Vg paralog gene belonging to the subfamily of apolipoproteins (Avarre et al., 2007), highlighting the relevance of

functional controls in the development of biomarkers (Nikinmaa and Rytönen, 2011; Xuereb et al., 2011).

Among crustaceans, gammarids are recognized as a relevant sentinel species in ecotoxicology (review by Kunz et al., 2010), because they are widespread, can be easily used under laboratory and field (caging) conditions, are known to be sensitive to contaminants, and methods are available to measure certain life traits (Coulaud et al., 2011; Felten et al., 2008; Geffard et al., 2010) and molecular biomarkers (Dedourge-Geffard et al., 2009; Jubeaux et al., 2012; Lacaze et al., 2010; Xuereb et al., 2007). Recently, a method based on liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed allowing the absolute quantification of this protein in *G. fossarum* (Simon et al., 2010). At the same time, the function of this protein in relation to the reproduction processes of this species (oogenesis and embryonic development) and its potential use in males as a specific ED biomarker under laboratory conditions has been investigated (Jubeaux et al., 2012).

The present study aimed to assess the potential use of Vg measurement in male *G. fossarum* as a relevant, reliable, and sensitive ED biomarker in biomonitoring programs. In this context and as clearly shown by Coulaud et al. (2011) and Lacaze et al. (2011a), *in situ* bio-assays (caging of control gammarids) constitute a powerful experimental design and allow a reduction in variability compared to field monitoring of indigenous organisms. Because biomarkers could be influenced by some biotic (e.g., age, life stages, sex, reproductive stage) and environmental abiotic factors (e.g., temperature, hardness) (Handy et al., 2003), the impact of these potential confounding factors should be characterized to improve the use of Vg as a biomarker in male *G. fossarum* for *in situ* approaches. For this, our experimental design comprised three steps. (1) The impact of the reproductive status (spermatogenesis) on Vg levels in males was studied in order to determine its influence on basal Vg levels in males. (2) The impact of environmental abiotic factors (seasonal and spatial variability) on the Vg levels in males was assessed by caging organisms in reference stations characterized by high annual temperature changes and differences in water hardness levels. (3) The relevance of Vg measurement in caged *G. fossarum* males as a biomonitoring tool was examined, by performing a large-scale field survey (Rhône watershed) of 21 chemical stations, 5 as reference (uncontaminated) and 16 as contaminated by organic and inorganic compounds.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

Acetonitrile, methanol, and water (LC-MS grade) were obtained from Fisher Scientific (Strasbourg, France). Dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAM), formic acid >95% (FA) (LC-MS grade), nitric acid (LC-MS grade), trypsin (type IX-S from Porcine Pancreas), ammonium bicarbonate (AMBIC), TRIS, EDTA, Triton X, sodium chloride, leupeptin, and aprotinin were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Absolute ethanol and ether were obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Isotopically labeled peptide ILIPGV\*(<sup>13</sup>C5<sup>15</sup>N)K was purchased from Millegen (Labège, France).

### 2.2. Gammarid collection and maintenance

Gammarids were collected upstream of the Bourbre River (La Tour du Pin, France; 287 mgL<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub>) and quickly transported to the laboratory (Irstea, Lyon). This station displayed good water quality according to RNB data records (Réseau National de Bassin, French Watershed Biomonitoring Network) and high

density of gammarids. Gammarids were kept in aquariums for a 15-day acclimatization period under constant aeration. They were continuously supplied with a groundwater/osmosed water mixture at constant hardness, 88.2 or 223 mg L<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub>, depending on the hardness level of the stations studied in the present work. A 18/6-h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 ± 1 °C. Gammarids were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) and freeze-dried worms (*Tubifex tubifex*). Experiments were performed using male gammarids of homogeneous body size (8–11 mm), as suggested by Coulaud et al. (2011) and Lacaze et al. (2011a,b), and male gammarids were weighed at the end of the experiment.

### 2.3. Impact of spermatogenesis status on Vg levels in *G. fossarum* males

The impact of spermatogenesis status was investigated by comparing Vg levels in gammarids during a complete cycle of spermatogenesis. Male organisms were collected and sex of individuals was checked by observation of genital papillae under binocular microscope (×50). According to the spermatogenesis described by Lacaze (2011), three stages were tested. Stage 1: mature males (day -1) in precopula, shortly before fertilization, and for which spermatozoid production was completed; stage 2: organisms in which spermatogenesis restarted (day 0), *i.e.*, shortly after mating; and stage 3: organisms for which spermatogenesis was finished (7 days after mating; day 7) and the spermatozoid amount was maximal and similar to day -1 males. For the first stage (D -1) ten males in precopula with premolt-stage females (see Geffard et al., 2010) were collected, weighed, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until Vg quantification. At the same time, 20 precopula specimens were individually placed in polypropylene cylinders (diameter 5 cm, length 10 cm) capped at their ends with pieces of net (mesh size: 1 mm). Cylinders were then placed in a 20-L aquarium continuously supplied with natural water used for acclimation (see Section 2.2) at constant hardness (223 mg L<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub>) and temperature (12 ± 0.2 °C). Couples were monitored every day to determine the two over-tested stages, D0 (24 h after mating) and D +7 (7 days after mating). For each stage, ten organisms were sampled, weighted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C before being used for Vg measurement.

### 2.4. Impact of environmental factors on Vg levels in *G. fossarum* males

To assess the natural variability of Vg levels in males of this species, gammarids were caged for 21 days throughout four seasons, in two reference stations located upstream of two river catchments, the Bourbre river and Ardières river, already extensively studied in our previous work focusing on a similar scientific question (Lacaze et al., 2011b; Xuereb et al., 2009). These two rivers have identical temperature profiles with strong variations throughout the year (Lacaze et al., 2011b), but they are characterized by low and medium annual mean hardness levels (33 and 287 mg L<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub> for the Ardières and Bourbre rivers respectively; Table 1). For each season (December 2008 and April, July, and October 2009), four replicates of 20 adult males, with homogeneous mean weight (range from 18.3 to 21.6 mg for the different seasons and stations) were caged for 21 days and fed *ad libitum* with alder leaves. For this, organisms were placed in polypropylene cylinders (diameter 5 cm, length 10 cm) closed with net (mesh size: 1 mm) at either end to guarantee free circulation of water. The cylinders were placed in a perforated box to protect them against the entry of foreign objects. After exposure, organisms were counted (for survival rate

assessment), weighted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until Vg quantification.

### 2.5. Relevance of Vg level measurement in *G. fossarum* males for biomonitoring

We aimed to assess the relevance of Vg measurement in *G. fossarum* males in a large-scale survey. For this, we used data from a large-scale study assessing the chemical quality of 30 stations from the Rhône watershed (Besse et al., submitted). Threshold values (contamination level in *G. fossarum* above which concentration reveals a bioavailable contamination of test system), based on the use of well-described caging methods (control organisms exposed for 1 week), were proposed for seven metallic compounds and 29 organic compounds (polyaromatic hydrocarbons, PAHs; polychlorinated biphenyls, PCBs; pesticides such as the highly persistent DDT and its metabolites). Based on these threshold values, stations were classified as reference when none of the 36 compounds analyzed exceeded the threshold value and as impacted when at least one family of contaminants presented contamination levels in caged *G. fossarum* higher than the threshold values (Besse et al., submitted). We selected 21 of these stations: five as reference (R1–R5) and 16 as impacted (P1–P16). Apart from stations P1 and P6 (only metals), as well as P5 (only persistent organic pollutants), the rest of the stations were characterized by a wide range of chemical impregnation including at one time heavy metals, pesticides, and others persistent organic pollutants (*e.g.*, PAHs and PCBs). We performed 21-day *in situ* tests on each of the selected stations in June 2010 (Table 2). At each station, four replicates of 20 males, with mean weight ranging from 22 to 26 mg were deployed, following the methodology described in Section 2.4. After exposure, organisms were quickly taken to the laboratory in coolers with field water, and then weighted, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C before being used for Vg measurements.

### 2.6. Vg quantification in *G. fossarum* males

#### 2.6.1. Extraction

Whole-body weighed males were homogenized in a 1/25 ratio (weight/volume) of icecold Tris buffer (TRIS 50 mM; 100 mM NaCl; 0.01 mM EDTA) adjusted to pH 7.8 plus 10 g each of leupeptin and aprotinin per liter of buffer in a 2 mL tube placed in a FastPrep-24 ball mill (M.P. Biomedicals®, USA) at 4.5 m s<sup>-1</sup>. Homogenates were centrifuged at 10,000 × g at 4 °C for 15 min. Subsequently, 250 µL of clear supernatant was collected and delipidated by adding 750 µL of ethanol mixed with ether (1/1 ratio, volume/volume). The samples were vortexed and placed on ice for 10 min. Samples were then centrifuged at 10,000 × g at 4 °C for 10 min. All the supernatant was removed and thrown out. The bottom was kept and mixed with 250 µL of Tris buffer.

#### 2.6.2. Enzymatic digestion

Subsequently, 3 mL of AMBIC 50 mM and DTT at a final concentration of 15 mM were added to the samples (*i.e.*, bottom mixed with Tris buffer). Then, samples were incubated for 40 min at 60 °C. After cooling to room temperature, IAM (final concentration of 15 mM) was added and samples were placed in the dark at room temperature for 40 min. We then added 300 µg of trypsin mixed in 50 mM AMBIC and samples were incubated for 4 h at 37 °C. Then, a similar second cycle of DTT (final concentration of 15 mM), IAM (final concentration of 15 mM), and trypsin (300 µg) was successively added and samples were finally incubated for 20 h at 37 °C. To stop the reaction, 10 µL of FA was added.

Next, 100 µL of standard labeled (ILIPGV\*GK) at 1 pg µL<sup>-1</sup> was added to the male samples. Standard-labeled stock was prepared independently by dissolving accurately weighed standard

**Table 1**

General information on two reference stations on Ardières (Les Ardillats) and Bourbre (Tour du Pin) rivers in December 2008, April 2009, July 2009, and October 2009.

Season	Station River, Location	GPS coordinates	Water temperature (°C)	pH	Hardness (mg L <sup>-1</sup> of CaCO <sub>3</sub> )
December 2008	Ardières, Les Ardillats	04°31'15.9"E 46°11'11.8"N	7.2	na	31
	Bourbre, La Tour du Pin	45°56'94.35"E 05°45'91.37"N	7.6	na	273
April 2009	Ardières, Les Ardillats		12.0	7.3	35
	Bourbre, La Tour du Pin		15.2	7.8	293
July 2009	Ardières, Les Ardillats		15.1	7.6	34
	Bourbre, La Tour du Pin		18.6	7.8	300
October 2009	Ardières, Les Ardillats		8.5	7.5	32
	Bourbre, La Tour du Pin		9.0	8.0	285

compounds in water mixed with acetonitrile (95/5, v/v) and containing 0.1% of formic acid to finally yield a concentration of 100 g mL<sup>-1</sup>. Both stock solutions were diluted further with the water/acetonitrile mixture with 0.1% of formic acid to prepare the working solution and spike it in samples just after enzymatic digestion.

### 2.6.3. Purification and reconcentration

Next, 3 mL of digested male samples was purified and concentrated on a solid phase extraction (SPE) column (Oasis HLB column

3 cm<sup>3</sup>/30 mg from Waters<sup>®</sup>, USA). The SPE column was conditioned by adding successively 1 mL of methanol and 1 mL of acidified water (0.5% FA). After adding 3 mL of digested samples, the SPE column was washed by adding 1 mL of water:methanol mixture (95/5, v/v) acidified with 0.5% FA. Finally, the SPE column was eluted by adding 1 mL of water:methanol mixture (20/80, v/v) acidified with 0.5% FA. Eluted samples (i.e., final volume: 1 mL) were evaporated in a SpeedVac concentrator (Thermo scientific<sup>®</sup> Savant, USA) to obtain a volume of 100 µL (adjusted with acidified water, 0.1% FA). The tubes were then vortexed for several seconds and male samples

**Table 2**General information on 21 *in situ* deployments in reference (R) or polluted (P) stations in the Rhône-Alpes region during June 2010.

Station River, Location	GPS coordinates	National grid reference	Deployment number	Survival (%)	Water temperature (°C)	pH	Hardness (mg L <sup>-1</sup> of CaCO <sub>3</sub> )
Mandorne, Oncieux	05°28'23.7"E 45°58'36.1"N	6069650	R1	90	10.9	8.2	238
Varèze, Cours et Buis	04°58'52.0"E 45°26'15.3"N	6820073	R2	95	14.0	7.9	168
Drevenne, Rovon	05°27'55.5"E 45°12'11.6"N	6147220	R3	90	13.9	8.2	242
Guiers Mort, Saint Laurent du Pont	05°45'17.4"E 45°21'42.2"N	6078200	R4	91	9.2	8.4	156
Veyle, Lent	05°11'48.4"E 46°06'58.7"N	6048570	R5	95	15.6	7.9	167
Doux, Saint Jean de Muzols	04°49'39.5"E 45°04'40.2"N	6106030	P1	55	18.0	7.1	20
Doux, Labatie d'Andaure	04°29'41.5"E 45°01'23.6"N	6105568	P2	81	13.4	7.2	<14
Cance, Saint Julien Vocance	04°30'11.9"E 45°10'39.5"N	6101905	P3	79	13.4	6.8	21
Gier, La Valla en Gier	04°30'36.4"E 45°26'36.3"N	6820138	P4	82	13.1	6.9	21
Veyle, Servas	05°10'31.3"E 46°07'37.9"N	6049550	P5	81	17.3	8.1	154
Galavayson, Saint Clair sur Galaure	05°07'50.3"E 45°15'26.5"N	6104900	P6	89	14.4	7.7	55
Drac, Fontaine	05°42'04.3"E 45°11'36.6"N	6146500	P7	93	11.8	7.9	118
Turdine, Arbresle	04°36'09.1"E 45°50'15.5"N	6057200	P8	90	17.2	8.3	116
Azergues, Legny	04°34'21.4"E 45°54'24.6"N	6800009	P9	86	15.3	8.1	99
Azergues, Lucenay	04°43'33.1"E 45°54'41.5"N	6057700	P10	90	18.2	8.1	151
Gier, Givors	04°45'42.3"E 45°35'15.4"N	6097000	P11	79	17.8	7.4	75
Rhône, Givors	04°47'03.4"E 45°35'36.4"N	na	P12	93	17.4	7.6	180
Bourbre, Pont de Cheruy	05°10'29.9"E 45°04'00.3"N	na	P13	90	16.6	7.6	331
Ergues, Poules les Echarmeaux	04°26'45.5"E 46°08'21.2"N	6053830	P14	81	14.2	7.7	28
Saône, Ile Barbe	04°49'57.3"E 45°47'49.4"N	6059500	P15	95	20.5	7.8	218
Ardières, Saint Jean d'Ardières	04°44'00.9"E 46°07'18.4"N	6051550	P16	93	17.0	8.5	53

were transferred to glass autosampler vials for LC–MS/MS Vg quantification.

#### 2.6.4. Quantification

LC–MS/MS was performed with a system comprising an HP1290 series HPLC device (Agilent Technologies®, Germany) coupled to a QTRAP 5500 LC–MS/MS System hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex®, USA) equipped with a TurboV Ionspray source. For instrument control, data acquisition, and processing, the Analyst 1.5 software was used. LC separation of the 10- $\mu$ L injected sample was carried out on a Symmetry C18 column (100 mm  $\times$  2.1 mm, particle size 3.5  $\mu$ m) from Waters. Elution was performed at a flow rate of 300  $\mu$ L min<sup>-1</sup> with water containing 0.1% formic acid as eluent A and acetonitrile containing 0.1% formic acid as eluent B, employing a linear gradient from 5% B to 13% B in 20 min. The column was washed for 5 min with 95% B and re-equilibrated for 5 min. The injection duty cycle was 30 min, taking into account the column equilibration time. The mass spectrometer was initially tuned and calibrated using polypropylene glycol, Reserpine, and Agilent Tuning Mix from AB Sciex according to the manufacturer's instructions. Q1 resolution was adjusted to  $0.7 \pm 0.1$  amu. FWHM, referred to as unit resolution. Q3 was also set to unit resolution in MRM mode. MS analysis was carried out in positive ionization mode using an ion spray voltage of 5500 V. The nebulizer and the curtain gas flows were set at 40 psi using nitrogen. The TurboV Ionspray source was set at 450 °C with the auxiliary gas flow (nitrogen) set at 40 psi. From the initial set of candidate SRM transitions, transitions tracking peptide ILIPGVGK (i.e., 398.8/457.3; 398.8/570.4) were selected for the assay. The collision energies (20 and 17 eV), declustering potential (60 V), and collision cell exit potentials (13 and 17 V) were optimized for each SRM transition chosen. The SRM transitions were monitored and acquired at unit resolution in Q1 and Q3, with a dwell time of 100 ms used for each transition, to obtain between 25 and 30 data points per chromatographic peak. The two tracked ILIPGVGK transitions are highly correlated and so the 398.8/457.3 ILIPGVGK transition was selected for data processing and analysis.

Data were expressed in pmol of ILIPGVGK peptide/milligram of wet weight (pmol of Vg/mg), and for convenience "ILIPGVGK peptide" is called "Vg" in this paper. The limit of quantification (LOQ) was 0.006 pmol of Vg/mg.

#### 2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was done with the R software (R Development Core Team, 2008). For all experiments, nonparametric analyses were performed (Kruskal–Wallis rank sum tests, Mann–Whitney tests).

### 3. Results

#### 3.1. Spermatogenesis status impact on Vg levels in *G. fossarum* males

Fig. 1 shows the Vg levels for the different spermatogenesis stages tested in males. In all cases, no significant difference was observed between tested conditions (Kruskal–Wallis rank sum test,  $p > 0.05$ ), with values ranging from 0.01 to 0.274 pmol of Vg/mg. Mean Vg levels observed in gammarids with different spermatogenesis status were similar, with values of 0.044 for D – 1, 0.037 for D0, and 0.045 pmol/mg for D7. However, it is noteworthy that a high intra-individual variability was observed.

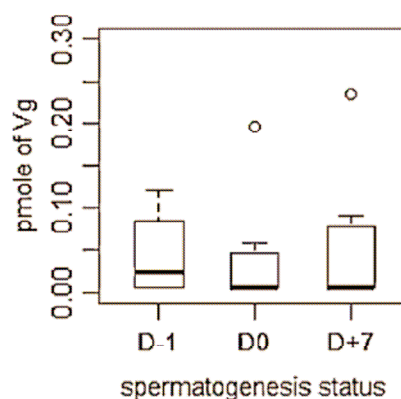


Fig. 1. Levels of Vg (expressed in pmol/mg) quantified in *G. fossarum* males during spermatogenesis. "Day – 1": less than 24 h before egg fertilization; "Day 0": 24 hours after egg fertilization; "Day +7": seven days after egg fertilization.  $n = 10$ . Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the whiskers extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles.

#### 3.2. Spatial and seasonal variability of Vg levels in caged *G. fossarum*

Fig. 2 presents the Vg levels quantified in adult male gammarids caged for 21 days in two reference stations, characterized by similar but strong seasonal temperature changes and different water hardness (Ardières and Bourbre rivers) (Table 1). The survival rate was above 90% for each condition (data not shown). A strong temporal change of Vg levels was observed both in Ardieres and Bourbre rivers (Kruskal–Wallis rank sum test,  $p < 0.05$ ), with a significant induction of Vg production in organisms exposed to the Ardieres and Bourbre rivers in April and to the Ardieres river in July (Mann–Whitney test,  $p < 0.05$  with Bonferroni correction). In contrast, spatial difference was weak, with a significant difference only observed between the two stations in July (Mann–Whitney test,  $p < 0.05$ ). Therefore the result that no significant difference was observed in December, and October, months where no Vg inductions were obtained, but also in April, show that the hardness levels of water had no impact.

#### 3.3. Vg levels in caged *G. fossarum* exposed to reference and impacted stations in a large-scale field experiment

The survival rate was above 90% for reference stations and above 80% for polluted stations, except for P1 (55%), P3, and P11 (79%) (Table 2). Fig. 3 presents the Vg levels quantified in adult male gammarids exposed to the different stations studied in the Rhône watershed. No significant differences (Kruskal–Wallis rank sum test,  $p > 0.05$ ) were observed for the reference stations, with values ranging from 0.01 to 1.03 pmol Vg/mg. However, significant differences were observed between impacted and reference stations. Organisms caged in P10 and P11 stations presented Vg levels significantly different (Mann–Whitney test,  $p = 0.003$  and  $p = 0.011$ , respectively) than the ones observed for organisms exposed to reference stations. As discussed in Section 3.2, high inter-individual variability was observed in the Vg levels of organisms exposed to either reference and impacted stations.

### 4. Discussion

#### 4.1. Intrinsic variability of Vg levels in male *G. fossarum*

In invertebrates (e.g., bivalve molluscs and decapod crustaceans), Vg assays can be performed on specific tissues,

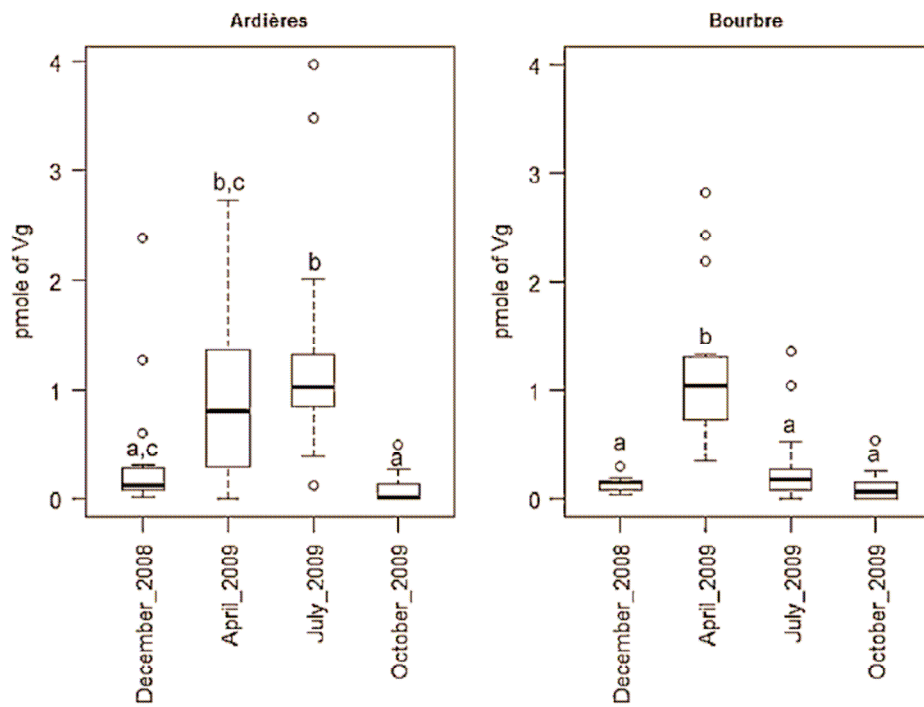


Fig. 2. Levels of Vg (expressed in pmol/mg) quantified in *G. fossarum* males during four *in situ* deployments in the Ardières and Bourbre reference stations (December 2008, April 2009, July 2009, October 2009). Same conventions as Fig. 1. Similar letters indicate no difference between boxplots (Mann–Whitney with Bonferroni correction  $p > 0.05$ ),  $n = 10$ .

particularly the hemolymph, gonad, and digestive gland (Matozzo et al., 2008). However, in crustaceans that are currently frequently used in ecotoxicology such as daphnids, amphipods, copepods, or mysids, the dissection of specific tissue is impractical and the large-scale use of this biomarker as a reliable and simple measurement is not conceivable. Consequently, in our study, we chose to measure Vg levels on whole-body male *G. fossarum*, using the method developed and described by Simon et al. (2010).

In order to limit the intrinsic variability of Vg measurement and thus increase its reproducibility and sensitivity, the impact of a biotic factor (the spermatogenesis status) on the Vg level was investigated. Lacaze et al. (2011b) showed that the spermatogenesis status could greatly influence the sensitivity of the comet assay for DNA damage assessment using sperm. Under identical contamination exposure, they observed that DNA damage is three times higher when test organisms are of sexually mature status

(spermatogenesis finished) than when they are in spermatogenesis. In the present study, results showed that the spermatogenesis status did not induce significant Vg level changes. Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville (2010) showed that Vg levels in native male mussels (*Mytilus galloprovincialis*) measured by ALP method were not correlated with gonado-somatic index. Deng et al. (2007) found similar results in the fish *Pleuronichthys verticalis* for which the Vg levels in plasma did not significantly change during testicular development. To our knowledge, no data are available in the literature on the effects of these biotic factors in other invertebrate species in order to compare with the present results.

Comparing the results with our previous laboratory study in control *G. fossarum* males (Jubeaux et al., 2012), Vg levels observed for the present study in the laboratory were similar, with a mean value of  $0.04 \pm 0.058$  (spermatogenesis status experiment) versus a value of  $0.04 \pm 0.07$  pmol of Vg/mg (previous study). In the same

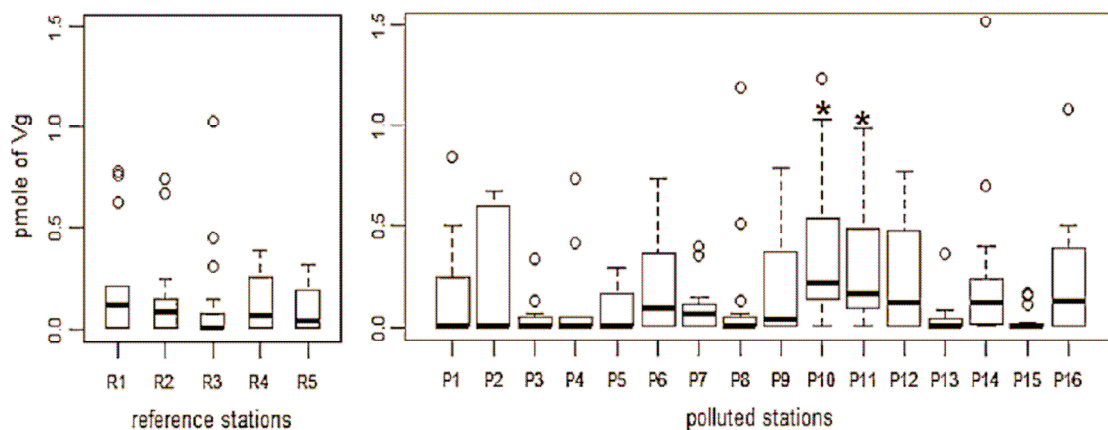


Fig. 3. Levels of Vg (expressed in pmol/mg) quantified in *G. fossarum* males during the *in situ* deployments in reference and polluted stations (June 2010). Same conventions as Fig. 1. Stars indicate significant difference between the reference stations and a polluted station (Mann–Whitney,  $p < 0.05$ ),  $n = 15$ .

way, in this previous study a high interindividual variability of Vg levels was recorded in control organisms.

#### 4.2. Natural variability of Vg levels in caged *G. fossarum*

To use biomarkers that correctly reflect adverse biological responses to anthropogenic contamination in the field, it is necessary to be aware of natural temporal and spatial factors that could affect these biomarkers. In the literature, more and more studies have focused on the assessment of the natural variability of biomarkers in relation to environmental factors (Leinio and Lehtonen, 2005; Pisanelli et al., 2009). Establishing the variability of response is a useful preliminary step in the development of an accurate biomarker to determine a baseline level as the reference value, making it possible to compare experimental stations in time and space, without requiring *a priori* reference stations (Coulaud et al., 2011; Lacaze et al., 2011b; Xuereb et al., 2009).

In the present study, large differences in Vg levels were observed in male gammarids caged (21 days) seasonally for both the Ardières and the Bourbre rivers, showing a seasonal marked impact on the basal level of this protein. In all cases, lower Vg levels were observed in winter (December) and in autumn (October), with values of the same order as those observed for laboratory experiments (Section 4.1; Jubeaux et al., 2012), meaning that watershed characteristics such as the hardness of water had negligible influence on Vg production in males of this species. Conversely, these results showed that levels of Vg in caged organisms changed according to the date of the experiment, with significant inductions occurring in spring and summer. However, temperature does not seem to be the only factor explaining these observations from data obtained in July. In the same way, results showed that Vg levels observed in caged organisms in the Ardières river in April, at a water temperature of 12 °C corresponding to the acclimation temperature in our laboratory, were significantly higher than the ones observed in males as described in Section 4.1. These observations support the idea that temperature is not the factor explaining these Vg variations. According to observations by Xuereb et al. (2011) on the Vg mRNA levels in male *G. fossarum*, in a caged group of gammarids displaying an induction (spring and summer), a high heterogeneity was observed and only some organisms presented high Vg levels. There are no data available in the literature on the impact of the season or temperature on Vg levels in males of other crustaceans species. Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville (2010) measured Vg levels in native male mussels collected for a period of 15 months and the results indicated that Vg fluctuations were not correlated with environmental factors like water temperature. Besides, Ciocan et al. (2010) and Blaise et al. (1999) found seasonal variations of Vg mRNA expression and protein production (determined using the ALP method) in *Mytilus edulis* and *Mya arenaria*, respectively. However, these data were obtained in female organisms, and therefore the Vg changes observed could reflect the reproductive cycle. More information and data are available in male fish (Deng et al., 2007; Hotta et al., 2003; Ma et al., 2005; Solé et al., 2002). A seasonal trend has been observed in the fish *Cyprinus carpio* and *Tribolodon hakonensis*, while conversely no impact has been observed in *P. verticalis*. According to the results of the present study, these works illustrated that natural variability of Vg levels in male fish cannot be directly related to the water temperature or photoperiod (Hotta et al., 2003).

The results of the present study, as well as data from the literature, show that the factors responsible for the temporal variability of Vg levels in male organisms are not well known and that further studies are needed before an accurate and robust biomarker of ED exposure can be proposed. Among the different hypotheses that can be made, several authors recently underlined the pleiotropic functions of Vg, indicating a non-exclusive role in reproduction both in

vertebrates and invertebrates (summarized in Zhang et al., 2011). Indeed, recent insight into Vg functions includes a role in oxidative stress and host immune defenses. In *D. magna* and *Artemia parthenogenetica*, the Vg gene contains a superoxide dismutase-like domain suggesting a potential antioxidant activity, although this is yet to be confirmed (Chen et al., 2011; Kato et al., 2004; Tokishita et al., 2006). In the same way, Seehuus et al. (2006) and Nakamura et al. (1999) found that Vg-like proteins have an antioxidant function in the insect *Apis mellifera* and the nematode *Caenorhabditis elegans*, respectively. Concerning the host immune defense, Vg was found to have hemagglutinating and/or antimicrobial activities in many species including insects (Rono et al., 2010), amphioxus (Zhang et al., 2005), and fish (Garcia et al., 2010; Li et al., 2008; Liu et al., 2011, 2009; Shi et al., 2006; Tong et al., 2010). Moreover, the conserved Vg C-terminal domain (von Willebrand domain, vWD) found in many metazoa (Avarre et al., 2007) is known to be involved in the blood-clotting cascade of vertebrates (Finn, 2007). These results indicate that Vg is an immune-relevant molecule involved in the defense of the host against microbes including bacteria and viruses (Zhang et al., 2011). These multiple biological functions of Vg may partially explain the high interindividual variability observed and may greatly complicate its use as a specific biomarker of ED exposure in male organisms, particularly for field monitoring.

#### 4.3. Vg levels in caged *G. fossarum* as sensitive biomarker for monitoring ED

Today, a strong limit in the development of specific biomarkers of ED exposure in male invertebrates is the lack of knowledge and limited availability of compounds that specifically disturb endocrine systems in crustaceans (except for a few insecticides). This greatly complicates the choice of stations with a well-known contamination typology in order to validate the relevance of Vg measurement as a sensitive tool for field monitoring. For the last part of this work, we took advantage of a large-scale study on the chemical quality of 30 stations in the Rhône watershed (Besse et al., submitted) from which we chose five reference stations (R1–R5) and 16 impacted stations (P1–P16), with different contamination profiles (see Supplementary Table 1). P2 and P4 stations were characterized by a metallic contamination, P3, P8, and P11 were mainly impacted by organic compounds (PAH and PCB), P7 by pesticide contamination, and other stations were characterized by multi-contamination. Among impacted stations, we previously showed significant feeding rate inhibitions for P1, P5, P7–P9, P11, P12, P15, and P16 stations, confirming a deterioration in the chemical quality, and toxicity of these systems (Coulaud et al., 2011). In June 2010, male organisms were caged in each of the selected stations for 21 days. Temperatures recorded at each station ranged from 9 to 18 °C, *i.e.*, similar to those observed in the two reference rivers (Ardières and Bourbre) for the seasonal monitoring. No significant difference was observed between reference stations, with values similar to those obtained from field surveys in the Ardières and Bourbre rivers, showing again a strong interindividual variability. Similar observations were obtained for impacted stations, with a high interindividual variability. A significant induction of Vg production was observed for two contaminated stations (P10 and P11), in comparison to Vg levels obtained in reference stations. However, these results highlight the fact that induction factors observed for these two stations were much lower (about 10) than those currently observed in male fish exposed to mimetic estrogen compounds (Sumpter and Jobling, 1995). There are only a few studies available in the literature on the use of Vg levels as a specific ED biomarker in crustaceans. However, Xuereb et al. (2011) also showed significant inductions of Vg mRNA levels in male *G. fossarum* exposed to anthropogenic contamination, but also with low induction



factors. In *Carcinus maenas* and in *Carcinus aestuarii*, Lye et al. (2005) and Ricciardi et al. (2010), respectively, showed a significant difference of Vg levels in organisms collected from various locations, but no relationship could be established with the contamination levels of the systems studied. Finally, Zapata-Perez et al. (2005) did not observe any Vg level differences in indigenous *Litopenaeus setiferus* males collected from stations heavily contaminated or not by organic and inorganic compounds. According to these results, and compared to data obtained from fish, to our knowledge no marked inductions of Vg levels were observed in crustaceans after ED exposure in the laboratory to environmentally relevant levels of contamination.

See Supplementary Table 1 as supplementary file. Supplementary material related to this article found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.05.007>.

#### 4.4. In situ usefulness of Vg measurement in *G. fossarum* males?

*G. fossarum* is a species that is relevant for ecological and ecotoxicological studies. Specific and accurate methods for the measurement of Vg gene expression and Vg production have been developed and validated in this species (Jubeaux et al., 2012; Xuereb et al., 2011). As suspected, a strong *sex-specific* difference of Vg transcript and protein levels was observed, although the expression of the Vg gene was not completely absent in males. Indeed, Xuereb et al. (2011) recorded between 200- and 700-fold lower Vg mRNA levels, while Jubeaux et al. (2012) recorded between 20- and 1000-fold lower Vg protein in males compared to sexually active females. These works in *G. fossarum* confirmed the expected reproductive function of Vg and validated the methodologies, both real-time PCR and mass spectrometry-based assay, as specific tools for Vg mRNA and protein quantification. From an ecotoxicological perspective, few studies have focused on validating the functional role of a gene or a protein before proposing it as a biomarker, leading to surprising data such as no intersex difference of Vg levels in control organisms, e.g., in the bivalves *M. edulis* (Aarab et al., 2004; Ciocan et al., 2010; Puinean et al., 2006) and *Dreissena polymorpha* (Quinn et al., 2006).

In the context of field biomonitoring, it is essential to know the natural variability of a biomarker in relation to intrinsic biotic and environmental factors. The present study showed that Vg levels in male organisms are not influenced by biotic factors such as spermatogenesis status. Conversely, we recorded that unknown environmental factors greatly influence the Vg levels of male organisms, leading to a low robustness and sensitivity of the Vg measurement and limiting its use as a tool for field monitoring. These observations were confirmed by our results obtained in a large-scale field study, since the high Vg variability observed for reference stations highlights the significant inductions observed in only two of 16 contaminated stations studied. In addition and in comparison with observations made in vertebrates, the Vg inductions observed in the impacted stations were very low with a maximal factor of 15. Therefore, and in accordance to conclusions drawn by Hannas et al. (2011), these results show that it is difficult to propose Vg measurement in *G. fossarum* as a specific ED biomarker. These observations are corroborated by various recent papers showing that this protein may be involved in many other physiological functions (Zhang et al., 2011). As recently underlined by Ford (2012), to date there are few studies able to link chemical exposure with Vg induction in the field monitoring context. In this way, Ford (2008) suggested that it is essentially quite difficult to feminize a male crustacean without some prior de-masculinization (due to the overriding effects of androgenic gland) and concluded “in determining whether endocrine disrupting chemicals may be impacting the sexual chemistry of male crustaceans it might be more fruitful, especially when attempting to design

early-warning biomarkers of exposure (and effect), to address the question of de-masculinisation, rather than feminisation.” One approach might be to characterize the androgenic gland hormone in *G. fossarum* and to assess whether its level can be disturbed by chemical compounds and thus propose it as a biomarker of endocrine disturbance.

## 5. Conclusion

The aim of this study was to gain better knowledge of whole-body Vg basal levels in male *G. fossarum* to avoid misinterpretation of this biomarker as a specific response of endocrine disruption. The results showed that the variations of Vg levels in males were not related to intrinsic biotic factors (here reproductive status), but mainly related to environmental factors having a strong impact in this species and render use of this biomarker difficult in biomonitoring programs today. Because of the strong interindividual variability observed in several stations, some other confounding factors should be taken into consideration in further work on Vg measurements in male gammarids. Moreover, the recent identification of the pleiotropic functions of the Vg gene in some species may complicate the measurement of this protein in assessments of ED exposure. Moreover, considering the prior de-masculinization in crustaceans, a suitable approach could be to characterize the androgenic gland hormone in order to use its level as a biomarker of endocrine disruption in males.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the French National Research Program on Endocrine Disruptor PNRPE (Convention no. CV05000088 and Convention no. 0006942) and the Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques ONEMA for financial support.

## References

- Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P.D., Larsen, B.K., Andersen, O.K., Narbonne, J.F., 2004. Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Marine Environment Research* 58, 437–441.
- Andersen, H.R., Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B., Kusk, K.O., 2001. Development of copepod nauplii to copepodites – a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2821–2829.
- Avarre, J.C., Lubzens, E., Babin, P.J., 2007. Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evolutionary Biology* 7.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environmental Toxicology* 14, 455–465.
- Brooks, S., Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1997. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 387–416.
- Charniaux-Cotton, H., 1954. Discovery in an amphipod crustacean (*Orchestia gammarella*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. [Découverte chez un crustacé amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation de caractères sexuels primaires et secondaires mâles.] *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* 239, 780–782.
- Chen, S., Chen, D.F., Yang, F., Nagasawa, H., Yang, W.J., 2011. Characterization and processing of superoxide dismutase-fused vitellogenin in the diapause embryo formation: a special developmental pathway in the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*. *Biology of Reproduction* 85, 31–41.
- Ciocan, C.M., Cubero-Leon, E., Puinean, A.M., Hill, E.M., Minier, C., Osada, M., Fenlon, K., Rotchell, J.M., 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environmental Pollution* 158, 2977–2984.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A., 2011. *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45, 6417–6429.
- Dedouge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: an *in situ* experiment. *Chemosphere* 77, 1569–1576.
- deFur, P., Crane, M., Ingersoll, C., Tattersfield, L., 1999. *Endocrine Disruption in Invertebrates: Endocrinology, Testing and Assessment*. SETAC Press, Pensacola.

- deFur, P.L., 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing. *The ILAR Journal* 45, 484–493.
- Deng, X., Rempel, M.A., Armstrong, J., Schlenk, D., 2007. Seasonal evaluation of reproductive status and exposure to environmental estrogens in hornyhead turbot at the municipal wastewater outfall of Orange County, CA. *Environmental Toxicology* 22, 464–471.
- Felten, V., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aujoulat, F., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology* 147, 189–197.
- Finn, R.N., 2007. Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosphatins and other subdomains in vitellogenins. *Biology of Reproduction* 76, 926–935.
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J., Guillette Jr., L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives* 104, 1096–1101.
- Ford, A.T., 2008. Can you feminize a crustacean? *Aquatic Toxicology* 88, 316–321.
- Ford, A.T., 2012. Intersexuality in Crustacea: an environmental issue? *Aquatic Toxicology* 108, 125–129.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., 2005. Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus sp.* collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada. *Environmental Research* 98, 89–99.
- García, J., Munro, E.S., Monte, M.M., Fourrier, M.C.S., Whitelaw, J., Smail, D.A., Ellis, A.E., 2010. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) serum vitellogenin neutralises infectivity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish and Shellfish Immunology* 29, 293–297.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagiatti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2249–2259.
- Ghekiere, A., Verslycke, T., Janssen, C., 2006. Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*. *General and Comparative Endocrinology* 147, 190–195.
- Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. *Ecotoxicology* 12, 331–343.
- Hannas, B.R., Wang, Y.H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H., LeBlanc, G.A., 2011. Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*). *Aquatic Toxicology* 101, 351–357.
- Hayward, A., Takahashi, T., Bendena, W.G., Tobe, S.S., Hui, J.H.L., 2010. Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans. *FEBS Letters* 584, 1273–1278.
- Hotta, K., Watanabe, T., Kishida, C., Nakamura, Y., Ohkubo, N., Matsubara, T., Adachi, S., Yamauchi, K., 2003. Seasonality of serum levels of vitellogenin in male Japanese whiting *Sillago japonica*, reared under natural temperature and photoperiod. *Fisheries Science* 69, 555–562.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biology of Reproduction* 66, 272–281.
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O., 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology* 112–113, 72–82.
- Kato, Y., Tokishita, S., Ohta, T., Yamagata, H., 2004. A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Gene* 334, 157–165.
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus spp.* in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology* 205, 1–76.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011a. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159, 1682–1691.
- Lacaze, E., Devaux, A., Jubeaux, G., Mons, R., Gardette, M., Bony, S., Garric, J., Geffard, O., 2011b. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level. *Science of the Total Environment* 409, 3230–3236.
- Lacaze, E., 2011. Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum*: développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel, Thèse de l'Université de Metz.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research* 700, 32–38.
- LeBlanc, G.A., 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology* 16, 61–81.
- Lee, K.W., Hwang, D.S., Rhee, J.S., Ki, J.S., Park, H.G., Ryu, J.C., Raisuddin, S., Lee, J.S., 2008. Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry* 150, 395–402.
- Lee, R.F., Noone, T., 1995. Effect of reproductive toxicants on lipovitellin in female blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Marine Environment Research* 39, 151–154.
- Leinio, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea. *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology* 140, 408–421.
- Li, Z., Zhang, S., Liu, Q., 2008. Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity. *PLoS ONE* 3.
- Liu, M., Pan, J., Ji, H., Zhao, B., Zhang, S., 2011. Vitellogenin mediates phagocytosis through interaction with FcγR. *Molecular Immunology* 49, 211–218.
- Liu, Q.H., Zhang, S.C., Li, Z.J., Gao, C.R., 2009. Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*). *Immunobiology* 214, 257–267.
- Lye, C.M., Bentley, M.G., Clare, A.S., Sefton, E.M., 2005. Endocrine disruption in the shore crab *Carcinus maenas* – a biomarker for benthic marine invertebrates? *Marine Ecology Progress Series* 288, 221–232.
- Lye, C.M., Bentley, M.G., Galloway, T., 2008. Effects of 4-nonylphenol on the endocrine system of the shore crab, *Carcinus maenas*. *Environmental Toxicology* 23, 309–318.
- Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., McCormick, D., 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Marine Pollution Bulletin* 34, 34–41.
- Ma, Y.X., Matsuda, K., Uchiyama, M., 2005. Seasonal variations in plasma concentrations of sex steroid hormones and vitellogenin in wild male Japanese dace (*Tribolodon hakonensis*) collected from different sites of the Jinzu River basin. *Zoological Science* 22, 861–868.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environment International* 34, 531–545.
- Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N., Goto, S., 1999. Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 580–583.
- Nikinmaa, M., Rytönen, K.T., 2011. Functional genomics in aquatic toxicology—do not forget the function. *Aquatic Toxicology* 105S, 16–24.
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2004. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *International Review of Cytology* 236, 1–44.
- Okumura, T., Aida, K., 2000. Hemolymph vitellogenin levels and ovarian development during the reproductive and non reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Science* 66, 678–685.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2010. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicology and Environment Safety* 73, 693–701.
- Pisanelli, B., Benedetti, M., Fattorini, D., Regoli, F., 2009. Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: a possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers. *Chemosphere* 77, 1551–1557.
- Puineau, A.M., Labadie, P., Hill, E.M., Osada, M., Kishida, M., Nakao, R., Novillo, A., Callard, I.P., Rotchell, J.M., 2006. Laboratory exposure to 17β-estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology* 79, 376–383.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., Costello, M.J., Wilson, J.G., Mothersill, C., 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology* 142, 118–127.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J., Mothersill, C., 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology* 66, 279–292.
- R Development Core Team, 2008. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., Binelli, A., Marin, M.G., 2010. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: an integrated approach in biomonitoring estuarine environments. *Water Research* 44, 1725–1736.
- Rono, M.K., Whitten, M.M.A., Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E.A., Marois, E., 2010. The major yolk protein vitellogenin interferes with the anti-plasmodium response in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology* 8.
- Sanders, M.B., Billingham, Z., Depledge, M.H., Clare, A.S., 2005. Larval development and vitellin-like protein expression in *Palaemon elegans* larvae following xenooestrogen exposure. *Integrative and Comparative Biology* 45, 51–60.
- Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V., 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 962–967.
- Shi, X., Zhang, S., Pang, Q., 2006. Vitellogenin is a novel player in defense reactions. *Fish and Shellfish Immunology* 20, 769–772.
- Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O., Salvador, A., 2010. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *Journal of Chromatography A* 1217, 5109–5115.
- Smolenaers, M.M.W., Madsen, O., Rodenburg, K.W., Van Der Horst, D.J., 2007. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *Journal of Lipid Research* 48, 489–502.
- Solé, M., Barceló, D., Porte, C., 2002. Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants. *Aquatic Toxicology* 60, 233–248.

- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103, 173–178.
- Tatarazako, N., Takao, Y., Kishi, K., Onikura, N., Arizono, K., Iguchi, T., 2002. Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnid (*Ceriodaphnia dubia*). *Chemosphere* 48, 597–601.
- Tokishita, S., Kato, Y., Kobayashi, T., Nakamura, S., Ohta, T., Yamagata, H., 2006. Organization and repression by juvenile hormone of a vitellogenin gene cluster in the crustacean, *Daphnia magna*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 345, 362–370.
- Tong, Z., Li, L., Pawar, R., Zhang, S., 2010. Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities. *Immunobiology* 215, 898–902.
- Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6, 287–318.
- Ventura, T., Rosen, O., Sagi, A., 2011. From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. *General and Comparative Endocrinology* 173, 381–388.
- Xuereb, B., Bezin, L., Chaumot, A., Budzinski, H., Augagneur, S., Tutundjian, R., Garric, J., Geffard, O., 2011. Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicology*, 1–14.
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., Geffard, O., 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology* 93, 225–233.
- Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J., Geffard, O., 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 236, 178–189.
- Zapata-Perez, O., Del-Rio, M., Dominguez, J., Chan, R., Ceja, V., Gold-Bouchot, G., 2005. Preliminary studies of biochemical changes (ethoxycoumarin O-deethylase activities and vitellogenin induction) in two species of shrimp (*Farfantepenaeus duorarum* and *Litopenaeus setiferus*) from the Gulf of Mexico. *Ecotoxicology and Environment Safety* 61, 98–104.
- Zhang, S., Sun, Y., Pang, Q., Shi, X., 2005. Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin. *Fish and Shellfish Immunology* 19, 93–95.
- Zhang, S., Wang, S., Li, H., Li, L., 2011. Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 43, 303–305.

Suppl. Table 1. General information of bioaccumulation levels in *G. fossarum* males for heavy metals, pesticides, and persistent organic pollutants in 21 *in situ* deployments in reference (R) or polluted (P) stations in the Rhône-Alpes region during June 2010. Red cells indicate measured concentrations in gammarids strictly superior to threshold values expressed in  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  for metals and  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  for organic contaminants). Ni: nickel; Cd: cadmium; Pb: lead; Hg: mercury; DDE: dichlorodiphenyldichloroethylene; DDD: dichlorodiphenyldichloroethane; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane; PBDE: polybromodiphenylether; PCB: polychlorinated biphenyl.

Compounds	R1	R2	R3	R4	R5	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16
Ni	0.33	0.26	<LQ	0.50	0.37	0.48	0.53	1.28	0.43	0.34	<LQ	0.88	0.45	<LQ	<LQ	1.01	0.69	0.58	0.45	0.40	0.36
Cd	0.15	0.17	0.23	0.22	0.19	0.45	0.83	1.31	1.27	0.12	0.23	0.28	0.24	0.30	0.91	0.21	0.14	0.20	0.20	0.20	0.35
Pb	0.14	0.14	0.19	0.27	0.20	<LQ	<LQ	0.17	0.31	0.24	0.43	0.28	1.39	0.82	0.89	0.95	0.29	0.46	0.85	0.18	0.92
Hg	0.044	0.044	0.058	0.047	0.049	0.060	0.050	0.046	0.053	0.040	0.049	0.110	0.050	0.051	0.048	0.050	0.050	0.050	0.040	0.050	0.047
Hexachlorobenzene	0.5	0.2	0.3	0.4	0.2	0.2	0.4	0.3	0.3	0.3	0.2	40.1	0.3	0.1	0.2	0.2	0.6	0.2	0.9	0.6	0.5
Lindane	<LQ	<LQ	0.4	<LQ	0.06	0.3	0.3	0.06	0.2	0.4	<LQ	7.8	0.4	<LQ	0.4	1.4	<LQ	0.6	0.1	0.1	0.2
2, 4' DDE	0.1	<LQ	0.2	0.0	0.1	0.3	0.07	0.2	<LQ	0.6	<LQ	10.6	0.1	0.1	0.4	2.1	0.9	1.0	1.7	0.1	0.7
4, 4' DDE+Dieldrin	2.3	2.4	2.3	2.3	3.1	4.2	2.4	2.9	2.6	3.6	1.9	37.0	3.9	3.9	6.9	5.5	5.1	3.4	3.4	10.4	62.9
4, 4' DDD	2.0	2.3	2.4	2.1	3.0	1.4	2.0	1.9	1.9	1.8	1.6	44.6	3.4	2.9	4.3	6.3	5.2	3.3	3.7	5.9	24.3
2, 4' DDT	0.8	0.9	0.8	0.7	2.9	2.2	1.0	1.0	1.0	2.3	0.6	59.2	2.3	2.3	2.4	2.3	1.9	1.5	1.3	1.2	2.8
4, 4' DDT	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1.9	1.2	<LQ	<LQ	<LQ	1.7	<LQ	48.4	2.8	2.3	2.1	2.9	1.4	1.0	<LQ	<LQ	12.5
Anthracene	0.2	0.3	0.2	0.3	1.0	0.1	0.3	0.2	0.7	0.2	0.2	0.1	0.9	0.2	0.7	3.7	9.1	0.4	1.7	0.3	1.2
Fluoranthene	1.0	0.8	0.2	1.0	2.3	0.7	0.9	0.7	1.4	3.4	1.2	1.5	6.5	2.3	4.8	33.7	24.2	4.3	7.3	2.3	9.8
Benzo(b,k,l)fluo	<LQ	0.6	0.6	1.6	2.1	0.8	0.4	0.6	1.0	2.8	1.4	1.0	4.7	3.2	3.7	19.4	7.8	3.1	5.6	1.9	8.7
Benzo(a)pyrene	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.9	0.1	<LQ	<LQ	<LQ	1.1	0.5	0.2	1.2	1.1	1.2	3.0	3.3	0.3	0.6	0.6	2.8
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.9	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1.0	<LQ	0.2	0.9	1.3	1.1	4.8	1.7	0.7	1.4	0.6	1.8
Benzo(g,h,i)perylene	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0.6	<LQ	<LQ	<LQ	0.7	0.7	0.6	0.1	0.9	1.0	1.1	3.8	2.2	0.9	1.6	0.9	2.1
PCB 50+28	1.8	0.6	1.0	1.6	1.1	1.2	2.0	1.6	1.6	2.9	0.3	13.2	1.2	0.7	1.5	4.7	3.2	5.3	5.9	2.6	2.3
PCB 52	2.7	2.5	2.7	3.9	2.2	4.1	3.9	2.6	3.5	4.3	2.7	33.8	3.2	1.9	2.7	8.3	4.6	9.4	8.6	3.9	5.6
PCB 101	2.3	2.9	2.6	3.6	2.7	3.7	3.9	4.7	3.6	4.0	1.9	24.5	5.0	3.6	7.3	14.9	7.6	8.7	9.3	4.8	4.8
PCB 118	1.4	1.2	1.0	2.7	3.9	3.7	2.9	3.4	2.7	4.0	nd	20.7	1.8	2.0	5.7	8.7	3.6	7.1	13.5	2.9	4.0
PCB 153	4.6	5.4	4.9	6.9	6.5	7.6	6.8	8.4	8.2	7.4	4.1	50.8	12.1	5.7	30.8	36.6	16.7	13.7	10.6	16.7	7.6
PCB 138	3.4	4.1	3.4	4.9	5.3	6.0	5.3	6.1	6.6	6.1	3.3	45.5	9.9	5.1	23.5	31.8	12.9	12.0	10.6	10.8	6.5
PCB 180	2.0	1.9	2.0	2.2	1.8	1.6	1.6	1.6	2.3	1.4	1.7	16.6	3.0	1.4	9.1	14.2	4.9	3.8	2.4	3.5	2.1
sum PCBs	18	19	18	26	23	28	26	28	28	30	14	205	36	20	81	119	53	60	61	45	33
PBDE 99	0.9	1.0	1.0	0.7	0.6	0.8	1.3	1.9	1.0	0.6	0.5	1.5	1.3	0.5	0.6	3.2	1.7	2.7	1.4	1.2	2.2



# CHAPITRE V

## 5. UTILISATION D'UN BIOTEST DE REPROTOXICITE CHEZ LA FEMELLE *GAMMARUS FOSSARUM*



**Publication n°5 :****Utilisation d'un biotest de reprotoxicité  
chez l'amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum* (Koch, 1835)  
au cours d'expositions au laboratoire et sur le terrain****En préparation pour *Aquatic Toxicology*****Jubeaux G., Coulaud R., Techer R., Quéau H., Chaumot A., Geffard O.****Irstea, UR MALY, F-69336 Lyon, France****Résumé :**

Parmi les invertébrés d'eau douce, l'amphipode *Gammarus fossarum* est une espèce couramment utilisée en écotoxicologie pour les biessais de toxicité aiguë et chronique. Un test de reprotoxicité est aujourd'hui disponible chez cette espèce, incluant le processus de mue, de croissance et de production des ovocytes, et les anomalies embryonnaires comme critères. Le principal but de cette étude a été d'évaluer la pertinence de ce test de toxicité comme un outil d'évaluation efficace en conditions laboratoire et terrain. Premièrement, une exposition au laboratoire pendant 21 jours a été réalisée chez les gammarus femelles afin d'évaluer les effets de l'exposition à différentes classes de composés chimiques (pour des concentrations allant de 0,001 au 1000 µg.L<sup>-1</sup> avec des écarts de 100 µg.L<sup>-1</sup>), incluant des hormones de crustacés (20-hydroxyecdysone et méthyle-farnesoate), des pesticides (méthoxyfénazole et propiconazole) et des produits médicaux (benzophénone, carbamazépine, cyprotérone et (R)-propranolol). Les résultats montrent que la 20-hydroxyecdysone et le méthoxyfénazole induisent des retards de cycle de mue. Les produits médicaux testés (benzophénone, carbamazépine et (R)-propranolol) et l'exposition au fongicide (propiconazole) provoquent une croissance anormale des ovocytes chez les femelles, tandis que le méthyle-farnesoate inhibe ce paramètre biologique. La cyprotérone et la carbamazépine perturbent la production des ovocytes, alors que le propiconazole et tous les composés médicaux testés induisent des anomalies embryonnaires chez *G. fossarum*. Deuxièmement, les expérimentations sur le terrain ont été conduites sur cinq sites de référence et huit sites contaminés, dans des rivières de la région Rhône-Alpes (France) sélectionnées de manière à obtenir une large gamme de caractéristiques physico-chimiques et de positions géographiques. La croissance des ovocytes n'a été affectée sur aucun des sites contaminés testés, tandis que la production d'ovocytes a été impactée sur un site. Enfin, nous avons observé une augmentation du nombre d'anomalies embryonnaires sur deux sites contaminés. En conclusion, nous discutons de l'application et de la pertinence de ces critères chez *G. fossarum* en terme d'issues écologiques et écotoxicologiques.

**Mots clés :**

*hormones, produits médicaux, pesticides, expositions au laboratoire et in situ, Gammarus fossarum, test de reprotoxicité*





## Reproductive toxicity assessment in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) in laboratory and field surveys.

Guillaume Jubeaux, Romain Coulaud, Romy Techer, Hervé Quéau, Arnaud Chaumot, Olivier Geffard.  
Irstea, UR MALY, F-69336 Lyon, France

### Abstract

---

Among freshwater invertebrates, the amphipod *Gammarus fossarum* is an important test organism and is currently used in ecotoxicology for acute and chronic bioassays. A reproductive toxicity test is now available for this species, including the molting process, oocyte growth and production, and embryonic abnormalities as endpoints. The main aim of this study was to evaluate the relevance of this toxicity test as an effective assessment tool under laboratory and field conditions. Firstly, a 21-day laboratory experiment was conducted with female gammarids to assess the effect of exposure to different classes of chemical compounds (for concentrations ranging from 0.001 to 1,000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in increments of 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), including crustacean hormones (20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate), pesticides (methoxyfenozide and propiconazole), and pharmaceutical products (benzophenone, carbamazepine, cyproterone and (*R*)-propranolol). Results show that the 20-hydroxyecdysone and methoxyfenozide induce molting cycle delays. The pharmaceuticals tested (benzophenone, carbamazepine, and (*R*)-propranolol) and exposure to the fungicide propiconazole induced abnormal oocyte growth in female gammarids, while the crustacean hormone methyl-farnesoate inhibited this biological parameter. The pharmaceuticals cyproterone and carbamazepine disrupted oocyte production, whereas propiconazole and all pharmaceutical products induced embryotoxicity in *G. fossarum*. Secondly, field experiments were conducted in five reference sites and eight polluted sites in rivers of the Rhône-Alpes region (France), selected to provide a wide range of physicochemical characteristics and geographical locations. Oocyte growth was not affected in all the polluted sites tested, while oocyte production was impacted in one site. Finally, we observed an increase of embryonic abnormalities in two polluted sites. To conclude, we discuss the application and relevance of these endpoints in *G. fossarum* in terms of ecotoxicological and ecological outcomes.

---

**Keywords:** hormones, pharmaceuticals, pesticides, field and laboratory survey, *Gammarus fossarum*, reproductive toxicity test

## 1. INTRODUCTION

Control of water pollution is mandated by the Commission of the European Communities Directives 2000/60/EC ([http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index\\_en.html](http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html)). The degree of contamination has traditionally been appraised by chemical analyses applied in sediment, in waters, or in biota. While this approach can determine the concentration of contamination in an area and assist in understanding the biogeochemical cycling of the measured compounds, it is inadequate in assessing the bioavailability and impact of all contaminants present in the resident biota. In this context, substantial efforts have been made over the last 25 years to develop and apply ecotoxicology tools for ecological risk assessment (Forbes *et al.*, 2006). Laboratory and/or *in situ* bioassays, based on subindividual and individual responses, are relevant tools for assessing the adverse biological effects of contaminant mixtures and the presence and effects of compounds (Narraci *et al.*, 2009).

Throughout the world, aquatic invertebrates such as amphipods (*i.e.*, malacostracan crustacean) are currently used as a bioindicator species for marine and freshwater biomonitoring programs by surveying field populations (Fialkowski *et al.*, 2009 ; Geffard *et al.*, 2010). Laboratory toxicity tests and *in situ* bioassays with amphipods are also used to assess the toxicity of natural and spiked sediments (Neuparth *et al.* 2005 ; Costa *et al.* 2005), waters (Laurence & Poulter, 2001 ; Wilding & Maltby, 2006 ; Geffard *et al.*, 2007 ; Xuereb *et al.*, 2007, 2009), and effluents (Gross *et al.*, 2001 ; Schirling *et al.*, 2005 ; Chung *et al.*, 2008). Amphipods are proposed as a relevant test species because they are known to be sensitive to a large range of chemical inputs (Pascoe *et al.*, 1994 ; Neuparth *et al.*, 2005 ; Felten *et al.*, 2008a ; Mazurová *et al.*, 2008). Moreover, they are easily sampled, maintained, and handled in the laboratory thereby facilitating the setting up of both laboratory and field experiments (Gross *et al.*, 2001 ; Costa *et al.*, 2005 ; Neuparth *et al.*, 2005), and standard acute and chronic bioassays are available for these species (USEPA, 2001). One of the fundamental aims of ecotoxicology is to establish how pollutants affect the population level; however, this biological level is not easily investigated under laboratory conditions. In this context, one of the most relevant approaches is the use of population modeling (Forbes *et al.*, 2008), which involves the examination of toxicity at the individual level, using key biological variables for population dynamics such as survival, growth, development, and reproduction, which are then projected and integrated within population models in order to comprehend population impacts (Raimondo & McKenney, 2005).

The main suborder of amphipods, *Gammaridea*, contains more than 5,700 species and they are commonly used in freshwater risk assessment models (Rinderhagen M, 2000). In Europe, two closely related species of the *Gammarus* genus, *Gammarus fossarum* and *Gammarus pulex*, are recognized as relevant test species and have been intensively used in ecotoxicology because they are sensitive, ecologically important, widespread, abundant, and easily identifiable (Kunz *et al.*, 2010a). Lethal and sublethal responses caused by exposure to chemical inputs have already been characterized for growth (Blockwell *et al.*, 1996a ; Roman *et al.*, 2007), feeding rate (Alonso *et al.*, 2009 ; Coulaud *et al.*, 2011),

precopulatory behavior (Pascoe *et al.*, 1994 ; Watts *et al.*, 2001, locomotion (De Lange *et al.*, 2009 ; Xuereb *et al.*, 2009b), and drift behavior (Beketov & Liess, 2008), underlying the sensitivity and the ecological relevance of these approaches. Moreover, the disruption by xenobiotics of two critical physiological processes in amphipods, molting and secondary vitellogenesis, are thought to cause reproductive toxicity and can be used to identify suitable biomarkers for evaluating reproductive toxicity in amphipods (Hyne, 2011). To this end, Geffard *et al.* (2010) recently characterized the molting and reproductive cycles in sexually active female *G. fossarum*. In *G. fossarum* gravid females with embryos undergoing development in the marsupium, maturation of oocytes occurs concurrently in their ovaries in preparation for the next spawning. The *G. fossarum* molting process, strongly related to water temperature, was run over approximately 30 days at 12°C and can be divided into three steps: (i) the postmolt stages A and B (brief, approximately 5 days), (ii) the intermolt stages C1 and C2 (15 days), and (iii) the premolt stages D1 and D2 (10 days). From the characterization of the natural variability of biological endpoints, Geffard *et al.* (2010) proposed a relevant reproductive toxicity test in this species to assess the impact of chemical inputs at the individual level, including measurements of the molting cycle, of oocyte growth and production in sexually mature females (*i.e.*, secondary vitellogenesis), and of embryonic development. The first applications of this method underlined that (i) cadmium specifically inhibited secondary vitellogenesis, and (ii) nonylphenol had a specific effect on embryonic development. Because these physiological mechanisms are perfectly synchronized during the reproductive–molt cycle and have been well described, disruption of one of them can provide information on the mode of action of a studied compound.

Focusing on the use of the endpoints of *G. fossarum* reproductive toxicity tests, the aim of the present study was (i) to assess the effects of chemical compounds and the characterization of their potential mode of action with regard to the reproduction of this species and (ii) to assess the sensitivity and relevance of this reproductive bioassay in environmental monitoring. Thus, we constructed the study in two steps:

1. We assessed the effects of chemical compounds in *G. fossarum* by exposing sexually active female gammarids to these compounds for 21 days under controlled conditions in the laboratory. We chose to test three chemical families. (i) Crustacean hormones: 20-hydroxyecdysone and methyl farnesoate, which are the main signaling molecules regulating physiological mechanisms in crustaceans (LeBlanc, 2007); (ii) pharmaceutical products: an anti-cancer agent (cyproterone), a  $\beta$ -blocker (R-propranolol), an antiepileptic drug (carbamazepine), and a UV filter (benzophenone), currently detected and quantified in sewage treatment plant effluents and for which the impact on aquatic invertebrates is a great of concern (Ferrari *et al.*, 2003 ; Ferrari *et al.*, 2004 ; Fent *et al.*, 2006 ; Besse & Garric, 2008) ; and (iii) pesticides : the insecticide methoxyfenozide that exerts pro-ecdysteroid activity mainly in lepidopteran insects (Carlson *et al.*, 2001) and propiconazole, an azole fungicide frequently used in *Daphnia magna* studies as a model compound to assess effects on reproductive endpoints (Kast-Hutcheson *et al.*, 2001 ; Mu & Leblanc, 2002b, 2003 ; Soetaert *et al.*, 2006).

2. We studied the environmental relevance of this reproductive test by caging sexually active female gammarids in five reference and eight polluted stations in rivers of the Rhône-Alpes watershed, showing a large range of physicochemical characteristics, geographical locations, and chemical pressures.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. TEST ORGANISM COLLECTION AND MAINTENANCE

Specimens of *Gammarus fossarum* were sampled using a net by kick sampling from La Tour du Pin (Isère, France), upstream of the Bourbre River (mid-eastern France), and quickly transported to the laboratory (Cemagref, Lyon) in plastic bottles containing ambient fresh water. The organisms were kept under an acclimatization period of at least 15 days in 30-L tanks continuously supplied with drilled groundwater (*i.e.*, 200 or 600  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), depending on the conductivity level of the subsequent experimental environment, and under constant aeration. A 16-h/8-h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at  $12\pm 1^\circ\text{C}$ . Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*i.e.*, *Alnus glutinosa*). The leaves were conditioned for at least  $6\pm 1$  days in water. Freeze dried worms (*i.e.*, *Tubifex tubifex*) were given as a dietary supplement twice a week.

### 2.2. Methodology for reproductive toxicity assessment in *Gammarus fossarum*

In line with reprotoxic test criteria (detailed in Geffard et al., 2010), precopulatory D2 molt-stage females characterized by (i) embryos close to hatching with compound eye and fully developed appendages in the brood pouch, (ii) visible ovaries with large and dark oocytes corresponding to the last stage of secondary vitellogenesis, and (iii) the presence of a guarding male were selected at the beginning of experiment (mean body size,  $9.5 \pm 0.9$  mm) and placed in glass beakers. In these conditions and after 21 days of exposure, control females are expected to be at the end of the intermolt (C2) stage, with embryos in stage 3, and to have a mean oocyte surface of  $0.106 \pm 0.027$  mm<sup>2</sup> and a mean number of oocytes, normalized by female size, of  $4 \pm 1.5$ . Survival and distribution of molt stages for both laboratory and field experiments are presented, respectively, in Tables 1 and 2. Depending on survival rate, we determined the molt stages to be 10–18 females per condition. Only C2 molt-stage females were used to establish the oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup> per female) in order to limit the natural variability of this parameter in relation to the reproductive cycle (Geffard et al., 2011) and to allow an accurate comparison to be made of organisms obtained from different tested conditions or sites. For oocyte production assessment, all females with a molting stage later than C1 were used. Finally, for embryonic development and production, all organisms were used. The methods used for each endpoint are detailed below in the text (*i.e.*, Section 2.5., Endpoints analysis).

### 2.3. Laboratory survey

20-Hydroxyecdysone, methoxyfenozide, benzophenone, carbamazepine, *R*-propranolol, cyproterone, and propiconazole were purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Methyl-farnesoate was purchased from Tebu-Bio® (Le Perray en Yvelines, France). We performed 21-day semi-static exposure tests under controlled conditions, at a temperature of  $12.6 \pm 1^\circ\text{C}$  and under a 16-h/8-h light/dark photoperiod, for 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), and (*R*)-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control (*i.e.*, water) and solvent control (*i.e.*, acetone at 0.005% in contaminated media) were included. Stock solutions were prepared in acetone (*i.e.*, 0.005%) at concentrations ranging from  $2 \cdot 10^{-5}$  to  $2 \text{ g.L}^{-1}$ , except for carbamazepine and (*R*)-propranolol, which were prepared in water. The contaminated media were obtained by adding 125  $\mu\text{L}$  of the stock solution in 2.5 L of uncontaminated drilled ground water (*i.e.*,  $600 \pm 50 \mu\text{S.cm}^{-1}$ , previously kept at  $12.6 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Eighteen precopulatory pairs were placed equally in three 500-mL glass beaker replicates. A piece of net (mesh size: 200  $\mu\text{m}$ ; length  $\times$  width: 6  $\times$  5 cm) was added in the vessel to provide a resting surface and to prevent cannibalism. Media were renewed every day, and at the same time the surviving organisms were counted and the dead ones were removed. Organisms were fed *ad libitum* with conditioned alder leaves and freeze-dried worms (*i.e.*, respectively *Alnus glutinosa*, *Tubifex tubifex*). Water quality parameters (pH, conductivity, water temperature, and dissolved oxygen) were recorded before and after the renewal of the test solutions that displays no significant variations. At the end of the exposure, female gammarids were collected to analyze endpoints (*i.e.*, size, molt stage, number of oocyte per female, oocyte surface, number of normal and abnormal embryos in the female marsupium).

### 2.4. Field survey

Five reference and eight polluted stations were deployed during June 2010 on rivers in the Rhône-Alpes region, seeking to cover a large range of physicochemical characteristics and geographical locations ( $\sim 20,000 \text{ km}^2$ ). Reference stations were chosen with regard to data of chemical monitoring programs (Besse et al. unpublished). For each station, 18 precopulatory pairs were placed equally in three polypropylene cylinder replicates (diameter 5 cm, length 10 cm) capped at their ends with pieces of net (mesh size: 1 mm). Alder leaf (*i.e.*, *Alnus glutinosa*) discs (20 mm in diameter, without major veins) were supplied *ad libitum* in each container. At the end of the exposure, female gammarids were collected to analyze endpoints (*i.e.*, size, molt stage, number of oocyte per female, oocyte surfaces, number of normal and abnormal embryos in the female marsupium). The duration of exposure ranged from 2 to 3 weeks according to the field temperature so that testing would end when females reached the C2 molt stage.

## 2.5. Endpoints analysis

Detailed analysis of size, molt stage, and reproductive endpoints are described in a recent publication by Geffard et al. (2010). Briefly, molt stage was determined by integumental morphogenesis analysis of the first and second periopod pairs (dactylopodite and protopodite) of females mounted on a microscope slide with a coverslip and observed under an optical microscope ( $\times 200$ ). Size was determined by placing female gammarids laterally on a glass slide, placed under a binocular microscope ( $\times 7$ ) where the females were photographed, and size was determined with Sigma Scan Pro 5<sup>®</sup> software. Oocyte surface was measured by placing females laterally between two glass slides, placed under an optical microscope ( $\times 50$ ) where oocytes were photographed, and the surface of each oocyte was then measured with Sigma Scan Pro 5<sup>®</sup> software. Fecundity (number of oocytes per female) was estimated by *in vivo* observation of the two ovaries under the binocular microscope. Fecundities were calculated as follows (where maturity size was determined at 5 mm (Geffard et al. 2010)).

$$fecundity = \frac{\text{number of oocytes}}{\text{body size} - \text{maturity size}}$$

The percentage of normal embryos was determined by counting total, normal, and abnormal embryos that were manually recovered from the female marsupium, placed on a slide with water, and observed under the binocular microscope. Abnormal embryo occurrence was defined using the morphological criteria described by Lacaze et al. (2011) in this species. Briefly, these abnormalities include malformed embryos, undeveloped embryos, undifferentiated embryos in which cells have degenerated, aberrant cleavages and edema, nonspecific malformations, enlarged embryos and impaired membranes, and dead and moldy embryos.

## 2.5. Statistical analysis

Statistical procedures were carried out with the R software (R Development Core Team, 2008b). Normality and variance homogeneity were checked, respectively, using the Shapiro–Wilk and Bartlett tests. For secondary vitellogenesis endpoints (*i.e.*, oocyte growth and production), nonparametric analyses were performed to test the global effect of the treatment and to compare the two treatments (*i.e.*, Kruskal–Wallis rank sum test and Mann-Whitney test, respectively). For embryonic abnormalities, nonparametric analyses were performed with the unilateral proportion test. For the statistical analyses, Bonferroni test corrections were carried out to adjust the level of significance, set at 5%, for both laboratory and field surveys.

## 3. RESULTS

### 3.1. Laboratory survey

#### 3.1.1. Survival and molting

Occurrence of survival and C1, C2, and D1 molting stages (expressed in percentage) in females exposed to all the treatments is displayed in Table 1. Overall, after 21 day exposure, the survival rate

ranged from 83 to 97%, except for cyproterone exposure at 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (*i.e.*, 50%). In all, 70–100% of females were at the C2 molt stage, except for benzophenone exposure at 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , where only 50% of females had reached the C2 stage and 36% were still in C1 stage.

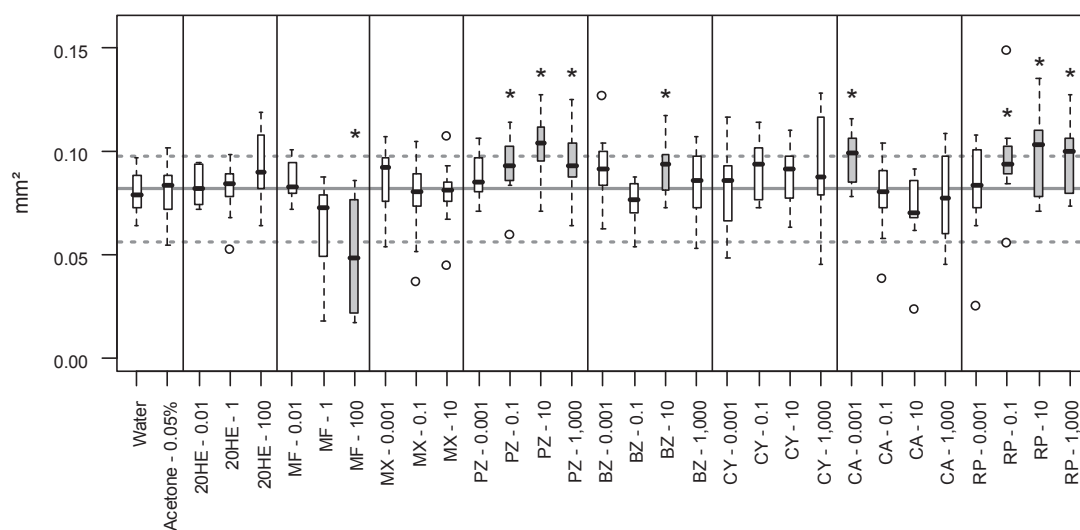
**Table 1. *Gammarus fossarum* occurrence of survival (%) and occurrence of C1, C2, and D1 molt stages (%) in females: solvent-free control (*i.e.*, water), solvent control (*i.e.*, acetone 0.05%), 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), and *R*-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ).**

Condition	Survival (%)	Moult stages (%)		
		C1	C2	D1
Solvent Free Control	89	14	86	0
Solvent Control	86	27	73	0
20-hydroxyecdysone				
0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$	83	33	67	0
1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	86	33	67	0
100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97	7	73	20
methyl-farnesoate				
0.01 $\mu\text{g.L}^{-1}$	86	20	80	0
1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94	7	93	0
100 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	21	79	0
methoxyfenozide				
0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	0	73	27
0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	92	0	87	13
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97	7	87	7
propiconazole				
0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	0	93	7
0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94	0	100	0
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	92	9	91	0
1,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94	0	100	0
benzophenone				
0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	0	93	7
0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	0	80	20
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97	0	100	0
1,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94	36	50	14
cyproterone				
0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$	83	8	92	0
0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	21	71	7
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	86	13	87	0
1,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$	50	15	85	0
carbamazepine				
0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$	89	20	73	7
0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	92	0	100	0
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	86	0	100	0
1,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97	0	100	0
<i>R</i> -propranolol				
0.001 $\mu\text{g.L}^{-1}$	97	0	86	14
0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94	7	93	0
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94	7	87	7
1,000 $\mu\text{g.L}^{-1}$	94	0	100	0



## 3.1.2. Oocyte growth

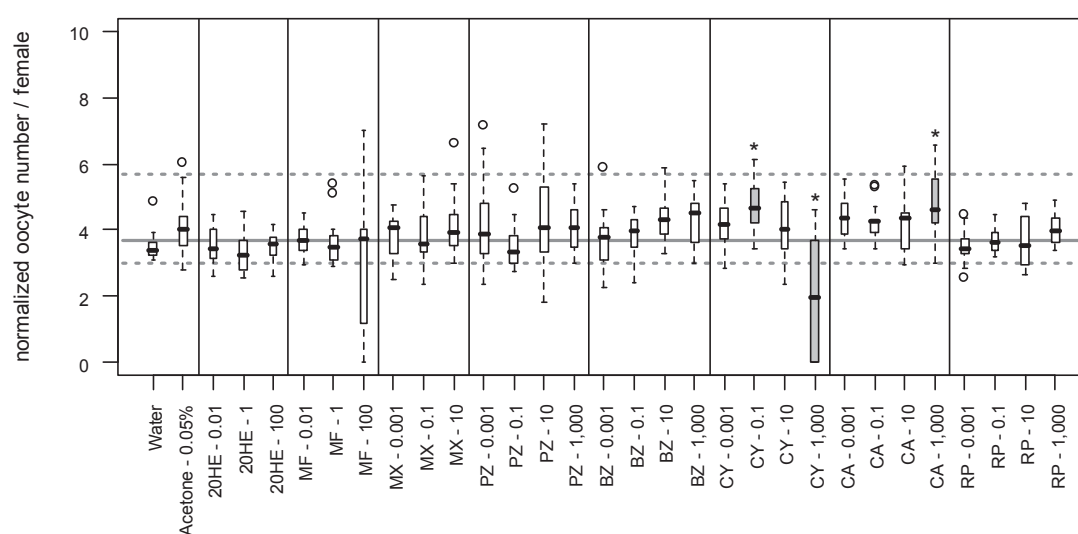
*Gammarus fossarum* mean oocyte surface (expressed in  $\text{mm}^2$ ) after 21 days' exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and (R)-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) in C2 molt-stage females is presented in Fig. 1. Mean oocyte surfaces recorded in both the solvent-free control (*i.e.*, water) and the solvent control (*i.e.*, acetone 0.005%) displayed no significant differences (Mann-Whitney test,  $p > 0.05$ ) and were thus pooled to have a single 21-day exposure control condition. 20-Hydroxyecdysone, methoxyfenozide, and cyproterone did not have a significant effect on oocyte growth (Kruskal-Wallis rank sum test,  $p > 0.05$ ). Conversely, with methyl-farnesoate a significant inhibition of oocyte growth was obtained for the highest tested concentration. Finally, with propiconazole, benzophenone, carbamazepine, and (R)-propranolol, significant induction of oocyte growth (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ) was observed, but not for all tested concentrations of benzophenone and carbamazepine.



**Figure 1.** *Gammarus fossarum* mean oocyte surface (expressed in  $\text{mm}^2$ ) in C2 molt-stage females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), and (R)-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control = Water; Solvent control = Acetone 0.05%. Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. The  $p$ -values of statistical testing of the global effect of the treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control of the experiment (both solvent-free control and solvent control), in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control.  $7 \geq n \geq 15$  C2-molt stage females per condition.

### 3.1.3. Oocyte production

*Gammarus fossarum* fecundities (expressed in normalized oocyte number per female) observed after 21 days' exposure to various tested compounds are presented in Fig. 2. Fecundities recorded in both the solvent-free control (*i.e.*, water) and the solvent control (*i.e.*, acetone 0.005%) did not display a significant difference (Mann–Whitney test,  $p > 0.05$ ) and were thus pooled to a single 21-day exposure control condition. Significant changes (Kruskal–Wallis rank sum test,  $p < 0.05$ ) were observed only for two compounds, cyproterone and carbamazepine. In the former, an induction was observed at the concentration of  $0.1 \mu\text{g.L}^{-1}$  and an inhibition at the highest concentration tested ( $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). For carbamazepine, only one induction was observed at the highest concentration.

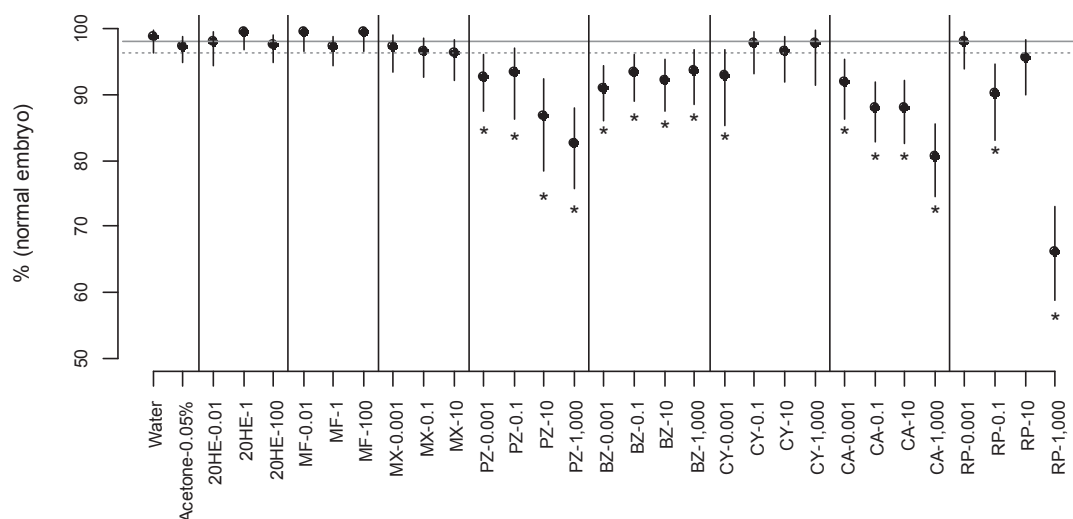


**Figure 2.** *Gammarus fossarum* normalized number of oocytes in C2 and D1 molt-stage females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesoate (MF: 0.01, 1, and  $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), and *R*-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and  $1,000 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control = Water; Solvent control = Acetone 0.05%. Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. The  $p$ -values of statistical testing of the global effect of treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control of the experiment (both solvent-free control and solvent control), in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control.  $9 \geq n \geq 15$  C2- and D1-molt stage females per condition.

### 3.1.4. Embryonic abnormalities

Figure 3 presents the percentage of normal embryos observed in *G. fossarum* females exposed to the various pollutants. There was no significant difference in the percentage of normal embryos recorded in both the solvent-free control (*i.e.*, water) and the solvent control (*i.e.*, acetone 0.005%) (Unilateral proportion test,  $p > 0.05$ ) and were thus pooled to have a single 21-day exposure control condition. No

significant (Unilateral proportion test,  $p>0.05$ ) impacts were observed for 20-hydroxyecdysone, methyl-farnesaote, and methoxyfenozide. Conversely, propiconazole, benzophenone, cyproterone, carbamazepine, and (*R*)-propranolol significantly induced abnormalities (Unilateral proportion test,  $p<0.05$ ), with values reaching 40% of abnormal embryos at the highest concentrations.



**Figure 3.** *Gammarus fossarum* percentage of normal embryo (95% CI) in C2 and D1 molt-stage females after 21-day exposure to 20-hydroxyecdysone (20HE: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methyl-farnesaote (MF: 0.01, 1, and 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), methoxyfenozide (MX: 0.001, 0.1, and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), propiconazole (PZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), benzophenone (BZ: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), carbamazepine (CA: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), cyproterone (CY: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), and *R*-propranolol (RP: 0.001, 0.1, 10, and 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Solvent-free control = Water; Solvent control = Acetone 0.05%. The  $p$ -values of statistical testing of the global effect of treatment are reported in the text. \* = significant difference ( $p<0.05$ ). Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median and 95% CI of the overall control.  $9\geq n\geq 15$  C2 and D1 molt-stage females per condition. Detailed analyses are reported in the text.

## 3.2. Field survey

### 3.2.1. Physicochemical values, survival, and molting

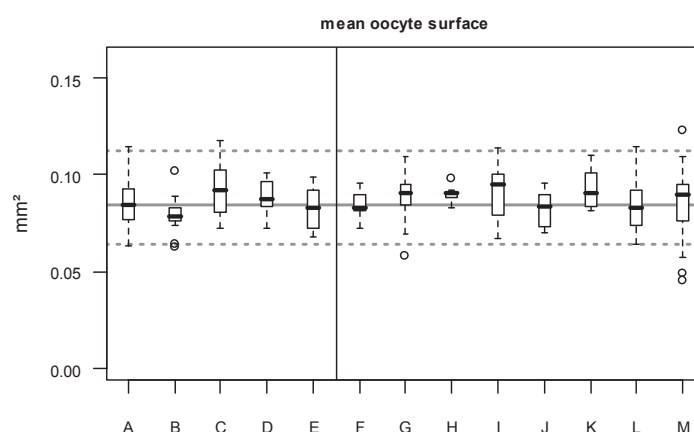
Table 2 presents the physicochemical parameters for each station (*i.e.*, water temperature and conductivity) as well as the survival rate and the molt stage occurrences in caged females in the 13 sites studied. In reference stations, mean water temperature and conductivity ranged, respectively, from 11.4 to 17.3°C and from 130 to 380  $\mu\text{S.cm}^{-1}$ . In polluted stations, values ranged from 12.9 to 20.8°C for temperature and from 55 to 490  $\mu\text{S.cm}^{-1}$  for conductivity. The survival rates ranged from 81 to 95% in reference stations (A–E) and from 57 to 95% in polluted stations (F–M). Overall, both for reference and polluted stations, 63–95% of females were at the C2 molt stage, and 85–100% of females were at the C2 and D1 molt stage.

**Table 2. Station physicochemical parameters and *Gammarus fossarum* occurrence of survival (%), number of female molt stage analysis, and occurrence of C1, C2, and D1 molt stages (%) in females in 13 stations (A–M).**

Station Code - River, Location	Physico-chemical parameters		Survival (%)	Moult stages (%)		
	Temperature (°C)	Conductivity (μS.cm-1)		C1	C2	D1
A - Mandorne, Oncieux	11.4	380	90	26	<b>74</b>	0
B - Varèze, Cours et Buis	14.4	325	95	0	<b>82</b>	18
C - Galaveyson, Saint Clair sur Galaure	14.4	130	89	0	<b>80</b>	20
D - Veyle, Lent	15.6	345	95	0	<b>63</b>	37
E - Veyle, Servas	17.3	330	81	0	<b>94</b>	6
F - Boussuivre, Saint Marcel l'Eclairé	12.9	245	71	0	<b>64</b>	36
G - Ardières, Les Ardillats	13.2	295	88	6	<b>83</b>	11
H - Ergues, Poules les Echarmeaux	13.7	110	81	0	<b>81</b>	19
I - Doux, Saint Jean de Muzols	18.5	55	57	0	<b>83</b>	17
J - Cance, Sarras	17.3	78	69	15	<b>85</b>	0
K - Drac, Fontaine	12.0	240	93	0	<b>63</b>	37
L - Rhône, Givors	17.8	390	93	0	<b>90</b>	10
M - Saône, Ile Barbe	20.8	490	95	5	<b>95</b>	0

### 3.2.2. Oocyte growth

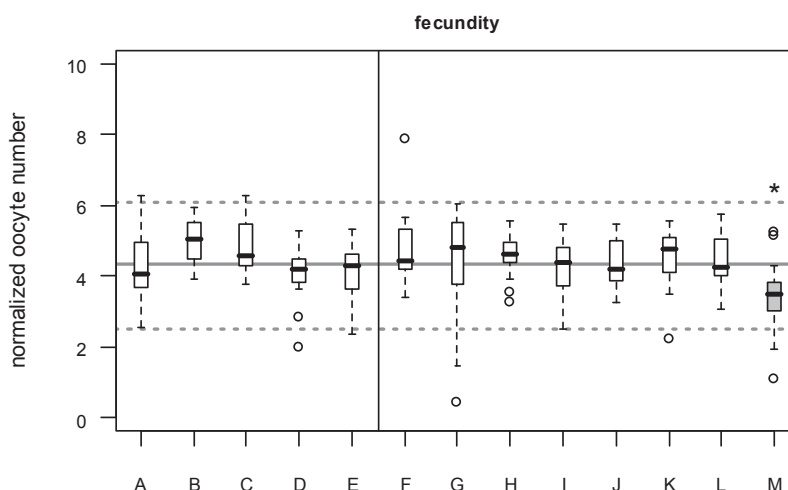
The *Gammarus fossarum* mean oocyte surfaces (expressed in mm<sup>2</sup>) after field exposure in 13 stations, both reference and polluted, in C2 molt-stage females are presented in Fig. 4. The overall mean oocyte surfaces recorded in the reference stations (*i.e.*, station A–E) did not display significant differences (Kruskal-Wallis rank sum test,  $p > 0.05$ ) and were thus pooled to a single field exposure control condition. In all cases, no significant difference (Kruskal-Wallis rank sum test,  $p > 0.05$ ) was observed between mean oocyte surfaces of control females and those observed in females exposed to impacted sites.



**Figure 4. *Gammarus fossarum* mean oocyte surface (expressed in mm<sup>2</sup>) in C2 molt-stage females after field exposure in 13 stations (A–M). Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control of the experiment (stations A,B,C,D and E).  $7 \geq n \geq 18$  C2 molt-stage females per condition.**

### 3.2.3. Oocyte production

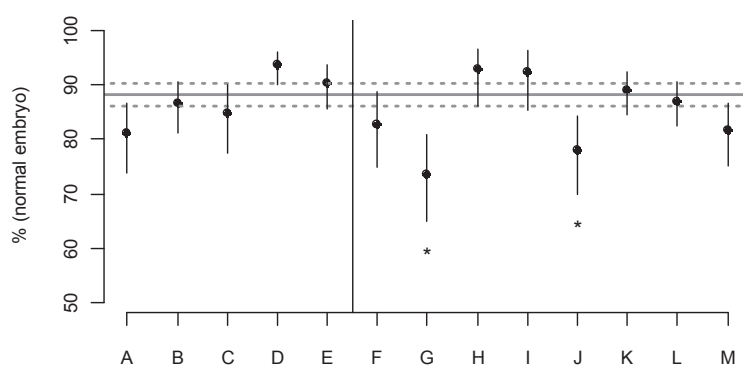
*Gammarus fossarum* fecundity (expressed in normalized oocyte number) after field exposure in 13 stations, both reference and polluted, is presented in Fig. 5. No significant differences were observed in the reference stations (*i.e.*, station A–E), and consequently they were pooled to a single field exposure control condition. Only for site M was a significant decrease (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ) in oocyte production observed.



**Figure 5.** *Gammarus fossarum* normalized oocyte number in C2 and D1 molt-stage females after field exposure on 13 stations (A–M). Boxes extend from the first to the third quartile with a bold segment for the median value; the bars extend to the most extreme data points, no more than 1.5 times the interquartile range. Data points of more than 1.5 times the interquartile range are represented by empty circles. \* = significant difference ( $p < 0.05$ ) from the overall control of the experiment (stations A,B,C,D and E), in addition represented by gray boxes. Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median, quartiles, and 95% CI of the overall control.  $7 \geq n \geq 18$  C2 and D1 molt-stage females per condition.

### 3.2.4. Embryonic abnormalities

The percentage of normal *G. fossarum* embryos after field exposure in 13 stations, both reference and polluted, in C2 and D1 molt-stage females is presented in Fig 6. There was a significant difference in the percentage of normal embryos recorded in all reference stations (*i.e.*, station A–station; Unilateral proportion test,  $p < 0.05$ ), but they were pooled to have a single field exposure control condition that integrates the natural variability of the reference stations. Polluted stations G and J displayed a significant reduction (Unilateral proportion test,  $p > 0.05$ ) in normal embryo production.



**Figure 6.** *Gammarus fossarum* percentage of normal embryo (95% CI) in C2 and D1 molt-stage females after field exposure in 13 stations (A–M). \* = significant difference ( $p < 0.05$ ). Horizontal gray solid and dashed lines illustrate median and 95% CI of the overall control of the experiment (stations A,B,C,D and E).  $7 \geq n \geq 18$  C2 and D1 molt-stage females per condition. Detailed analyses are reported in the text.

## 4. DISCUSSION

### 4.1. Methodology

Adult survival in the laboratory controls (*i.e.*, both water and acetone 0.005%) was above the U.S. Environmental Protection Agency's survival rate (*i.e.*, 80%) recommended for routine amphipod bioassays (Agency, 2001). Concerning the molt cycle, the results obtained in laboratory controls showed that under our laboratory conditions (*i.e.*,  $12.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ;  $600 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; photoperiod 16/8), after 21-day exposure a proportion of C2 molt-stage females ranging from 73 to 86% was observed (*i.e.*, which were used for mean oocyte surface determination), and more than 80% when including D1 molt-stage females (*i.e.*, which were used for oocyte production and embryonic abnormality determination). These observations are in accordance with reference values defined by Geffard et al. (2010) for this methodology. For other endpoints (*i.e.*, oocyte production and abnormality rate in embryos), less than 6% of malformed and undifferentiated embryos were found in this study for control conditions (*i.e.*, water and acetone 0.005%), which is consistent with previous studies on the same species (Geffard et al., 2010; Lacaze et al. 2010). The mean normalized number of oocytes was around 3.9 in laboratory controls and 4.4 in field controls. These results are similar to those obtained by Geffard et al. (2010) under laboratory conditions, with a value of  $4.2 \pm 0.7$ . The overall fecundity rate recorded in the control conditions showed a 10% variation (*i.e.*, independently of female size).

### 4.2. Laboratory survey

#### 4.2.1. Crustacean hormones

In crustaceans, ecdysteroids (*e.g.*, 20-hydroxyecdysone) and terpenoids (*e.g.*, methyl-farnesoate) are the main signaling molecules that regulate various physiological aspects such as the molting process,

embryonic development, and/or reproduction processes. There is an extended body of literature on them and some authors had reviewed their physiological role (e.g., Borst *et al.*, 1987 ; Subramoniam, 2000 ; LeBlanc, 2007 ; Subramoniam, 2011).

**20-Hydroxyecdysone** 20HE has been characterized as the physiologically active form of the ecdysteroids in most crustacean species; they are signaling molecules that control various physiological functions such as molting, embryonic development, and possibly reproduction. The present study showed that 20HE exposure did not impact embryonic development or oocyte growth and production in *G. fossarum*. It is well known that endogenous ecdysteroids are necessary for normal embryonic development (Subramoniam *et al.*, 1999 ; Subramoniam, 2000 ; Mu & Leblanc, 2002b). Ecdysteroids are implicated in the coordination of molting and reproductive cycles (Souty *et al.*, 1982 ; Gunamalai *et al.*, 2004). In dipteran insects and some ticks and mites, ecdysteroids play a role in the transcriptional activation of the vitellogenin gene (Sappington TW, 2002). Although evidence of a similar role for ecdysteroids in crustacean vitellogenesis is inconclusive, several reports implicate its role in female reproductive activity and especially in vitellogenin synthesis in decapods (reviewed in: Subramoniam, 2011), amphipods (Blanchet, 1972), and isopods (Souty *et al.*, 1982). In the present study, 20HE did not affect secondary vitellogenesis in the amphipod *G. fossarum*. In fact, while it is clear that ecdysteroid and vitellogenin levels both progressively increase during ovarian maturation (Suzuki *et al.*, 1996 ; Jayasankar *et al.*, 2002), it is not clear at this time whether ecdysteroids are responsible for the increase in vitellogenin levels and further research is needed in amphipods. Chang *et al.* (Chang & Mykles, 2011) reviewed the more recent experiments that have provided information on the cellular and molecular aspects of decapods molting control in which 20-hydroxyecdysone is highly implicated. Our experiment revealed that the molting process in female gammarids exposed to exogenous 20HE is delayed at 0.01 and 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and is accelerated at the highest concentration of 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (compared to controls). Few studies have directly assessed the effect of exogenous 20-hydroxyecdysone exposure on molting, focusing rather on chemicals known to mimic 20HE-like activity in crustaceans. For example, the mode of action of the insecticide methoxyfenozide, studied here, stimulates premature ecdysis in lepidopteran larvae causing death of some individuals (Carlson *et al.* 2001). Nevertheless, 21-day exposure of the branchiopod *Daphnia magna* to 20HE at concentrations ranging from 0 to 260 nM (0–125  $\mu\text{g/L}$ ) and to another ecdysteroid, ponasterone A, from 0 to 27 nM (0–12.5  $\text{mg/L}$ ) showed a stimulation of premature ecdysis causing death but only after several successive molt cycles (Baldwin *et al.*, 2001).

**Methyl-farnesoate** The major terpenoid hormone MF (*i.e.*, the unepoxidized form of insect III juvenile hormone) is a signaling molecule that has been measured in many crustaceans (Laufer & Biccferst, 2001). In the present study, we showed that exogenous MF exposure did not impact survival, embryonic development, molting, and oocyte production in *G. fossarum*. Nevertheless, our experiments revealed a reduction of mean oocyte surface of around 35% in female gammarids exposed to 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$  MF. In a

previous study, we observed that oocyte growth is directly linked to vitellogenin contents in oocytes for sexually active *G. fossarum* females, even when under chemical stress (Jubeaux *et al.* submitted). Consequently, at the intermolt stage C2, MF seems to interfere with the secondary vitellogenesis process, in particular in this species. Similar observations were made in the intermolt period in the red crab *Charybdis feriatus* by Mak *et al.* (2005), who also demonstrated that the effect of MF on vitellogenin production depends on the maturation stage of the oocyte. Indeed MF stimulates vitellogenin expression in organisms with early vitellogenic-stage oocytes, whereas it inhibits it in females with middle vitellogenic-stage oocytes. However, the majority of studies in decapods showed opposite effects such as an increase in oocyte growth, vitellogenin level, and egg production (Borst *et al.*, 1987 ; Tsukimura & Kamemoto, 1991 ; Laufer & Biccferst, 2001 ; Rodríguez *et al.*, 2002 ; Mak *et al.*, 2005). However, we repeated the 21-day test exposure of female gammarids to MF twice (Simon *et al.*, 2010 ; Jubeaux *et al.*, 2012) and we obtained the same results in both experiments.

#### 4.2.2. Pesticides

**Methoxyfenozide** Most pesticides are designed to mimic the role of the hormones 20-hydroxyecdysone and methyl-farnesoate in order to control growth, development, or reproduction of arthropod pests in agriculture. The ecdysone agonist MX (*i.e.*, RH-2485) is one of a new generation of insect growth regulators named “reduced risk insecticides” in comparison with conventional insecticides (e.g., organophosphorus and carbamate). In fact, the ecdysone receptor binding affinity for MX in the lepidopteran insect *Plodia interpunctella* is about 250-fold higher than in the dipteran insect *Drosophila melanogaster* and more than 400-fold higher than the affinity of endogenous 20-hydroxyecdysone itself in *Plodia interpunctella* (Carlson *et al.*, 2001). In this same publication, the 6-day LC<sub>50</sub> calculated for seven lepidopteran species ranged from 0.11 to 3.12 mg.L<sup>-1</sup>, while for six non-lepidopteran species (including coleopteran and hemipteran insects<sup>a</sup>, an acarid<sup>a</sup>, and a nematode<sup>b</sup>) 3<sup>-a</sup> or 21<sup>-b</sup> day LC<sub>50</sub> values were above 150 mg.L<sup>-1</sup>. Trisyono *et al.* (Trisyono *et al.*, 2000) compared the acute toxicity of MX and carbaryl (*i.e.*, the carbamate family) on eggs and larvae in the *Coleomegilla maculate* beetle, showing that carbaryl insecticide displays a larval mortality and an egg mortality fivefold higher compared to controls after 4 and 7 days of exposure, respectively, when no statistical effect of MX was observed. Although some studies highlight the strong lethality of MX against lepidopteran species, nonlethal parameters (*i.e.*, growth, reproduction, development) were not rigorously or sufficiently assessed in insects to evaluate the long-term effects of MX. The acute and chronic toxicity (*i.e.*, mortality, life traits, sub-individual responses) of MX on crustaceans is still lacking (except 48-h LC<sub>50</sub> in Daphnid of above 3.7 mg.L<sup>-1</sup> – Fiche MSMS de Sigma-Aldrich). Consequently, the present study assessed the chronic impact of MX on growth (*i.e.*, molting), reproductive (*i.e.*, mean oocyte surface and fecundity), and developmental (*i.e.*, embryonic abnormalities) parameters in *G. fossarum* using the lowest concentrations that were previously tested and ranging from 10<sup>-6</sup> to 10<sup>-2</sup> mg.L<sup>-1</sup>. Mean oocyte surfaces, fecundity, and embryonic abnormalities were not affected by the overall MX treatments.



**Propiconazole** The pesticide PZ is a fungicide largely used in a variety of agricultural applications. Soetaert et al. (2006) recorded an inhibition of vitellogenin gene expression after 4 days exposure to 1 mg.L<sup>-1</sup> PZ in the branchiopod *Daphnia magna*. However, other endpoints (days to reproductive maturity and offspring per female) in this organism do not seem to be affected by PZ exposure (Kast-Hutcheson et al., 2001 ; Soetaert et al., 2006). For fenimarol, another azole fungicide, Mu and Leblanc (2002b) highlight a decrease of fecundity in female daphnids beginning from 1 µM after 21 days of exposure. Under our exposure conditions, we observed an opposite effect with a significant induction of mean oocyte surfaces exposed from 0.1 to 1,000 µg.L<sup>-1</sup> of PZ, whereas PZ exposure did not seem to affect fecundity for the overall concentrations tested. Since we have previously linked vitellogenin content and oocyte growth in *G. fossarum* (Jubeaux et al. submitted), we conclude that this compound has a specific stimulating effect on secondary vitellogenesis, conversely to responses obtained in daphnids. Moreover, our results indicate no perturbation of the molting process in gammarids and they corroborate findings obtained from daphnids exposed to PZ (Kast-Hutcheson et al., 2001 ; Soetaert et al., 2006). In the present study, the results also revealed that the fungicide PZ affects the percentage of normal embryos in *G. fossarum* by increasing embryonic abnormalities from 0.1 to 1,000 µg.L<sup>-1</sup> in a dose-dependent manner. The same observations were made in *D. magna* where the embryo toxicity of azole fungicides was investigated and revealed that the number of embryonic abnormalities increases after exposure to PZ (Kast-Hutcheson et al., 2001 ; Soetaert et al., 2006) and fenimarol (Mu & Leblanc, 2002b). Even during the development of the juvenile decapod *Liptopenaeus vannamei*, PZ exposure may cause morphological abnormalities of the rostrum, the pereopods, and the uropods (Betancourt-Lozano et al., 2006), suggesting that these fungicides exert toxicity effects in several groups of crustaceans. It is largely accepted that ecdysteroids play a crucial role in embryo development in crustaceans (Subramoniam et al., 1999 ; Subramoniam, 2000) and that the azole fungicides may interfere with these hormones during embryogenesis and development by a direct inhibition of 20-hydroxyecdysone synthesis. In this context, it is interesting to note that Mu and Leblanc (2002) show conclusive results on the anti-ecdysteroid effect of fenimarol. In fact, addition of 20-hydroxyecdysone in the exposure medium limits embryotoxic effects in *D. magna*, reinforcing the hypothesis of the anti-ecdysteroid properties of this compound, as confirmed for PZ in amphipod species.

#### 4.2.3. Pharmaceutical products

Recently, pharmaceutical products have become an environmental concern. They are currently detected and quantified in sewage treatment plants and surface waters; they appear to be the most problematic from an environmental risk point of view because they are present in high concentrations in aquatic systems, and they display the most acute toxicity toward aquatic invertebrates (Ferrari et al., 2003 ; Ferrari et al., 2004 ; Fent et al., 2006 ; Besse & Garric, 2008). Nevertheless, a real lack of information, particularly of data for invertebrate ecotoxicity, makes environmental risk characterization uncertain.

**Benzophenone** BZ has ultraviolet (UV) screen properties, which are extensively used in cosmetics and other products for light stability. As a consequence, UV filter compounds have accumulated in aquatic environments (Brausch & Rand, 2011). Moreover, estrogenic activity has been revealed using *in vitro* and *in vivo* bioassays in fish (Kunz *et al.*, 2006 ; Weisbrod *et al.*, 2007). Regarding the environmental bioavailability and biological activity in exposed organisms, there is a regrettable lack of studies on the effects in crustaceans (*e.g.*, only five search results in Scopus® with “crustacean” and “benzophenone” as keywords). Most studies have mainly focused on the determination of the effect of acute toxicity on survival: for example, in *D. magna* (Fent *et al.*, 2010 ; Sieratowicz *et al.*, 2011), in the juvenile copepod *Acartia tonsa* (Kusk *et al.*, 2011), and to a greater extent in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Ura *et al.*, 2002). To our knowledge, growth, reproductive, and developmental endpoints have been poorly studied in crustacean species. Sieratowicz *et al.* (Sieratowicz *et al.*, 2011) observed growth inhibition in *D. magna* exposed to BZ compounds. According to the literature, the present study is the first to investigate reproductive and developmental responses in a crustacean species exposed to BZ. Here, we show that BZ has a weak effect on oocyte growth (*i.e.*, significant increase of mean oocyte surface at  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), which may not be conclusive on the specific effect of this compound on *G. fossarum* vitellogenesis. Moreover, a previous study (Jubeaux *et al.* submitted) detected no effect on vitellogenin induction in male gammarids. In the present study, the overall BZ concentrations did not affect the fecundity of female gammarids. Finally, in this species, BZ exposure caused embryonic abnormalities for all concentrations tested, indicating a potential of embryotoxicity which must be confirmed in other crustaceans in further studies.

**Cyproterone** The pharmaceutical product CY is recognized as having an anti-androgenic action in vertebrates. According to the literature on CY effects in invertebrates, exposure in the crustacean *D. magna* alternatively reduced growth, number of offspring, and vitellogenin gene expression, whereas no effect on moulting was recorded (LeBlanc & McLachlan, 1999 ; Hannas *et al.*, 2011). In our laboratory, we have observed that CY exposure may induce vitellogenin gene expression (Xuereb *et al.*, 2011b) and protein synthesis (Jubeaux *et al.* submitted) in male *G. fossarum*. Conversely, in the present study, CY exposure did not affect secondary vitellogenesis in female gammarids. No delay or acceleration of the moulting process was recorded in females exposed to CY, which is consistent with responses observed in *D. magna* (LeBlanc & McLachlan, 1999). Studies of CY effects on fecundity and embryonic development are still lacking in the literature for crustaceans. Nevertheless, other effects of anti-androgen compounds such as flutamide and vinclozolin have been investigated in crustaceans. Flutamide affected embryo development negatively in *Daphnia magna* at a concentration of up to  $1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Haeba *et al.*, 2008), and vinclozolin reduced reproductive endpoints such as pregnancy duration and number of offspring and juveniles per female in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Lemos *et al.*, 2010). In the present study, it is difficult to be conclusive on the slight induction of fertility at low concentrations (*i.e.*,  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), whereas a reduction of fertility was observed at high concentrations (*i.e.*,  $1,000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). A high-concentration exposure

of CY (*i.e.*, environmentally nonrealistic) clearly led to specific decrease of oocyte production in *G. fossarum*, but it did not affect oocyte quality with regard to oocyte surface. Yet, it is important to put these results into perspective according to the increase of mortality with 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$  concentrations. Further investigations are required in order to rule on the toxicity of CY in crustaceans, because our preliminary results indicate the potential of this compound to interfere with growth, reproduction, and developmental parameters in crustaceans.

**Carbamazepine** has been widely used since the 1980s to treat epilepsy and a variety of psychiatric disorders as well as neuropathic pain. The  $\text{LC}_{50}$  data available in crustaceans (*i.e.*, three species) focused on branchiopod species, and ranged from 100  $\text{mg.L}^{-1}$  in the branchiopod crustacean *Thamnocephalus platyurus* (*i.e.*, 24-h test duration, (Kim *et al.*, 2009) to above 200  $\text{mg.L}^{-1}$  in the branchiopod *Cerodaphnia dubia*, with a 24-h test duration (Ferrari *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2009), indicating a very slight effect on survival. Ferrari *et al.* (2003) also reviewed reproductive endpoints in the branchiopod *C. dubia* (*i.e.*, 7 days, NOEC equal to 0.64  $\text{mg.L}^{-1}$ ). In this context, there is little information available, and studies investigating nonlethal endpoints in invertebrates are lacking. Among those available, De Lange *et al.* (2006) show that CA exposure may affect the behavioral activity of *G. fossarum*. In the branchiopod *Daphnia pulex*, CA exposure slightly increases the hatch and maturation time as well as the offspring size in females, while a high concentration (*i.e.*, 200  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) causes a delay in juvenile maturity (Lüring *et al.*, 2006). To our knowledge, the present paper is the first to investigate growth, reproductive, and developmental parameters in an amphipod species. CA increased oocyte growth at the lowest concentration (*i.e.*, 0.001  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) and increased oocyte production at the highest concentration (*i.e.*, 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Nevertheless, regarding the rate of normal embryos in *G. fossarum*, the overall tested concentrations, from 0.001 to 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , caused embryonic abnormalities, suggesting that this compound carries a risk of damaging this species. In fish species, the embryotoxicity of this compound has been clearly identified (Nassef *et al.*, 2010 ; van den Brandhof & Montforts, 2010).

**(R)-propranolol** The  $\beta$ -blocker pharmaceutical product RP has been used therapeutically to treat human hypertension since the late 1960s. The  $\text{LC}_{50}$  data available in six crustaceans range from 0.8  $\text{mg.L}^{-1}$  in the branchiopod *Cerodaphnia dubia* to 29.8  $\text{mg.L}^{-1}$  in the amphipod *Hyalella azteca*, with test duration varying from 24 to 48 h (Ferrari *et al.*, 2004 ; Kim *et al.*, 2009). Moreover, Ferrari *et al.* (2003) reviewed reproductive endpoints in the crustacean *C. dubia* (*i.e.*, 7 days, NOEC varying between 9 and 125  $\text{mg.L}^{-1}$ ) and *H. azteca* (*i.e.*, 27 days  $\text{EC}_{50}$  equal to 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ). There are insufficient reports on nonlethal endpoints, especially in crustaceans, in the literature. Stanley *et al.* (2006) assessed the effects of propranolol enantiomers and they showed that reproduction endpoints in *D. magna* may be modulated at low concentrations before decreasing at high concentrations. In the present study, we observed that RP stimulated oocyte growth from 0.1 to 1,000  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , whereas it did not affect oocyte production, suggesting a specific mode of action on secondary vitellogenesis processes in female *G. fossarum*.

### 4.3. Field survey

Important physicochemical differences were observed in the field experiments concerning water temperature (from 11.4 to 20.8°C) and conductivity (from 55 to 490  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) (details in Table 2). In reference sites (*i.e.*, A–E), water temperatures ranged from 11.4 to 17.3°C and conductivity from 130 to 380  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . No significant differences were observed on oocyte growth for the five reference stations and for values obtained under control conditions for C2 moult-stage females. These results revealed that mean oocyte surfaces measured in polluted stations were not impacted compared to reference stations. Differences in fecundity and embryonic abnormalities were observed for the five reference stations. However, the mean fecundity observed for the reference stations was similar to that obtained in previous laboratory studies, with values of 3.9 (in the present study) and 4.2 (Geffard et al., 2010). Our results indicate that the oocyte production of female gammarids exposed to the polluted station M was reduced. The mean percentage of normal embryos in the reference stations was 88%, similar to values reported by Geffard et al. (2010) under control conditions. Our results show that two polluted sites (G and J) significantly impacted the embryonic development of this species.

### 4.4. Ecotoxicological outcomes

**Moulting** in crustaceans is regulated by a multihormonal system but is under the immediate control of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone produced by Y organs. For the toxicity assessment of xenobiotics, the effect of physicochemical parameters, especially water temperature, must be taken into consideration because it is a confounding factor with a strong effect on the moulting process. Under controlled conditions of exposure, an alteration in molting frequency was the only individual marker tracked, especially in frequently moulting species (*i.e.*, branchiopods), to detect the exposure and/or effect of compounds that disrupt normal ecdysteroid signaling (*i.e.*, ecdysone agonist and antagonist) (Mu & Leblanc, 2002b, 2003 ; Palma *et al.*, 2009). In *D. magna* exposed to xenobiotics, an alteration in moult frequency was generally accompanied by an increase in mortality and a decrease in offspring production that may directly reduce population growth (Palma *et al.*, 2009). The *G. fossarum* reproductive test, as defined, assesses molting alterations in the period beginning just before ecdysis to the intermoult stage of the next molting cycle. It would be interesting in further studies to extend the time of exposure to at least one complete molting cycle in order to check whether mortality and reduction in reproduction occurs with exposure to compounds that delay the molt process in *G. fossarum*. Moreover, exoskeleton composition may be a complementary biomarker of molting, at the biochemical level, relevant for more accurately assessing the integrity of the ecdysteroid-signaling pathway in this species. In fact, some compounds may affect the molting process by having no ecdysteroid activity (Palma, 2009), and molecular markers related to the molting process may validate the specific mode of action in the ecdysone pathway.

**Secondary vitellogenesis** mainly takes place at the C2 moult stage, with an increase in the oocyte surface or vitellogenin (*i.e.*, gene expression and protein content) or the number of yolk vesicles and lipid globules increasing considerably compared to the beginning of the reproductive cycle (*i.e.*, stages A and B) (Geffard *et al.*, 2010 ; Simon *et al.*, 2010 ; Xuereb *et al.*, 2011a). The mean number of oocytes decreased normally during the moulting cycle, and the greatest decrease occurred between the C1 and C2 stages, after which the number of oocytes per female remained constant until spawning (Geffard *et al.*, 2010). Consequently, these results underline that secondary vitellogenesis does not take place in the ovaries in all oocytes, and we hypothesize that this is a critical period potentially affected by compounds by reducing or increasing (i) the number of oocytes entering secondary vitellogenesis and/or (ii) vitellogenin synthesis in fat bodies and/or uptake in oocytes from the intermoult period to ecdysis and spawning, resulting in a variable oocyte surface in females. Thus, when stimulation of secondary vitellogenic oocyte growth and production results in an endocrine-disrupting pathway, an inhibition of these parameters may not discriminate between an endocrine-disrupting pathway or a global toxicity (*i.e.*, scope for growth) pathway caused by toxic stress.

**Embryogenesis** : In crustaceans, assessment of population dynamics has not fully integrated embryonic development, although it has been shown in amphibians, for example, that an embryonic or larval stage survival decrease of about 10% would significantly affect population dynamics in natural communities (Birge *et al.*, 1980). Often, embryogenesis is the period in the life cycle of organisms most sensitive to adverse conditions, including pollutant pressure. Moreover, the behavior of amphipods carrying their batch of eggs in the marsupium during embryogenesis greatly facilitates assessment of the effects on reproduction as compared to most fish species (pelagic fertilization) and mussels (pelagic embryogenesis). Sundelin *et al.* (1998) were among the first to define abnormal morphological criteria observed during complete embryonic development in an amphipod species (*i.e.*, *Monoporeia affinis*). The embryonic development of *M. affinis* follows a pattern similar to that in *G. fossarum* (Geffard *et al.*, 2010), and abnormalities have also been recorded in this species in several studies (Lacaze *et al.*, 2011).

## 5. CONCLUSION

The present study confirms the value of the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* as a suitable species for reproductive toxicity testing of a European freshwater amphipod species. The development of specific ED biomarkers related to reproduction in an earlier publication (Geffard *et al.*, 2010) allowed us to propose a relevant and reliable bioassay in this species, with good robustness and reproducibility and a very low variability of control values. Compared to the methodologies available with other crustacean species, the *G. fossarum* reproductive toxicity test can specifically assess the impact of pollutants on various physiological processes related to reproductive success and known to be subjected to specific endocrine regulation. From these experiments, the results do not provide insight into the mechanisms of the effect of various contaminants, *i.e.*, whether a pollutant has an effect on gametogenesis, fecundity,

embryonic development, or moulting. However, this bioassay provides a better understanding of the mode of action of chemicals on hormone-regulated processes in crustaceans, and provides a multivariate toxicity assessment based on population dynamics-related traits.

*Acknowledgement : The authors wish to thank the French National Research Programs PNRPE (Convention n\_CV05000088 and Convention n\_0006942) and the ONEMA for partial financial support.*

## REFERENCES

- Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P. D., Larsen, B. K., Andersen, O. K. and Narbonne, J. F. (2004). "Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols." Marine Environmental Research 58(2-5): 437-441.
- Agency, U. S. E. P. (2001). "Methods for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Leptocheirus plumulosus*." EPA/600/R-01/020. Washington, DC.
- Alonso, A., De Lange, H. J. and Peeters, E. T. H. M. (2009). "Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor." Chemosphere 75(3): 341-346.
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A. and Omholt, S. W. (2003). "Social exploitation of vitellogenin." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 100(4): 1799-1802.
- Baird, D. J., Brown, S. S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R. and Scott, G. I. (2007). "In situ-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses." Integrated Environmental Assessment and Management 3(2): 259-267.
- Baldwin, W. S., Bailey, R., Long, K. E. and Klaine, S. (2001). "Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteroid exposure in *Daphnia magna*." Environmental Toxicology and Chemistry 20(7): 1564-1569.
- Beketov, M. A. and Liess, M. (2008). "Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 55(2): 247-253.
- Besse, J. P. and Garric, J. (2008). "Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation." Toxicology Letters 176(2): 104-123.
- Betancourt-Lozano, M., Baird, D. J., Sangha, R. S. and González-Farías, F. (2006). "Induction of morphological deformities and moulting alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles exposed to the triazole-derivative fungicide tilt." Archives of Environmental Contamination and Toxicology 51(1): 69-78.
- Blanchet-Tournier, M.-F. (1980). Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (PALLAS) : Contrôles endocriens et interactions. Sciences Naturelles. Paris, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6): 175.
- Blockwell, S. J., Pascoe, D. and Taylor, E. J. (1996). "Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Chemosphere 32(9): 1795-1803.
- Borst, D. W., Laufer, H., Landau, M., Chang, E. S., Hertz, W. A., Baker, F. C. and Schooley, D. A. (1987). "Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development." Insect Biochemistry 17(7): 1123-1127.

- Brausch, J. M. and Rand, G. M. (2011). "A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity." Chemosphere 82(11): 1518-1532.
- Carlson, G. R., Dhadialla, T. S., Hunter, R., Jansson, R. K., Jany, C. S., Lidert, Z. and Slawecki, R. A. (2001). "The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist." Pest Management Science 57(2): 115-119.
- Chang, E. S. and Mykles, D. L. (2011). "Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives." General and Comparative Endocrinology 172(3): 323-330.
- Charniaux-Cotton, H. (1954). "Discovery in, an amphipod crustacean (*Orchestia gammarella*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. [Découverte chez un crustacé amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation de caractères sexuels primaires et secondaires mâles.]" Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences 239(13): 780-782.
- Charniaux-cotton, H. (1985). "Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacea." Integrative and Comparative Biology 25(1): 197-206.
- Chen, S., Chen, D. F., Yang, F., Nagasawa, H. and Yang, W. J. (2011). "Characterization and processing of superoxide dismutase-fused vitellogenin in the diapause embryo formation: A special developmental pathway in the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*." Biology of Reproduction 85(1): 31-41.
- Costa, F. O., Neuparth, T., Correia, A. D. and Helena Costa, M. (2005). "Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints." Marine Environmental Research 60(1): 93-110.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S. and Chaumot, A. (2011). "*In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring." Water Research 45(19): 6417-6429.
- De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lüring, M. and Peeters, E. T. H. M. (2006). "Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals." Aquatic Toxicology 78(3): 209-216.
- De Lange, H. J., Peeters, E. T. H. M. and Lüring, M. (2009). "Changes in nentilation and locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in response to low concentrations of pharmaceuticals." Human and Ecological Risk Assessment 15(1): 111-120.
- deFur, P., Crane, M., Ingersoll, C. and Tattersfield, L. (1999). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment. Pensacola, SETAC Press.
- Deng, X., Rempel, M. A., Armstrong, J. and Schlenk, D. (2007). "Seasonal evaluation of reproductive status and exposure to environmental estrogens in hornyhead turbot at the municipal wastewater outfall of Orange County, CA." Environmental Toxicology 22(5): 464-471.
- Dunn, A. M. and Smith, J. E. (2001). "Microsporidian life cycles and diversity: The relationship between virulence and transmission." Microbes and Infection 3(5): 381-388.



- Felten, V., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aujoulat, F., Garric, J. and Geffard, O. (2008). "Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress." Comparative Biochemistry and Physiology, C: Toxicology and Pharmacology 147(2): 189-197.
- Fent, K., Kunz, P. Y., Zenker, A. and Rapp, M. (2010). "A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor." Marine Environmental Research 69(SUPPL. 1): S4-S6.
- Fent, K., Weston, A. A. and Caminada, D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." Aquatic Toxicology 76(2): 122-159.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. and Garric, J. (2004). "Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?" Environmental Toxicology and Chemistry 23(5): 1344-1354.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A. and Garric, J. (2003). "Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac." Ecotoxicology and Environmental Safety 55(3): 359-370.
- Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P. G., Olenin, S., Persson, L. E., Smith, B. D., Špegys, M. and Rainbow, P. S. (2009). "The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor of trace metal bioavailabilities in European coastal waters." Marine Pollution Bulletin 58(1): 39-44.
- Flammarion, P. and Garric, J. (1997). "Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers : A relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker?" Chemosphere 35(10): 2375-2388.
- Folmar, L. C., Denslow, N. D., Rao, V., Chow, M., Crain, D. A., Enblom, J., Marcino, J. and Guillette Jr, L. J. (1996). "Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant." Environmental Health Perspectives 104(10): 1096-1101.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A. and Bach, L. (2006). "The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology." Environmental Toxicology and Chemistry 25(1): 272-280.
- Ford, A. T. (2008). "Can you feminise a crustacean?" Aquatic Toxicology 88(4): 316-321.
- Ford, A. T. and Fernandes, T. F. (2005). "Better the devil you know? A precautionary approach to using amphipods and daphnids in endocrine disruptor studies." Environmental Toxicology and Chemistry 24(5): 1019-1021.
- Geffard, A., Queau, H., Dedourge, O., Biagiante-Risboug, S. and Geffard, O. (2007). "Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology 145(4): 632.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagiante, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. (2010). "Ovarian cycle and embryonic development in

- Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment." Environmental Toxicology and Chemistry 29(10): 2249-2259.
- Gross, M. Y., Maycock, D. S., Thorndyke, M. C., Morritt, D. and Crane, M. (2001). "Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works." Environmental Toxicology and Chemistry 20(8): 1792-1797.
- Gunamalai, V., Kirubakaran, R. and Subramoniam, T. (2004). "Hormonal coordination of molting and female reproduction by ecdysteroids in the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards)." General and Comparative Endocrinology 138(2): 128-138.
- Haeba, M. H., Hilscherová, K., Mazurová, E. and Bláha, L. (2008). "Selected endocrine disrupting compounds (Vinclozolin, Flutamide, Ketoconazole and Dicofof): Effects on survival, occurrence of males, growth, molting and reproduction of *Daphnia magna*." Environmental Science and Pollution Research 15(3): 222-227.
- Hannas, B. R., Wang, Y. H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H. and LeBlanc, G. A. (2011). "Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*)." Aquatic Toxicology 101(2): 351-357.
- Hayward, A., Takahashi, T., Bendena, W. G., Tobe, S. S. and Hui, J. H. L. (2010). "Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans." FEBS Letters 584(6): 1273-1278.
- Hotta, K., Watanabe, T., Kishida, C., Nakamura, Y., Ohkubo, N., Matsubara, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2003). "Seasonality of serum levels of vitellogenin in male Japanese whiting, *Sillago japonica*, reared under natural temperature and photoperiod." Fisheries Science 69(3): 555-562.
- Huang, D. J., Wang, S. Y. and Chen, H. C. (2004). "Effects of the endocrine disrupter chemicals chlordane and lindane on the male green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*)." Chemosphere 57(11): 1621-1627.
- Hyne, R. V. (2011). "Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: Identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants." Environmental Toxicology and Chemistry 30(12): 2647-2657.
- Jasmani, S., Kawazoe, I., Shih, T. W., Suzuki, Y. and Aida, K. (2000). "Hemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*." Fisheries Science 66(3): 535-539.
- Jayasankar, V., Tsutsui, N., Jasmani, S., Saido-Sakanaka, H., Yang, W. J., Okuno, A., Hien, T. T. T., Aida, K. and Wilder, M. N. (2002). "Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*." Journal of Experimental Zoology 293(7): 675-682.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G. C., Sumpter, J. P. and Tyler, C. R. (2002a). "Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents." Biology of Reproduction 66(2): 272-281.

- Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J. G., Kime, D. E., Van Look, K. J. W., McAllister, B. G., Beresford, N., Henshaw, A. C., Brighty, G., Tyler, C. R. and Sumpter, J. P. (2002b). "Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility." Biology of Reproduction 67(2): 515-524.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. and Sumpter, J. P. (1998). "Widespread sexual disruption in wild fish." Environmental Science and Technology 32(17): 2498-2506.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P. and Sumpter, J. P. (1996). "Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals." Environmental Toxicology And Chemistry 15(2): 194-202.
- Jubeaux, G., Audouard-Combe, F., Simon, R., Tutundjian, R., Salvador, A., Geffard, O. and Chaumot, A. (2012a). "Vitellogenin-like proteins among invertebrate species diversity: potential of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development." Environmental Science and Technology 1: 1.
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A. and Geffard, O. (2012b). "Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. ." Aquatic Toxicology(1): 1.
- Kast-Hutcheson, K., Rider, C. V. and LeBlanc, G. A. (2001). "The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*." Environmental Toxicology and Chemistry 20(3): 502-509.
- Kato, Y., Tokishita, S., Ohta, T. and Yamagata, H. (2004). "A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*." Gene 334: 157-165.
- Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M. and Arizono, K. (2009). "Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*)." Journal of Toxicological Sciences 34(2): 227-232.
- Kunz, P. Y., Galicia, H. F. and Fent, K. (2006). "Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish." Toxicological Sciences 90(2): 349-361.
- Kunz, P. Y., Kienle, C. and Gerhardt, A. (2010a). 205: 1-76.
- Kunz, P. Y., Kienle, C. and Gerhardt, A. (2010b). "*Gammarus spp.* in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests " Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 205: 1-76.
- Kusk, K. O., Avdolli, M. and Wollenberger, L. (2011). "Effect of 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1) on early life-stage development of the marine copepod *Acartia tonsa* at different temperatures and salinities." Environmental Toxicology and Chemistry 30(4): 959-966.
- Lacaze, E. (2011). Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. Lyon (France), Université de Metz, UFR Sciences Fondamentales et Appliquées: 368.

- Lacaze, E., Devaux, A., Jubeaux, G., Mons, R., Gardette, M., Bony, S., Garric, J. and Geffard, O. (2011a). "DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: Intrinsic variability and reference level." Science of the Total Environment 409(17): 3230-3236.
- Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S. and Devaux, A. (2011b). "Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay." Environmental Research 111(5): 626-634.
- Laufer, H. and Biccferst, W. J. (2001). "Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development1." American Zoologist 41(3): 442-457.
- LeBlanc, G. A. (2007). "Crustacean endocrine toxicology: A review." Ecotoxicology 16(1): 61-81.
- LeBlanc, G. A. and McLachlan, J. B. (1999). "Molt-independent growth inhibition of *Daphnia magna* by a vertebrate antiandrogen." Environmental Toxicology and Chemistry 18(7): 1450-1455.
- Lemos, M. F. L., van Gestel, C. A. M. and Soares, A. M. V. M. (2010). "Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804)." Chemosphere 78(7): 907-913.
- Li, Z., Zhang, S. and Liu, Q. (2008). "Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity." PLoS ONE 3(4).
- Liu, M., Pan, J., Ji, H., Zhao, B. and Zhang, S. (2011). "Vitellogenin mediates phagocytosis through interaction with FcγR." Molecular Immunology 49(1-2): 211-218.
- Liu, Q. H., Zhang, S. C., Li, Z. J. and Gao, C. R. (2009). "Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*)." Immunobiology 214(4): 257-267.
- Lüring, M., Sargant, E. and Roessink, I. (2006). "Life-history consequences for *Daphnia pulex* exposed to pharmaceutical carbamazepine." Environmental Toxicology 21(2): 172-180.
- Lye, C. M., Bentley, M. G., Clare, A. S. and Sefton, E. M. (2005). "Endocrine disruption in the shore crab *Carcinus maenas* - A biomarker for benthic marine invertebrates?" Marine Ecology Progress Series 288: 221-232.
- Lye, C. M., Frid, C. L. J., Gill, M. E. and McCormick, D. (1997). "Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works." Marine Pollution Bulletin 34(1): 34-41.
- Ma, Y. X., Matsuda, K. and Uchiyama, M. (2005). "Seasonal variations in plasma concentrations of sex steroid hormones and vitellogenin in wild male Japanese dace (*Tribolodon hakonensis*) collected from different sites of the Jinzu River basin." Zoological Science 22(8): 861-868.
- Mak, A. S. C., Choi, C. L., Tiu, S. H. K., Hui, J. H. L., He, J. G., Tobe, S. S. and Chan, S. M. (2005). "Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: Hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression." Molecular Reproduction and Development 70(3): 288-300.

- Martín-Díaz, M. L., Sales, D. and Del Valls Casillas, T. Á. (2004). "Influence of salinity in hemolymph vitellogenin of the shore crab *Carcinus maenas*, to be used as a biomarker of contamination." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 73(5): 870-877.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F. and Blaise, C. (2008). "Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review." Environment International 34(4): 531-545.
- Mazurová, E., Hilscherová, K., Jálová, V., Köhler, H. R., Triebskorn, R., Giesy, J. P. and Bláha, L. (2008a). "Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail *Potamopyrgus antipodarum* in vivo and in the cell bioassays in vitro." Aquatic Toxicology 89(3): 172-179.
- Mazurová, E., Hilscherová, K., Triebskorn, R., Köhler, H. R., Maršálek, B. and Bláha, L. (2008b). "Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans: Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants." Biologia 63(2): 139-150.
- Mu, X. and Leblanc, G. A. (2002). "Environmental anti-ecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*." Journal of Experimental Zoology 292(3): 287-292.
- Mu, X. and LeBlanc, G. A. (2003). "Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity." General and Comparative Endocrinology 129(2): 127-133.
- Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N. and Goto, S. (1999). "Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*." Biochemical and Biophysical Research Communications 264(2): 580-583.
- Nassef, M., Kim, S. G., Seki, M., Kang, I. J., Hano, T., Shimasaki, Y. and Oshima, Y. (2010). "In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*)." Chemosphere 79(9): 966-973.
- Neuparth, T., Correia, A. D., Costa, F. O., Lima, G. and Costa, M. H. (2005). "Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I. Biochemical endpoints." Marine Environmental Research 60(1): 69-91.
- Okumura, T. and Aida, K. (2000). "Hemolymph vitellogenin levels and ovarian development during the reproductive and non reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*." Fisheries Science 66(4): 678-685.
- Palma, P., Palma, V. L., Matos, C., Fernandes, R. M., Bohn, A., Soares, A. M. V. M. and Barbosa, I. R. (2009). "Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*." Chemosphere 74(5): 676-681.
- Pascoe, D., Kedwards, T. J., Maund, S. J., Muthi, E. and Taylor, E. J. (1994). "Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay - The *Gammarus pulex* (L.) precopula separation (GaPPS) test." Water Research 28(2): 369-372.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., Costello, M. J., Wilson, J. G. and Mothersill, C. (2006). "Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 142(1-2): 118-127.

- R Development Core Team (2008). R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., Binelli, A. and Marin, M. G. (2010). "Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments." Water Research 44(6): 1725-1736.
- Rinderhagen M, R. J., Zauke G-P (2000). Crustaceans as bioindicators. In: Gerhardt A (ed) Biomonitoring of polluted water—reviews on actual topics, environmental research forum. 9. Trans Tech Publications—Scitech Publications, Zürich: 161-194.
- Rodgers-Gray, T. P., Smith, J. E., Ashcroft, A. E., Isaac, R. E. and Dunn, A. M. (2004). "Mechanisms of parasite-induced sex reversal in *Gammarus duebeni*." International Journal for Parasitology 34(6): 747-753.
- Rodríguez, E. M., López Greco, L. S., Medesani, D. A., Laufer, H. and Fingerman, M. (2002). "Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis." General and Comparative Endocrinology 125(1): 34-40.
- Roman, Y. E., De Schampelaere, K. A. C., Nguyen, L. T. H. and Janssen, C. R. (2007). "Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment." Science of the Total Environment 387(1-3): 128-140.
- Sanchez, W., Piccini, B., Ditché, J.-M. and Porcher, J.-M. (2008). "Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring." Environment International 34(6): 791-798.
- Sappington TW, O. K., Raikhel AS. Structural characteristics of insect vitellogenin. In: Raikhel AS, Sappington TW (eds) Reproductive biology of invertebrates, vol XII (part A). Science Publishers Inc., Enfield, pp 69–101 (2002).
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K. U., Nagel, R., Köhler, H. R. and Triebkorn, R. (2006). "Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda)." Ecotoxicology 15(2): 143-156.
- Seehus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. and Amdam, G. V. (2006). "Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America 103(4): 962-967.
- Shi, X., Zhang, S. and Pang, Q. (2006). "Vitellogenin is a novel player in defense reactions." Fish and Shellfish Immunology 20(5): 769-772.
- Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M. and Oehlmann, J. (2011). "Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*." Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 46(12): 1311-1319.
- Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O. and Salvador, A. (2010). "Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker

- quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*)." Journal of Chromatography A 1217(31): 5109-5115.
- Smolenaars, M. M. W., Madsen, O., Rodenburg, K. W. and Van Der Horst, D. J. (2007). "Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily." Journal of Lipid Research 48(3): 489-502.
- Soetaert, A., Moens, L. N., Van Der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R. and De Coen, W. M. (2006). "Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 142(1-2): 66-76.
- Solé, M., Barceló, D. and Porte, C. (2002). "Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants." Aquatic Toxicology 60(3-4): 233-248.
- Souty, C., Besse, G. and Picaud, J. L. (1982). "Ecdysone stimulates the rate of vitellogenin release in haemolymph of the terrestrial crustacean isopoda *Porcellio dilatatusbrandt*." STIMULATION PAR L'ECDYSONE DU TAUX HEMOLYMPHATIQUE DE LA VITELLOGENINE CHEZ LE CRUSTACE ISOPODE TERRESTRE PORCELLIO DILATATUS BRANDT 294(22): 1057-1059.
- Stanley, J. K., Ramirez, A. J., Mottaleb, M., Chambliss, C. K. and Brooks, B. W. (2006). "Enantiospecific toxicity of the  $\beta$ -blocker propranolol to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*." Environmental Toxicology and Chemistry 25(7): 1780-1786.
- Subramoniam, T. (2000). "Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis." Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology 125(2): 135-156.
- Subramoniam, T. (2011). "Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans." Fisheries Science 77(1): 1-21.
- Subramoniam, T., Tirumalai, R., Gunamalai, V. and Hoffmann, K. H. (1999). "Embryonic ecdysteroids in a mole crab, *Emerita asiatica* (Milne-Edwards)." Journal of Biosciences 24(1): 91-96.
- Sundelin, B. and Eriksson, A. K. (1998). "Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea." Marine Ecology Progress Series 171: 165-180.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Fujita, T., Mamiya, Y. and Sonobe, H. (1996). "Ovarian and hemolymph ecdysteroids in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (malacostracan crustacea)." General and Comparative Endocrinology 104(2): 129-138.
- Timofeyev, M. A. (2006). "Antioxidant enzyme activity in endemic Baikalean versus Palaearctic amphipods: Tagma- and size-related changes." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology 143(3): 302-308.
- Tong, Z., Li, L., Pawar, R. and Zhang, S. (2010). "Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities." Immunobiology 215(11): 898-902.

- Trisyono, A., Puttler, B. and Chippendale, G. M. (2000). "Effect of the ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the lady beetle, *Coleomegilla maculata*." Entomologia Experimentalis et Applicata 94(1): 103-105.
- Tsukimura, B. and Kamemoto, F. I. (1991). "In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*." Aquaculture 92(C): 59-66.
- Ura, K., Kai, T., Sakata, S., Iguchi, T. and Arizono, K. (2002). "Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*." Journal of Health Science 48(6): 583-586.
- van den Brandhof, E. J. and Montforts, M. (2010). "Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol." Ecotoxicology and Environmental Safety 73(8): 1862-1866.
- Ventura, T., Rosen, O. and Sagi, A. (2011). "From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades." General and Comparative Endocrinology 173(3): 381-388.
- Volz, D. C., Kawaguchi, T. and G.T., C. (2002). "Purification and characterization of the common yolk protein, vitellin, from the estuarine Amphipod *Leptocheirus plumulosus*." Prep. Biochem. & Biotechnol. 23: 298-305.
- Watts, M. M., Pascoe, D. and Carroll, K. (2001). "Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens." Water Research 35(10): 2347-2352.
- Weisbrod, C. J., Kunz, P. Y., Zenker, A. K. and Fent, K. (2007). "Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish." Toxicology and Applied Pharmacology 225(3): 255-266.
- Wouters, R., Piguave, X., Bastidas, L., Calderon, J. and Sorgeloos, P. (2001). "Ovarian maturation and haemolymphatic vitellogenin concentration of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed increasing levels of total dietary lipids and HUFA." Aquaculture Research 32(7): 573-582.
- Xuereb, B., Bezin, L., Chaumot, A., Budzinski, H., Augagneur, S., Tutundjian, R., Garric, J. and Geffard, O. (2011). "Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males." Ecotoxicology: 1-14.
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J. and Geffard, O. (2009a). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys." Aquatic Toxicology 93(4): 225-233.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J. and Geffard, O. (2009b). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration." Aquatic Toxicology 94(2): 114-122.
- Zapata-Perez, O., Del-Rio, M., Dominguez, J., Chan, R., Ceja, V. and Gold-Bouchot, G. (2005). "Preliminary studies of biochemical changes (ethoxycoumarin O-deethylase activities and vitellogenin induction) in two species of shrimp (*Farfantepenaeus duorarum* and *Litopenaeus setiferus*) from the Gulf of Mexico." Ecotoxicology and Environmental Safety 61(1): 98-104.



Zhang, S., Sun, Y., Pang, Q. and Shi, X. (2005). "Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin." Fish and Shellfish Immunology 19(1): 93-95.





# CHAPITRE VI

## 6. SYNTHESE DES RESULTATS ET DISCUSSION GENERALE

---

- 6.1. Développement de la mesure de la Vg chez le gammare
  - 6.2. Généralisation de la méthodologie LC-MS/MS chez les invertébrés
  - 6.3. Pertinence du biomarqueur Vg chez le mâle
  - 6.4. Pertinence des marqueurs de reprotoxicité chez la femelle
-



Ces deux dernières décennies, la prise de conscience des risques encourus par la présence de PE dans les milieux aquatiques a conduit au développement d'outils de diagnostic permettant d'évaluer spécifiquement l'exposition et/ou les effets de ces composés sur les organismes. Si le thème scientifique des PE a été largement étudié chez les vertébrés, peu d'attention a été portée aux invertébrés, qui représentent pourtant plus de 95 % des organismes vivants, se traduisant par un manque d'outils, notamment pour le diagnostic des milieux naturels. Pour une évaluation globale des risques liés à la présence de PE dans les milieux aquatiques, le développement de biomarqueurs chez les invertébrés constitue un enjeu majeur. En effet, en tenant compte de la particularité de leur régulation hormonale, l'étude de l'impact des PE dans les milieux aquatiques ne peut pas se contenter des informations obtenues à partir des études de suivis réalisées chez les vertébrés.

Les études menées sur les PE se sont focalisées sur la régulation hormonale en lien avec la reproduction des organismes, étant donné son rôle crucial dans la dynamique de population.

Chez les vertébrés, ces travaux ont conduit au développement d'outils de diagnostic pouvant être utilisés *in situ*, tels que la mesure de la Vg. Le succès de ces développements chez les poissons a encouragé les écotoxicologues à développer sa mesure chez les invertébrés. Plusieurs approches, plus ou moins directes, ont été proposées pour la mesure de la Vg chez les invertébrés : la méthode ALP, l'utilisation d'anticorps (ELISA) ou l'étude de l'expression de gènes par RT-PCR (revu dans Matozzo *et al.*, 2008). Cependant, bien que plusieurs études aient permis de confirmer l'intérêt de ce biomarqueur chez les mollusques et les crustacés pour l'étude des PE, [1] le développement et la généralisation inter-espèces de la mesure de la Vg chez les invertébrés constituent un des défis méthodologiques en écotoxicologie. Ceci passe par le développement de techniques à la fois fiables et sensibles. [2] La variabilité naturelle des teneurs en Vg ainsi que l'impact de facteurs environnementaux sont peu caractérisés pour les espèces utilisées dans le cadre de la biosurveillance, ceci ne permettant pas une utilisation robuste du biomarqueur Vg *in situ*.

D'autre part, chez les crustacés, l'utilisation spécifique de réponses en lien avec le cycle de reproduction (vitellogenèse et embryogenèse) qui sont parfaitement synchronisées avec le cycle de mue s'avère être une approche pertinente pour évaluer l'impact des PE. En effet, la désynchronisation d'une de ces réponses individuelles par rapport aux autres peut être utilisée comme un indicateur d'une exposition à des PE (LeBlanc, 2007 ; Verslycke *et al.*, 2007). Cependant, la pertinence de cette approche chez les femelles n'a été que très peu étudiée au laboratoire et encore moins dans le milieu naturel.

Le but de ce travail de thèse était de **[1] développer et valider une méthode de quantification de la Vg chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, [2] adapter la mesure de la Vg chez plusieurs groupes d'invertébrés (mollusques, crustacés et insectes) ; [3] évaluer la pertinence de la mesure de la Vg chez le mâle *G. fossarum* comme biomarqueur spécifique de l'exposition à des PE, et [4] étudier l'impact de PE chez la femelle *G. fossarum*.**

## 6.1. Développement de la mesure de la Vg chez le gammare

Le premier objectif de ma thèse a été de mettre au point une méthode protéique pour la quantification de la Vg chez l'amphipode dulçaquicole *Gammarus fossarum* via la spectrométrie de masse. Ces travaux ont abouti au développement et à la validation d'un essai LC-MS/MS permettant de quantifier la Vg chez cette espèce (**Publication n°1**).

### 6.1.1. Choix du modèle biologique

Le crustacé amphipode *Gammarus fossarum* a été choisi comme espèce modèle à plusieurs titres.

[1] Les populations de *Gammarus fossarum* sont très répandues dans les hydrosystèmes européens (Barnard & Barnard, 1983), facilement identifiables, manipulables (maintien au laboratoire, expérimentations laboratoire « du bécher au canal artificiel » et terrain avec des gammares autochtones ou transplantés) et enfin échantillonnables toute l'année (Kunz *et al.*, 2010b).

[2] Sa position clé dans le réseau trophique (action de décomposition et de redistribution de la matière organique) lui confère un rôle fonctionnel important au sein des milieux dulçaquicoles (Macneil *et al.*, 1997 ; MacNeil *et al.*, 2002).

[3] Les gammares sont en effet reconnus pour être sensibles à une large gamme de contaminants (*e.g.*, métaux, pesticides, polluants organiques persistants, perturbateurs endocriniens) et cela dans des scénarios contrastés (*e.g.*, colonne d'eau ou de sédiment ; pression urbaine, agricole ou industrielle). La pertinence écologique et la sensibilité de cette espèce justifient en partie pourquoi elle est utilisée pour le calcul de l'Indice Biologique Global Normalisé (*i.e.*, IBGN) puisque c'est un bon indicateur de la qualité des écosystèmes aquatiques (Rinderhagen *et al.*, 2000).

[4] De nombreux outils écotoxicologiques ont été développés chez cette espèce. Des marqueurs sub-individuels et individuels permettent d'évaluer l'impact de contaminants en fonction de leur mode d'action : la neurotoxicité (Xuereb *et al.*, 2009), la génotoxicité (Lacaze *et al.*, 2010), la dépréciation digestive (Dedourge *et al.*, 2009) ou encore les traits de vie jouant un rôle clé dans la dynamique de populations comme la reproduction (Geffard *et al.*, 2010), l'alimentation (Coulaud *et al.*, 2011) et l'activité locomotrice (Felten *et al.*, 2008).

[5] Enfin, les outils spécifiques de perturbation endocrinienne sont inexistant chez cette espèce. Les connaissances actuelles sur l'endocrinologie des arthropodes permettent pourtant d'affirmer qu'ils disposent d'un système de régulation faisant intervenir principalement des ecdystéroïdes et des terpénoïdes ; ce qui contraste avec les vertébrés. Par ailleurs, bien que les crustacés constituent un groupe de choix pour évaluer l'effet de PE dans les milieux aquatiques, peu d'espèces d'eau douce sont étudiées. **Dans ce contexte, l'amphipode *Gammarus fossarum* se positionne comme un modèle « crustacé » pertinent pour évaluer l'effet de PE dans les hydrosystèmes dulçaquicoles.**

### 6.1.2. Choix de la méthode de mesure de la Vg

Chez *Gammarus fossarum*, la mesure de la Vg repose actuellement sur la mesure d'expression du gène (Xuereb *et al.*, 2011) et la méthode ALP (Gagné *et al.*, 2005).

D'une part, la mesure d'expression du gène a été développée par Xuereb et collaborateurs (2011) en tirant avantage d'une séquence partielle de la Vg disponible dans les banques génomiques pour une espèce proche (*Gammarus pulex*, numéro d'accèsion GenBank : EH275398). Des amorces spécifiques ont pu être définies à partir de cette séquence et ont permis de vérifier l'expression du gène de la Vg chez *Gammarus fossarum* au cours du cycle de reproduction chez les femelles. Bien que cette méthode s'avère être fiable et spécifique de la mesure de la Vg, le dosage des ARNm n'est pas directement représentatif des quantités de protéines exprimées dans l'organisme.

D'autre part, Gagné et collaborateurs (2005) ont développé une méthode indirecte : l'ALP. Cette étude souligne bien que la méthode ALP (guide technique de Gagné & Blaise (2000)) permet de développer un essai Vg générique, chez les invertébrés. Néanmoins, l'application de cette méthode chez les gammarus semble peu fiable et peu spécifique. En effet, l'étude de Gagné et collaborateurs (2005) montre que la mesure ALP sur organisme entier est perturbée par la possible interférence entre la mobilisation du phosphate mesuré et la fixation de la cuticule pré-formée. Ceci souligne le manque de spécificité de cette méthodologie puisque d'autres sources importantes de phosphates peuvent affecter les mesures (Volz *et al.*, 2002).

L'approche conventionnelle est le développement d'immuno-essais tels que l'ELISA ; soit en produisant un anticorps anti-Vg spécifique chez l'espèce d'intérêt, soit en utilisant un anticorps développé à partir d'une autre espèce qui réagit avec l'espèce d'intérêt. D'une part, il n'y a actuellement aucun anticorps anti-Vg disponible chez *G. fossarum*. La difficulté d'induire en grande quantité, de purifier et de caractériser la Vg chez des organismes de petite taille, étape indispensable pour la production d'anticorps, reste une limite importante aux développements d'immuno-essais, notamment chez les gammarus. D'autre part, la difficulté voire l'impossibilité d'appliquer les anticorps développés chez les vertébrés vers les invertébrés, due à la distance phylogénétique entre espèces, est une limite supplémentaire à la généralisation de ce type d'approche. L'application des anticorps n'est pas forcément plus concluante, même en utilisant les anticorps d'espèces phylogénétiquement proches. Par exemple, les anticorps anti-Vg (*i.e.*, amphipode *Leptocheirus plumulosus*, décapode *Palaemonetes pugio*, copépode *Eurytemora affinis*, insecte *Nasonia vitripennis*) ne croisent pas et ne permettent pas de détecter la Vg chez *G. fossarum* (Boulangé-Lecomte, 2011 : communication personnelle - projet PNRPE). Dans la majorité des cas, le développement d'un immunoessai nécessite de produire un anticorps spécifique après purification de la protéine d'intérêt (Volz & Chandler, 2004 ; Ghekiere *et al.*, 2005 ; Auttarat *et al.*, 2006).

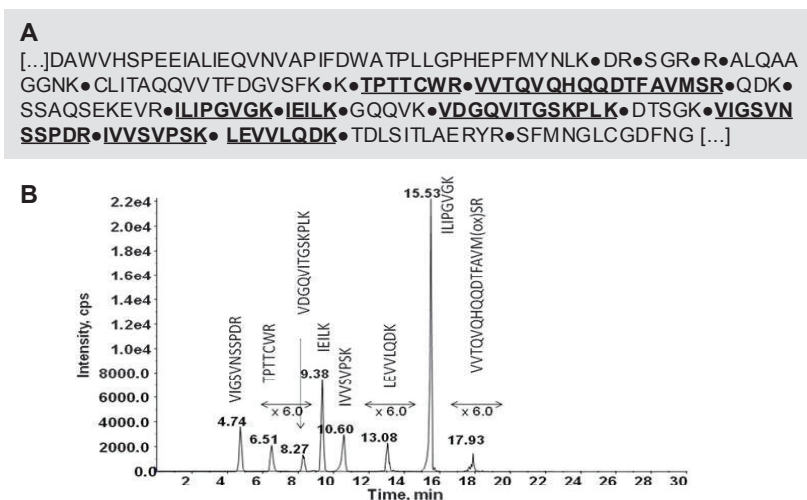
La spectrométrie de masse se positionne comme une démarche alternative. Fortin et collaborateurs (2009) ont fait la preuve de concept de la possibilité d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem pour la quantification absolue d'un biomarqueur du cancer de la prostate avec une spécificité et une sensibilité



équivalente au test ELISA disponible. Récemment, ce type d'approche a été appréhendé en écotoxicologie pour le développement d'une méthodologie de mesure de la Vg chez plusieurs espèces de poissons (Banoub *et al.*, 2003 ; Cohen *et al.*, 2005 ; Wunschel *et al.*, 2005 ; Cohen *et al.*, 2006 ; Cohen *et al.*, 2009 ; Cohen & Banoub, 2010). Le développement de nouvelles méthodologies et stratégies d'analyse de ce type revêt donc un intérêt croissant pour la quantification de biomarqueurs protéiques. Pourtant, ce type d'approche n'a, à l'heure actuelle, pas été appréhendé chez les invertébrés.

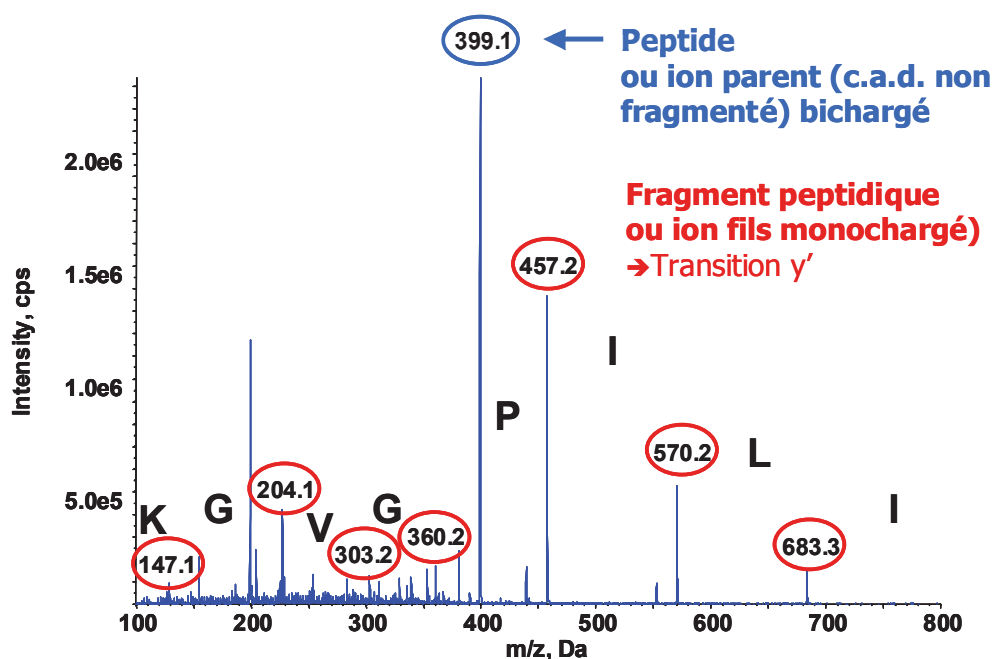
### 6.1.3. Mise en place d'un essai LC-MS/MS robuste pour la quantification de la Vg (Publication n°1)

Tout d'abord, la séquence génomique (n° d'accèsion dans les banques génomiques : GU985184 ; taille : 197 aa) a été traduite en séquence protéique à l'aide d'un logiciel de traduction (Expasy : <http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) permettant de vérifier le bon cadre de lecture des nucléotides. Ensuite, le logiciel MRM Pilot a permis de prédire *in silico* les peptides protéotypiques à rechercher chez *G. fossarum* pour mesurer la Vg à partir de la séquence. Ce logiciel a défini les transitions MRM (unité :  $m/z$ ) à suivre pour chaque peptide (peptides obtenus après clivage de la protéine par la trypsine). Enfin, les transitions MRM prédites par le logiciel ont été suivies chez *G. fossarum* à partir d'un échantillon riche en Vg (ovocytes de femelle en fin de vitellogenèse) dans le but de détecter les peptides les plus sensibles lors de l'analyse LC-MS/MS. Ces travaux ont permis d'identifier les peptides les plus sensibles notamment le peptide ILIPGVGK et les plus aptes pour développer une méthode sensible de quantification de la Vg (Figure 6.1).



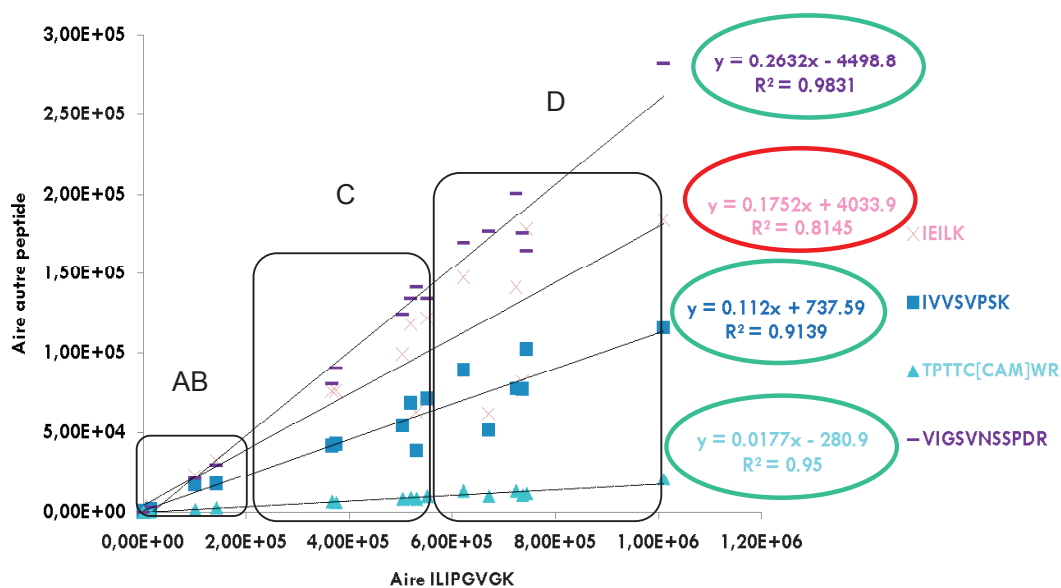
**Figure 6.1.** [A] Prédiction des peptides protéotypiques (via le logiciel MRM Pilot) obtenus après digestion *in silico* de la séquence protéique partielle de *Gammarus fossarum* (numéro d'accèsion dans les banques génomiques : GU). [B] Chromatogramme des peptides (somme des transitions MRM, c.a.d. de l'intensité des ions fils) qui ont été recherchés par LC-MS/MS à partir d'un échantillon riche en Vg (oeufs matures). • : prédiction des sites de clivage après digestion enzymatique de la protéine à la trypsine. Les peptides soulignés correspondent aux huit plus sensibles détectés lors de l'analyse LC-MS/MS.

A noter que la séquence de ces peptides a été systématiquement vérifiée via des spectres de fragmentation MS/MS des peptides (par exemple pour le peptide le plus sensible, ILIPGVGK, sur la **Figure 6.2**).



**Figure 6.2.** Spectre de fragmentation MS/MS du peptide ILIPGVGK. En bleu, le peptide/ion parent ou non fragmenté analysé au niveau du premier quadrupole (Q1) du spectromètre de masse qui est placé en amont du second quadrupole (Q2 = chambre de collision des peptides parents). En rouge, les fragments peptidiques ou ion fils obtenus après fragmentation du peptide parent au niveau du second quadrupole (Q2) et analysés au niveau du troisième quadrupole (Q3).

Bien que la sensibilité des méthodes de mesure soit un critère important, la robustesse d'un essai repose également et principalement sur la fiabilité de la méthode de mesure d'une protéine. Dans ce contexte, parmi les peptides les plus sensibles identifiés chez le gammare, nous avons vérifié la spécificité biologique de 5 peptides (ILIPGVGK ; VIGSVNSSPDR ; IEILK ; IVSVPSK ; TPTTCWR) les plus aptes pour développer un essai LC-MS/MS sensible. Ces peptides ont été mesurés au cours d'un cycle de reproduction complet (c.a.d. des ovocytes à différents stade de vitellogenèse récupérés selon la méthode décrite par Geffard et collaborateurs (2010)) et la corrélation inter-peptides a été étudiée (**Figure 6.3**).



**Figure 6.3.** Dosage « relatif » (exprimé en aire moyenne des pics d'intensité) de 5 peptides et inter-corrélation avec le peptide ILIPGVGK sur des ovocytes à différents stades de mue (soit à différents stades de vitellogenèse). AB : stade de post-mue (A et B), C : stade d'inter-mue (C1 et C2) et D : stade de pré-mue (D1 et D2). 5 peptides les plus sensibles lors de analyse LC-MS/MS : ILIPGVGK > VIGSVNSSPDR > IEILK > IVVSVPSK > TPTTCWR.

Ces analyses ont permis de constater que [1] les quantités relatives de tous les peptides augmentent dans les ovocytes au cours du cycle de mue ; ce qui coïncide avec l'évolution du processus de vitellogenèse (c.a.d. l'accumulation de Vg dans les oeufs au cours de la maturation ovocytaire), [2] la différence entre les quantités relatives mesurées au début et à la fin de la vitellogenèse est la plus grande pour le peptide ILIPGVGK, ce qui a confirmé sa sensibilité analytique par rapport aux autres peptides testés (ILIPGVGK > VIGSVNSSPDR > IEILK > IVVSVPSK > TPTTCWR) et [3] le peptide IEILK est le moins bien corrélé avec le peptide ILIPGVGK et présente une variabilité de mesure plus importante. Ce qui suggère une spécificité moins importante de ce peptide par rapport aux autres pour la mesure de Vg.

Ces résultats ont permis de vérifier que le peptide ILIPGVGK était le plus apte pour développer une méthode de quantification absolue de la Vg par LC-MS/MS en terme de sensibilité analytique et de spécificité biologique. Les étapes menant à la validation de l'essai de quantification du peptide ILIPGVGK par LC-MS/MS permettant de mesurer la Vg chez *Gammarus fossarum* sont plus amplement détaillées dans la **Publication n°1**. La validation de ces étapes nécessitait en premier lieu la synthèse d'un étalon interne (peptide marqué : ILIPGV\*GK) permettant de quantifier de façon absolue la Vg native par le biais d'un ajout dosé de cet étalon dans les échantillons à analyser. A noter, que la mesure de la Vg chez *G. fossarum* a été développée sur le suivi de l'ion fils 2y5 qui est la transition la plus intense du peptide ILIPGVGK (rapport m/z : 398,8(ion parent)/457,3(ion fils), voir sur la **Figure 6.2**. Dans un second lieu, les étapes de validation de la quantification du peptide ILIPGVGK ont inclu l'évaluation de la linéarité de cet essai LC-MS/MS (2,5–25000 pg/mL), de sa reproductibilité intra- et inter-essais (inférieure à 15%) et de

l'effet matrice (positif et inférieur à 10%). La limite de détection de l'essai LC-MS/MS a été estimée à 0.75 pg/mL de Vg.

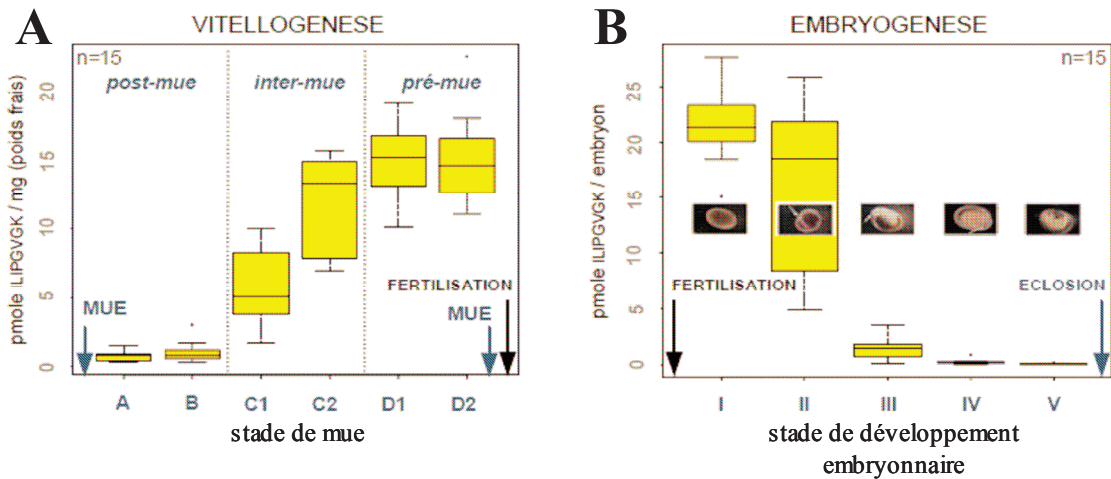
En conclusion, **l'essai LC-MS/MS développé chez *Gammarus fossarum* pour la mesure de Vg se révèle être un outil robuste, sensible, reproductible et fiable pour quantifier de façon absolue cette protéine.**

#### **6.1.4. Etude de la signification fonctionnelle du biomarqueur Vg (Publication n°3)**

Les premiers travaux qui ont fait suite à la validation de l'essai LC-MS/MS se sont concentrés sur l'étude de la variabilité naturelle de la Vg au cours de la maturation ovocytaire (où le processus de vitellogenèse prend place) et du développement embryonnaire (où le vitellus qui a été stocké dans les oeufs par la femelle est ensuite métabolisé par les embryons afin d'avoir accès aux ressources énergétiques nécessaires à leur développement).


Dans un premier temps, on a pu constater que la teneur du peptide ILIPGVGK augmente de façon croissante au cours de l'ovogenèse (**Figure 6.4.A**), avec en particulier une forte production pendant la période d'inter-mue correspondant à la mise en place du processus de vitellogenèse secondaire notamment chez les amphipodes (Charniaux-Cotton, 1973 ; Meusy *et al.*, 1974 ; Blanchet-Tournier, 1980). De façon analogue, Xuereb et collaborateurs (2011) ont montré que l'expression de gène de la Vg chez *G. fossarum* atteignait un maximum à la fin de la période d'inter-mue (stade C2) et au début de la période de pré-mue (stade D1).

Dans un second temps, on a observé que les quantités de peptide ILIPGVGK qui ont été stockées dans les oeufs par la femelle au cours de la vitellogenèse diminuaient lors du développement embryonnaire (**Figure 6.4.B**). La diminution la plus forte intervient entre le stade I et le stade III qui correspondent à une période très active de l'organogenèse. Il n'existe quasiment pas de données dans la littérature concernant le suivi des quantités de Vg au cours du développement des embryons chez les invertébrés. Chez la crevette *Macrobrachium borellii*, Garcia et collaborateurs (2008) ont mesuré la Vg dans les embryons à différents stades de maturation et ont également constaté que la plus forte diminution de Vg prenait place au cours de l'organogenèse.



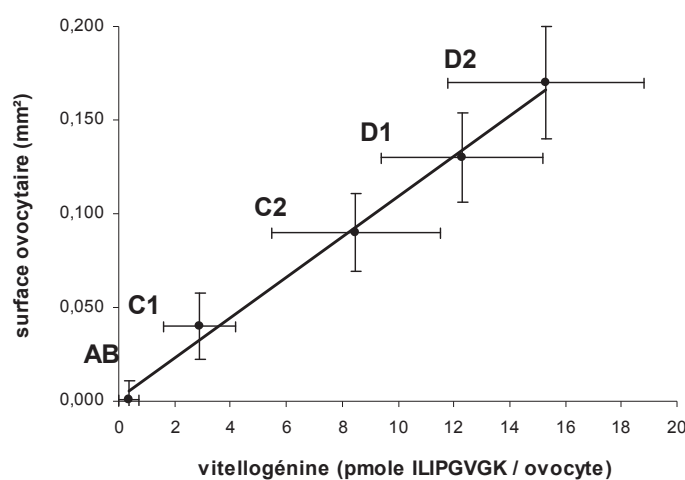
**Figure 6.4.** Mesure de la Vg (exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK /mg de poids frais) chez *Gammarus fossarum* [A] chez la femelle au cours de la vitellogenèse (exprimée en fonction des stades de mue A, B, C1, C2, D1 et D2), [B] chez les embryons au cours de l’embryogenèse (exprimée en fonction des stades de développement embryonnaire I, II, III, IV et V).

L’étude des différences inter-sexe a montré que, par rapport aux mâles, il y a environ 30 fois plus de Vg chez les femelles en début de vitellogenèse et 750 fois plus de Vg chez les femelles en fin de vitellogenèse secondaire (Figure 6.5). Des différences intersexe ont été observées chez plusieurs groupes d’invertébrés (e.g., arthropodes : Volz & Chandler, 2004 ; Hwang et al., 2010 ; Longyant et al., 2000 ; Prakash et al., 2001 ; Dumas et al., 1982 ; Friesen & Kaufman, 2002 ; mollusques : Boutet et al., 2008 ; Matsumoto et al., 2003 ; Osada et al., 2004). Pourtant, plusieurs études ne montrent pas de différences inter-sexe en mesurant la Vg par ALP ou PCR (*Mytilus edulis* : Aarab et al., 2004 ; Puinean et al., 2006 ; Puinean & Rotchell, 2006 ; Ciocan et al., 2010 ; *Dreissena polymorpha* : Quinn et al., 2006 ; Quinn et al., 2010). Ceci souligne la nécessité de valider la fonction de cette protéine en étudiant sa variabilité au cours du cycle de reproduction des femelles ou en caractérisant les différences inter-sexe entre individus.

	pmole ILIPGVGK / mg	Ratio / ♂
♂	0.02 +/- 0.02	
♀ Stade A	0.76 +/- 0.19	≈ 35
♀ Stade D2	16.6 +/- 1.7	≈ 760

**Figure 6.5.** Teneurs en Vg (exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK /mg de poids frais) mesurées chez la femelle en début ou en fin de vitellogenèse (respectivement, stades de mue A et D2) et chez le mâle et, le ratio femelle/mâle (différences inter-sexe).

Chez les poissons, il a été démontré que la qualité et la quantité des oeufs produits sont directement liées à la production de la Vg (Tyler & Sumpter, 1996 ; Arukwe & Goksøyr, 2003). Dans les travaux menés chez *G. fossarum*, nous avons également montré que la surface des ovocytes et la production de Vg au cours du cycle de reproduction de la femelle étaient très fortement corrélées (**Figure 6.6**). Ces résultats montrent que la synthèse de la Vg chez la femelle et la croissance des ovocytes sont des processus corrélés chez le gammare. Tyler & Sumpter (1996) ont montré que cette protéine est la constituante principale des oeufs, représentant plus de 90% du volume final. Par conséquent, nous avons constaté que la mesure de la Vg chez *G. fossarum* est un bon indicateur de la qualité des ovocytes, mais également que la mesure « simple » des surfaces des ovocytes est un indicateur pertinent et robuste pour le suivi de la vitellogénèse secondaire .



**Figure 6.6.** Corrélation entre la mesure de Vg (exprimée en pmole ILIPGVGK / ovocyte) et la mesure de surface des ovocytes (exprimée en mm<sup>2</sup>) au cours d'un cycle complet de reproduction (exprimé en terme de stade de mue : AB (période de post-mue), C1 et C2 (période d'inter-mue), D1 et D2 (période de pré-mue)). Figure réalisée à partir des données de la Publication n°2. Corrélation linéaire : R<sup>2</sup> ajusté = 0,89).

En conclusion, [1] l'évolution des teneurs en Vg a été décrite chez *Gammarus fossarum* au cours de la vitellogénèse et de l'embryogenèse et de fortes différences inter-sexe ont été observées. De plus, la mesure de Vg est fortement corrélée avec la croissance gonadique. Ces résultats ont confirmé la fiabilité de l'essai LC-MS/MS pour la quantification de la Vg chez le gammare et la nécessité de passer par ce type d'approche, descriptive des fonctions attendues de la Vg, afin de valider la fonction, [2] la mesure de Vg peut être appréhendée comme un indicateur de la qualité des ovocytes ou comme un biomarqueur spécifique de l'exposition à des PE.

## 6.2. Généralisation de la LC-MS/MS chez les invertébrés (Publication n°2)

L'écotoxicologie est appelée à fournir des données relatives aux effets de substances toxiques sur les écosystèmes afin de répondre à l'évaluation du risque écologique et à la gestion de l'environnement. Dans ce contexte, un des principaux défis est de fournir des informations permettant d'évaluer les effets toxiques pour l'ensemble des taxons, représentant la biodiversité des écosystèmes et notamment au regard de la sensibilité inter-spécifique aux contaminants (Von Der Ohe & Liess, 2004 ; Celandier *et al.*, 2011). Comme nous l'avons déjà vu, les différences de sensibilité aux PE reflètent la spécificité des systèmes de régulation hormonale chez les grands groupes d'invertébrés (arthropodes et mollusques) et qui peut être expliqué par les divergences moléculaires au cours de l'évolution. La variabilité des réponses suite à l'exposition à des PE justifie le développement d'approches multi-espèces dans les programmes de suivi environnemental, cela en utilisant des espèces sentinelles rattachées à différentes lignées phylogénétiques. Ces questions sont d'autant plus importantes chez les invertébrés pour lesquels la divergence moléculaire est d'autant plus significative que chez les vertébrés, à cause d'un taux de diversification plus élevé et d'une période d'évolution beaucoup plus longue (Douzery *et al.*, 2004 ; Peterson *et al.*, 2004 ; Dunn *et al.*, 2008).

Un des défis en écotoxicologie est de mettre au point une méthodologie de mesure de Vg pour un grand nombre d'invertébrés sentinelles. D'une part, la méthode ALP a été largement utilisée pour la mesure de Vg car c'est une méthodologie générique permettant un développement simple et rapide chez un invertébré d'intérêt. Cependant, cette méthode indirecte est peu spécifique et se montre parfois peu fiable. D'autre part, des méthodes protéiques plus spécifiques et sensibles comme les immunoessais (ELISA) sont limitées dans leur utilisation par la difficulté à produire des anticorps anti-Vg spécifiques et par le faible potentiel de transférabilité des anticorps. Dans ce contexte, la spectrométrie de masse se positionne comme une approche pertinente pour la mesure de biomarqueur protéique et s'avère être pertinente pour développer rapidement la mesure de Vg [1] chez des espèces pour lesquelles on dispose d'une séquence de la Vg, même partielle (à l'image de la démarche proposée chez *Gammarus fossarum*) et [2] chez des espèces non séquencées pour lesquelles des espèces phylogénétiquement proches ont été séquencées, en s'appuyant sur le principe que certains peptides Vg-spécifiques peuvent être conservés au cours de l'évolution des espèces.

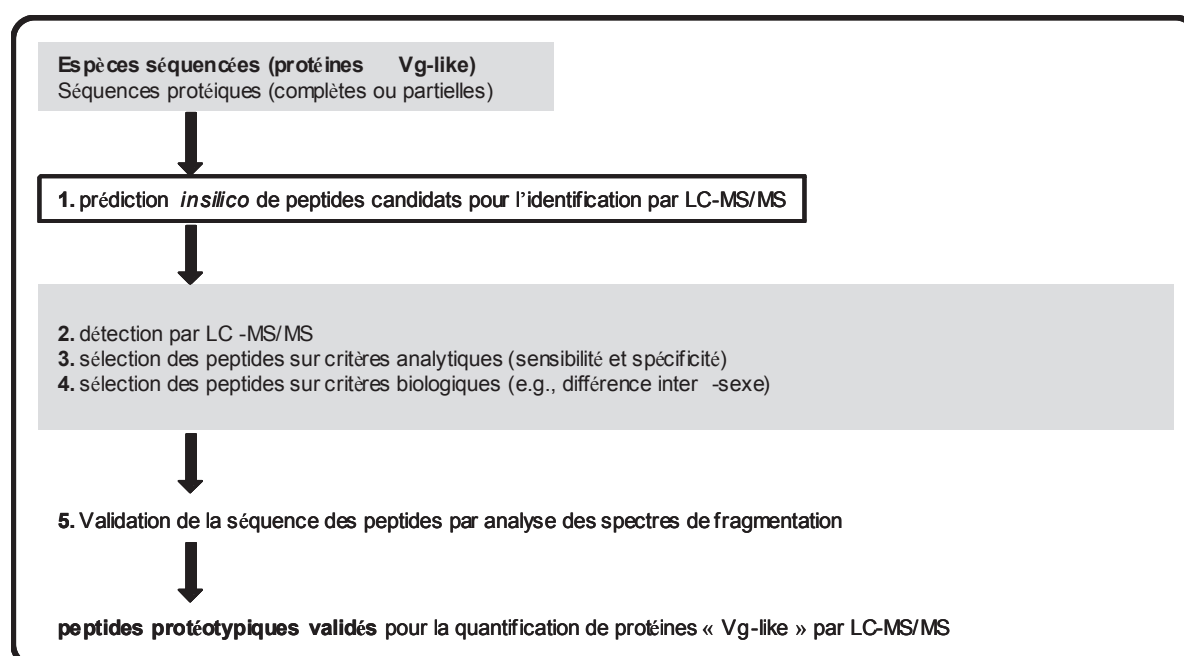
Le second objectif de ma thèse a donc été d'évaluer la pertinence de la spectrométrie de masse (LS-MS/MS) pour **[1] valider chez différents grands groupes d'invertébrés (mollusques, crustacés, insectes), chez qui la séquence de la Vg est disponible, que l'identification et la sélection de peptides protéotypiques par LC-MS/MS sont une démarche simple et rapide à mettre en place et [2] étudier le potentiel de la transférabilité inter-spécifique de cette méthode de quantification : (a) en recherchant la présence des peptides protéotypiques identifiés pour une espèce séquencée chez des espèces phylogénétiquement plus ou moins proches et non séquencées et (b) en améliorant la**

probabilité d'identifier des peptides protéotypiques chez des espèces non séquencées ; ceci en tirant avantage des alignements de séquences dans les zones les plus conservées qui peuvent prédire et identifier des peptides chez des espèces non séquencées.

### 6.2.1. Développement d'un essai LC-MS/MS pour la mesure de Vg chez les invertébrés

Sur le modèle des travaux réalisés chez *Gammarus fossarum* (cf. section 6.1.3) , le but de ces travaux a été de confirmer, avec d'autres espèces séquencées, l'intérêt de la spectrométrie de masse pour une identification simple et rapide de peptides sensibles et spécifiques de la Vg lorsque l'on dispose d'une séquence de la Vg (même partielle) dans les banques génomiques à accès libre (GenBank, EMBL) ; la perspective de ces travaux étant de faciliter la mise au point d'un essai LC-MS/MS pour quantifier la Vg chez ces espèces.







Nous avons donc sélectionné six espèces d'intérêt écotoxicologique (marine, dulçaquicole ou terrestre) appartenant à différents groupes d'invertébrés : deux mollusques bivalves (*Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis*), trois crustacés (cladocère : *Daphnia magna* ; copépode : *Lepeophtheirus salmonis* ; isopode : *Armadillidium vulgare*) et un insecte diptère (*Drosophila melanogaster*). La démarche utilisée pour l'identification et la validation des peptides spécifiques de la Vg, candidats pertinents pour le développement d'un essai LC-MS/MS, est présentée sur la **Figure 6.7** reprise et plus amplement et détaillée dans la **Publication n°2**.



**Figure 6.7.** Stratégie d'identification et de validation des peptides spécifiques de la Vg en cinq étapes appliquées pour les six espèces étudiées, pour lesquelles une séquence partielle ou complète de la Vg est disponible dans les banques de données génomiques.



Les séquences génomiques ont tout d'abord été récupérées dans les banques génomiques et traduites en séquences protéiques via le logiciel « Expasy ». Ensuite, pour chaque espèce, le logiciel MRM Pilot a permis de prédire *in silico* les transitions MRM des peptides à rechercher à partir de la séquence de Vg (Etape 1). Les transitions MRM prédites ont été recherchées dans des échantillons riches en Vg (femelle : gonade ou organisme entier en fonction de l'espèce) et des échantillons pauvres en Vg (mâle : gonade ou organisme entier, ou juvénile). Ces analyses ont permis de sélectionner les peptides en fonction [1] de leur sensibilité analytique et [2] de leur spécificité biologique (sur la base des différences inter-sexe) (Etapes 2, 3 et 4). Enfin, la séquence des peptides a été validée via des spectres de fragmentation (Etape 5). Ces travaux ont permis d'identifier plusieurs peptides d'intérêt pour les six espèces étudiées (Figure 6.8).

	<u>Espèce</u> <u>n° de la séquence (taille)</u>	Nombre de peptides prédits	→	Nombre de peptides validés	Proportion de peptides validés / peptides prédits
Mollusques	 <i>Crassostrea gigas</i> BAC22716 (4.749 pb)	114		44	39 %
	 <i>Mytilus edulis</i> AAT72932 (711 pb)	15		1	7 %
Crustacés	 <i>Armidillidium vulgare</i> BAB03280 (163 pb)	15		8	53 %
	 <i>Daphnia magna</i> AB114859 (6.325 pb)	170		59	35 %
	 <i>Lepeophtheirus salmonis</i> EF490956 (4.747 pb)	239		161	67 %
Insecte	 <i>Drosophila melanogaster</i> FBgn0004045 (1.570 pb)	72		16	22 %

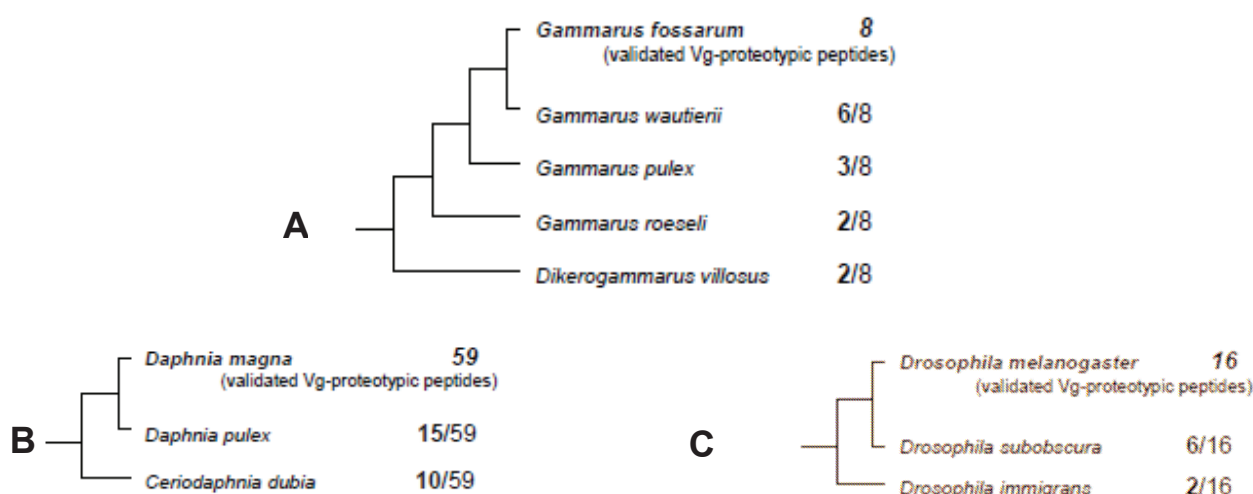
**Figure 6.8.** Bilan du nombre de peptides prédits et de peptides validés ainsi que de la proportion de peptides validés par rapport au nombre de peptides prédits chez les six espèces d'invertébrés.

Ces travaux ont démontré et confirmé la facilité et la rapidité d'identification de peptides spécifiques de la Vg à partir des séquences disponibles dans les banques génomiques ; ceci dans le but de mettre au point des essais LC-MS/MS à la fois fiables et performants, permettant de quantifier la Vg chez des invertébrés d'intérêt écotoxicologique. En seulement six semaines, des peptides candidats pour mesurer la Vg ont été identifiés chez ces six espèces d'invertébrés. **La LC-MS/MS est donc un outil robuste qui permet une identification simple et rapide de peptides protéotypiques chez les espèces séquencées en vue du développement d'une méthode de mesure de la Vg.**

### 6.2.2. Potentiel de généralisation de l'essai LC-MS/MS

Le but de ces travaux a été d'évaluer la pertinence de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) pour identifier des peptides spécifiques de la Vg chez des espèces pour lesquelles aucune séquence de Vg n'est disponible. En effet, parce que les essais LC-MS/MS sont basés sur la mesure de peptides (généralement de 6 à 20 acides aminés) et que les contraintes fonctionnelles sont à l'origine de la conservation de certains motifs peptidiques entre espèces, nous avons montré que l'approche LC-MS/MS pouvait être généralisable à un ensemble d'espèces non séquencées à partir des séquences Vg disponibles. L'étude de la généralisation de l'essai LC-MS/MS chez les invertébrés s'est articulée autour de trois axes.

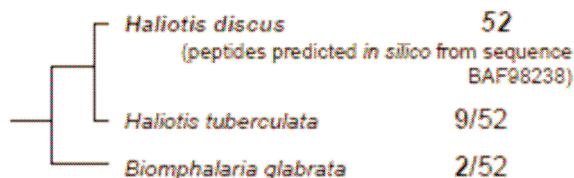
[1] Le premier axe d'étude a été d'évaluer si les peptides validés chez une espèce à partir de sa séquence pouvaient être directement utilisables chez des espèces phylogénétiquement proches. Pour cela, trois groupes d'espèces ont été appréhendées : les crustacés amphipodes, les crustacés cladocères et les insectes diptères. Ces travaux ont confirmé que certains peptides Vg validés chez *Gammarus fossarum*, *Daphnia magna* et *Drosophila melanogaster* pouvaient être directement utilisés pour développer la mesure de Vg chez des espèces non séquencées et phylogénétiquement proches : quatre espèces de gammares, deux espèces de daphnies et deux espèces de drosophiles (**Figure 6.9**).



**Figure 6.9.** Transférabilité et validation des peptides spécifiques de la Vg chez les espèces séquencées (*Gammarus fossarum*, *Daphnia magna* et *Drosophila melanogaster*) à des espèces de gammares (A), de daphnies (B) et de drosophiles (C) non séquencées.

[2] Le deuxième axe d'étude a été d'évaluer si la séquence de la Vg chez une espèce pouvait être directement utilisée pour identifier des peptides chez une ou plusieurs espèces voisines d'intérêt écotoxicologique et sans séquence de Vg connue. Ici, deux gastéropodes ont été visés (*Haliotis tuberculata* et *Biomphalaria glabrata*) à partir de la seule séquence de gastéropode disponible (*Haliotis*

*discus*); ce qui a permis de valider plusieurs peptides spécifiques de la Vg chez deux gastéropodes étudiés (**Figure 6.10**)



**Figure 6.10.** Transférabilité et validation des peptides prédits *in silico* à partir de la séquence du gastéropode *Haliotis discus* chez deux espèces de gastéropodes non séquencées (*Haliotis tuberculata* et *Biomphalaria glabrata*).

[3] Enfin, un troisième et dernier axe d'étude a été d'évaluer l'intérêt d'une démarche qui consiste à utiliser les outils de bioinformatique ainsi que les séquences disponibles dans les banques génomiques pour prédire les combinaisons potentielles de peptides chez une espèce non séquencée ; ceci en effectuant des alignements de séquences avec les espèces séquencées les plus proches. Cette démarche peut s'avérer intéressante dans les zones conservées où seulement quelques positions d'acides aminés peuvent varier entre plusieurs espèces.

Afin de vérifier la pertinence de ce type d'approche, nous avons recherché un peptide identifié chez *Drosophila melanogaster*, mais qui avait été perdu au cours de l'évolution chez *D. subobscura* (résultats de l'axe 2), le peptide LENMNLER. Un alignement de séquences de sept espèces de drosophiles (*D. americana*, *grimshawi*, *melanogaster*, *montana*, *novamexicana* et *virilis*) a permis d'avoir une idée de la variabilité de ce motif peptidique dans la phylogénie. Pour ce peptide, il y avait seulement 8 combinaisons possibles dont celle qui n'a pas été retrouvée (LENMNLER). La recherche des sept combinaisons restantes a permis de retrouver le peptide spécifique de la Vg chez *D. subobscura* : LENMSLEK, soit deux acides aminés modifiés sur les huit qui le constituent. Le fait d'avoir pu retrouver ce peptide montre que ce concept d'identification de peptides spécifiques d'une protéine est pertinent à partir des alignements de séquences et de la recherche par LC-MS/MS des combinaisons de peptides déduites.

Ces expériences ont validé dans un premier temps l'intérêt de la spectrométrie de masse pour le développement rapide de biomarqueur chez des espèces pour lesquelles la séquence, même partielle, de la protéine d'intérêt est connue. Dans un second temps, en tirant partie de la conservation partielle des protéines entre espèces, la spectrométrie de masse a permis d'une part d'utiliser les peptides validés chez une espèce séquencée sur des espèces phylogénétiquement proches et d'autre part, de développer et de proposer une méthode de mesure de la Vg chez des espèces et groupe d'espèces non séquencés comme les gastéropodes. Toutefois, dans le cas de la Vg qui est une protéine moyennement conservée, la transférabilité de cette méthode reste réalisable pour des espèces phylogénétiquement proches. Ce type d'approche pourrait être d'autant plus performant pour généraliser la mesure de protéines hautement

conservées, tels que les récepteurs nucléaires (e.g., EcR chez les arthropodes). **En conclusion, la spectrométrie de masse est un outil performant et fiable pour le développement rapide d'une méthode de dosage protéique à partir des banques de données génomiques et pour la généralisation de ces méthodes.**

### **6.3. Pertinence du biomarqueur Vg chez le mâle (Publication n°3)**

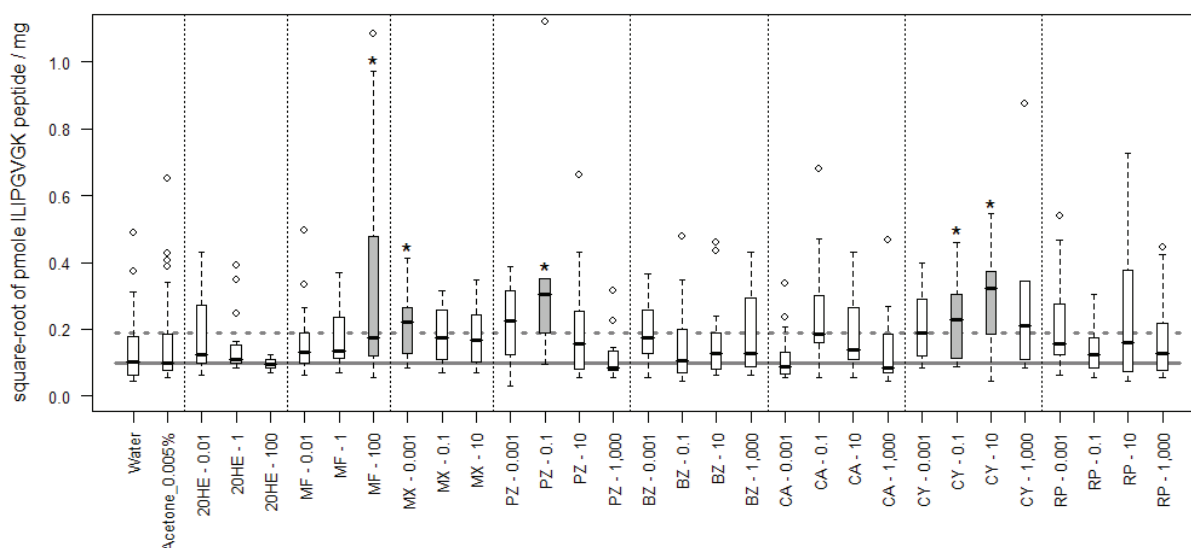
Comme souligné par Ford (2008), la majorité des études utilisant la mesure de Vg chez les crustacés s'est focalisée chez les femelles. Ces études montrent que la synthèse de Vg chez ces organismes est sensible à différentes classes de contaminants (e.g., composés oestrogéniques, pesticides, métaux). Pourtant, les femelles présentent des fluctuations naturelles de la Vg au cours du cycle de reproduction (e.g., Okumura & Aida, 2000 ; Xuereb *et al.*, 2011). L'interprétation fiable et précise des données obtenues requière donc une parfaite connaissance du cycle de reproduction chez les crustacés ; ceci afin de faire la distinction entre des changements naturels et ceux qui sont dus spécifiquement à l'impact de substances chimiques (e.g., Xuereb *et al.*, 2011). De plus, la Vg est une protéine naturellement produite chez les femelles et sa modulation quantitative ne peut être directement reliée à une exposition spécifique à des PE. En effet, ceci peut être le résultat d'effets indirects comme par exemple, une déplétion énergétique impactant le cycle de mue ou de reproduction.

Comparativement, l'utilisation du biomarqueur Vg chez les mâles paraît plus pertinente pour évaluer l'exposition spécifique à des PE puisqu'une induction de Vg indique spécifiquement la présence de contaminants de type PE. Pourtant, relativement peu d'études ont développé et proposé la mesure de Vg comme marqueur spécifique de la perturbation endocrinienne chez les crustacés mâles (e.g., Xuereb *et al.*, 2011 chez *Gammarus fossarum* ; Sanders *et al.*, 2005 chez *Palaemon elegans*). Dans ce contexte, le troisième objectif de ces travaux de thèse a été d'évaluer le potentiel d'utilisation de la mesure de Vg chez le mâle ainsi que sa pertinence comme marqueur spécifique de l'exposition à des PE. Pour répondre à cet objectif de ma thèse, **[1] des expérimentations ont été réalisées au laboratoire en conditions contrôlées afin d'évaluer l'intérêt du biomarqueur Vg pour identifier des substances modèles capables d'induire la synthèse de Vg chez ces organismes et ; [2] préalablement à l'application du biomarqueur Vg sur le terrain, l'impact de certains facteurs confondants (biotiques et environnementaux) sur le niveau de base de Vg a été étudié ; et [3] des transplantations d'individus ont été réalisées sur le terrain dans des sites peu à fortement contaminés afin d'évaluer l'intérêt du biomarqueur Vg.**

#### **6.3.1. « Screening » de substances au laboratoire**

Le but de ces travaux a été d'évaluer via des expositions au laboratoire à des substances modèles l'intérêt de la mesure de la Vg comme biomarqueur spécifique des PE chez *G. fossarum*.

Des mâles standards (taille homogène) ont donc été exposés en conditions contrôlées au laboratoire pendant 21 jours à plusieurs substances modèles incluant deux hormones de crustacés (la 20-hydroxyecdysone et le méthyle-farnesoate), deux pesticides dont un insecticide (le méthoxyfénoside) et un fongicide (le propiconazole) et enfin des produits médicaux (la carbamazépine, le R-propranolol, la cyprotérone et la benzophénone) (**Figure 6.11**)



**Figure 6.11.** Teneurs en Vg (exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK/mg) chez les gammarus mâles après 21 jours d'exposition à 8 substances modèles : 20-hydroxyecdysone (20HE), méthyle-farnesoate (MF), méthoxyfénoside (MX), propiconazole (PZ), benzophénone (BZ), carbamazépine (CA), cyprotérone (CY) et R-propranolol (RP). Témoin eau = « water »; Témoin solvant = « acétone 0.005% ». Concentrations d'exposition exprimées en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , allant de 0,001 à 1000 en fonction de la substance testée.

Nous avons constaté que d'une part, la 20HE n'affectait pas la synthèse de Vg alors que d'autre part, le MF provoquait une induction significative de la Vg chez le gammarus. Le MX, un analogue de synthèse du 20HE pouvant se fixer au récepteur EcR chez les insectes lépidoptères (Carlson *et al.*, 2001), a été capable d'induire la synthèse de Vg chez les mâles exposés. Il n'y a pas de données dans la littérature pour comparer les réponses Vg obtenues chez *Gammarus fossarum*. Pour le PZ, nous avons observé une augmentation de la synthèse de Vg. Ce pesticide azolé, très largement utilisé dans l'agriculture (fongicide et antimicrobien systémiques), n'est pas du tout étudié à l'exception d'une récente étude chez la daphnie (*Daphnia magna*) qui a montré que l'expression du gène de la Vg était réprimée chez la femelle (Soetaert *et al.*, 2006).

Après l'étude de l'impact de certains pesticides et d'hormones de crustacé, ces travaux de thèse ont permis de s'intéresser à une autre classe de contaminants : les produits médicaux. On dispose de très peu d'informations sur l'impact de ces produits de synthèse chez les invertébrés en terme de perturbation endocrinienne alors qu'ils sont couramment détectés dans les effluents de stations d'épuration (Ferrari *et al.*, 2003 ; Fent *et al.*, 2006). Tout d'abord, deux substances actives de médicaments ont été étudiées : le

R-propranolol (un beta-bloquant) et la carbamazépine (un anti-épileptique). L'exposition à ces substances n'a pas entraîné l'induction de Vg chez les mâles. La benzophénone est une substance largement utilisée que ce soit dans les encres d'imprimerie ou les produits cosmétiques/pharmaceutiques et qui a été détectée en quantité importante dans les stations d'épuration (Miège *et al.*, 2009). Pourtant, la benzophénone n'est que très peu étudiée chez les invertébrés. Ces travaux n'ont pas révélé d'induction de Vg chez les mâles exposés à cette substance. Enfin, la cyprotérone qui est probablement la substance la plus étudiée en terme de perturbation endocrinienne (Kiparissis *et al.*, 2003 ; Sharpe *et al.*, 2004), a provoqué une induction significative de la Vg chez les organismes exposés. Ces travaux corroborent ceux de Xuereb et collaborateurs (2011) qui ont montré l'augmentation de l'expression du gène Vg par RT-PCR suite à l'exposition à cette substance de *G. fossarum*.

En conclusion, les expositions à des PE potentiels qui ont été menées au laboratoire chez *Gammarus fossarum* indiquent clairement que les inductions de Vg chez les mâles soulignent une perturbation endocrinienne chez les organismes exposés qui peuvent conduire à des niveaux de Vg similaires à des femelles en vitellogenèse primaire (stade de mue AB, supérieur à 1 pmole de peptide ILIPGVGK / mg). Pourtant, il est difficile de conclure sur une bonne sensibilité de ce biomarqueur chez les mâles. En effet, le facteur d'induction le plus important (10 fois le niveau mesuré dans les contrôles) est très faible comparé à ce que l'on observe classiquement chez les poissons (plus de 1000 fois le niveau mesuré dans les contrôles, e.g., Sumpter & Jobling, 1995). L'hypothèse sous-jacente aux inductions de Vg chez les gammares mâles est la perturbation de la voie de régulation de l'hormone androgène qui réprime normalement la synthèse de Vg (LeBlanc, 2007).

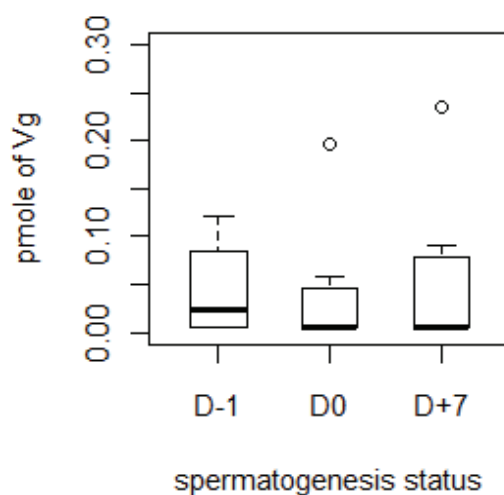
### **6.3.2. Variabilité intrinsèque et application *in situ***

Le but de ces travaux a été de caractériser via des expérimentations au laboratoire et sur le terrain (encagement d'organismes sur des sites de référence), la variabilité naturelle du taux de Vg chez des mâles de taille homogène en réponse à des facteurs biotiques et abiotiques (environnementaux). Ces travaux ont été réalisés dans le but de pouvoir définir des valeurs de référence du niveau de Vg chez des organismes standardisés et transplantés sur le terrain pour évaluer la présence de PE sur des sites peu à fortement contaminés.

#### **6.3.2.1. Facteur biotique : le stade de spermatogenèse**

Dans le but de limiter la variabilité intrinsèque de la mesure de Vg chez les gammares mâles et d'augmenter sa reproductibilité et sa sensibilité, l'impact de la spermatogenèse sur les niveaux de Vg a été étudié. Lacaze et collaborateurs (2011a) ont montré que le stade de spermatogenèse pouvait fortement influencer la sensibilité de l'essai comète pour évaluer les dommages à l'ADN sur le sperme. Dans ce

travail, nous avons constaté que le stade de spermatogenèse (lié au comportement reproducteur et à la formation d'un amplexus) n'a pas d'influence sur les teneurs en Vg chez les gammarus mâles (**Figure 6.12**). Peu de données sont disponibles sur l'impact de la gonadogenèse chez les invertébrés. Toutefois, il a été montré que l'indice gonado-somatique et le développement testiculaire n'ont pas d'effets sur les teneurs en Vg chez le bivalve *Mytilus galloprovincialis* (Ortiz-Zarragoitia & Cajaraville, 2010) et les poissons (e.g., *Pleuronichthys verticalis*, Deng *et al.*, 2007) respectivement.



**Figure 6.12.** Teneurs en Vg (exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK /mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* au cours de la spermatogenèse. « D-1 » : moins de 24 heures avant l'accouplement ; « D0 » : 24 heures après l'accouplement ; « D7 » : sept jours après l'accouplement.

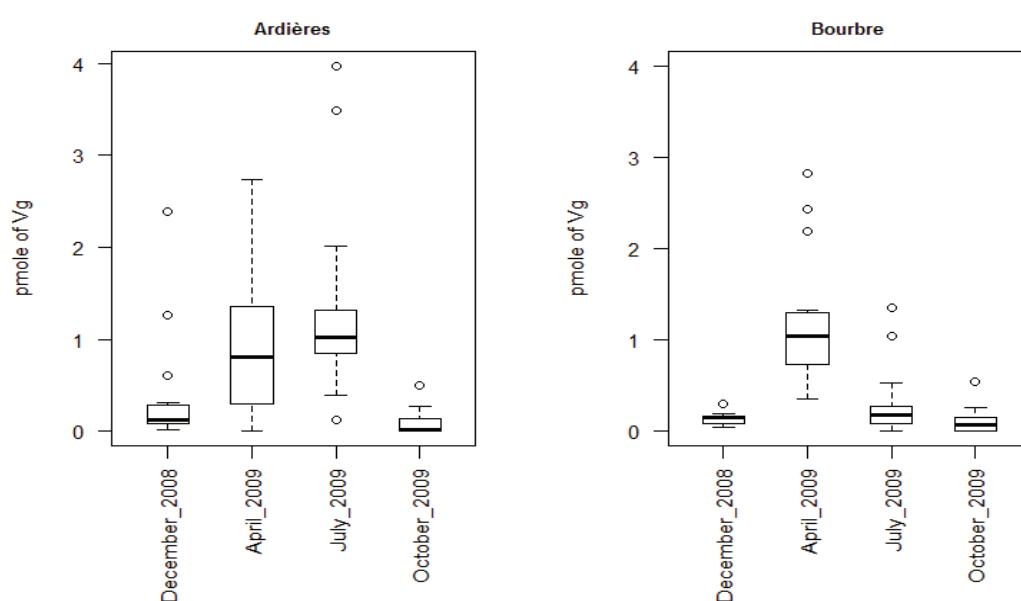
Par ailleurs, en comparant ces résultats avec les données obtenues au laboratoire (*cf.* section 6.3.1), les niveaux de Vg mesurés lors de l'étude de la spermatogenèse ( $0.04 \pm 0.058$  pmole de peptide ILIPGVGK / mg) correspondent aux données précédemment obtenues ( $0.04 \pm 0.07$  pmole de peptide ILIPGVGK / mg) ; ceci validant nos premières conclusions sur les inductions significatives de Vg chez les mâles exposés au MF, MX, PZ et CY. L'ensemble des données obtenues au laboratoire montrent cependant une forte variabilité inter-individuelle chez les organismes contrôles et exposés.

#### 6.3.2.2. Facteurs environnementaux sur des sites de référence

L'utilisation correcte des biomarqueurs doit refléter les réponses biologiques provoquées par l'exposition à des substances toxiques présentes dans le milieu naturel et nécessite d'intégrer la modulation pouvant être induite par certains facteurs environnementaux non toxiques (Leinio & Lehtonen, 2005 ; Pisanelli *et al.*, 2009). La caractérisation de cette variabilité naturelle des réponses permet

d'améliorer la sensibilité et la robustesse des biomarqueurs, via la définition d'une valeur de base ou des valeurs de référence ( Xuereb *et al.*, 2009a ; Coulaud *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011a).

Dans ce contexte, des gammares mâles standards (c.a.d. de taille et de stade de spermatogénèse homogènes) ont été transplantés sur deux sites dits de références (Ardières sur la commune des Ardillats ; Bourbre sur la commune de la Tour du Pin) au cours des 4 saisons et pendant 21 jours. Ces expérimentations avaient pour but d'évaluer l'influence des facteurs spatiaux (sur deux sites présentant des caractéristiques physico-chimiques contrastées, notamment en terme de dureté de l'eau) et des facteurs temporels (variation de la température de l'eau au cours des saisons de transplantation) (**Figure 6.13**).



**Figure 6.13.** Teneurs en Vg (exprimée en pmole ILIPGVGK/mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* pendant 4 séries de transplantations sur l'Ardières et la Bourbre, sites de référence (Décembre 2008, Avril 2009, Juillet 2009 et Octobre 2009).

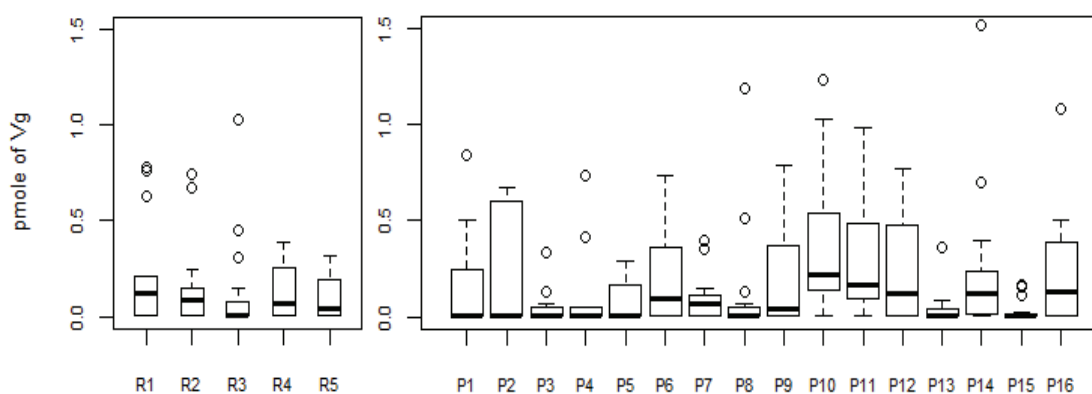
Un impact fort des saisons sur les niveaux de Vg mesurés chez les mâles a été observé. De fortes augmentations ont été enregistrées au printemps et en été sur l'Ardières et, en été sur la Bourbre. Ces inductions n'ont pas pu être corrélées avec la température mesurée sur les deux sites étudiés. De plus, le niveau de Vg mesuré sur le terrain (Ardillats au printemps ; 12°C) n'est pas comparable avec les niveaux observés au laboratoire pour la même température d'exposition. En revanche, les niveaux mesurés pour les autres saisons et sur les deux sites sont comparables avec les niveaux de Vg mesurés chez les mâles au laboratoire, montrant que la dureté de l'eau a une influence négligeable sur cette mesure. Dans la littérature, il y a peu d'études comparables chez les crustacés. Quelques études menées chez des poissons montrent que les niveaux de Vg chez les mâles fluctuent au cours des saisons, sans pour autant



qu'ils puissent être corrélés à la température (e.g., Solé *et al.*, 2002 ; Hotta *et al.*, 2003 ; Ma *et al.*, 2005 ; Deng *et al.*, 2007).

### 6.3.2.3. Effets de PE dans le milieu naturel

Dans le but d'évaluer la pertinence de la Vg chez *Gammarus fossarum* comme outil de la perturbation endocrinienne utilisable sur le terrain, une campagne de transplantation à large échelle géographique a été réalisée sur 21 sites du bassin rhodanien. Besse et collaborateurs (soumise) ont récemment étudié la qualité chimique de ces sites qui présentent des profils de contamination différents (cf. **Publication n°4** – « Suppl. Table 1 »). A partir des données de bioaccumulation obtenues chez les gammarus pour des métaux, des pesticides et des composés organiques prioritaires (e.g., PCB, HAP, etc.), nous avons sélectionné cinq sites dits « de référence » pour lesquels tous les polluants mesurés se trouvaient en dessous des seuils de contamination définis et, 16 sites dits « contaminés » pour lesquels certains sites sont caractérisés par une contamination spécifique par des métaux (P2 et P4), par des pesticides (P7) ou par des composés organiques (P3, P8 et P11) (**Figure 6.14**)



**Figure 6.14.** Teneurs en Vg (exprimée en pmole ILIPGVGK/mg) quantifiées chez *Gammarus fossarum* au cours d'une campagne de transplantations d'organismes sur des sites de référence (R1 à R5) et des sites pollués (P1 à P16) en Juin 2010.

En juin 2010, des gammarus mâles standard (taille et en amplexus) ont été engagés sur les 21 sites d'études pendant 21 jours, avec des températures variant de 9 à 18°C en fonction du site (températures similaires rencontrées sur les deux sites de références, section 6.3.3.2). Globalement, une forte variabilité inter-individuelle des réponses a été observée, limitant la sensibilité de la mesure de la Vg chez le gammarus mâle. Une induction significative de la Vg a été enregistrée sur deux sites contaminés : P10 et P11. Comme précédemment, ces résultats soulignent que les facteurs d'induction observés sont faibles (environ 10). Xuereb et collaborateurs (2011) ont montré des inductions significatives de l'expression du gène de la Vg sur des sites impactés (étude du type amont/aval de station d'épuration) et indiquent

également de faibles facteurs d'induction chez cette espèce. Il existe très peu d'études utilisant l'induction de Vg chez des crustacés autres que des décapodes (e.g., *Carcinus maenas* : Lye *et al.*, 2005; *Carcinus aestuarii* : Ricciardi *et al.*, 2010; *Litopenaeus setiferus* : Zapata-Perez *et al.*, 2005). Néanmoins, ces travaux confirment l'absence d'induction marquée (contrairement à ce que l'on peut observer classiquement chez les poissons mâles) et la forte variabilité inter-individuelle des réponses.

Les résultats montrent que les facteurs responsables de la variabilité des teneurs en Vg chez le mâle ne sont pas encore caractérisés et qu'ils devront l'être à l'avenir pour améliorer la robustesse et la fiabilité de ce biomarqueur. Plusieurs auteurs ont récemment souligné les fonctions pléiotropiques du gène de la Vg, indiquant un rôle non-exclusif dans la reproduction chez les vertébrés et les invertébrés (revu dans Zhang *et al.*, 2011). Les rôles de la Vg semblent être étendus au-delà de sa fonction de protéine de stockage/réserve. Par exemple, chez l'abeille, la Vg est impliquée dans l'organisation sociale, la répartition du travail, la régulation des dynamiques hormonales et les changements dans les réponses gustatives (Amdam *et al.*, 2003 ; Guidugli *et al.*, 2005a ; Guidugli *et al.*, 2005b ; Nelson *et al.*, 2007). Même si cela reste souvent à confirmer, la Vg semble avoir un rôle d'anti-oxydant chez plusieurs espèces d'invertébrés (e.g., crustacés : Kato *et al.*, 2004a ; Tokishita *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2011 ; nématode : Nakamura *et al.*, 1999; insecte : Seehuus *et al.*, 2006). De même, la Vg semble avoir des propriétés hémagglutinantes et/ou antimicrobiales chez plusieurs espèces (e.g., insecte : Rono *et al.*, 2010 ; amphioxus : Zhang *et al.*, 2005 ; et principalement les poissons : revu dans Zhang *et al.*, 2011). En effet, la Vg de poisson reconnaît certaines molécules étrangères à l'organisme, incluant les liposaccharides, les peptidoglycanes, les acides lipotéiques et les glucanes (paroi des bactéries), et est capable d'agir comme une opsonine qui peut améliorer la phagocytose par les macrophages (Li *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2011). Il est intéressant de constater que l'injection de la bactérie *Escherichia coli* chez le poisson mâle est capable de conduire à une augmentation de la Vg dans le sérum (Shi *et al.*, 2006). Plus récemment, chez le poisson mâle (*Danio rerio*), l'injection de liposaccharide et d'acide lipotéique a provoqué une augmentation marquée de l'expression de la Vg aux niveaux transcriptionnel et translationnel (Tong *et al.*, 2010). Par ailleurs, le domaine C-terminal bien conservé de la Vg (i.e., von Willebrand domain, vWD) trouvé chez la plupart des métazoaires (Avarre *et al.*, 2007) est connu pour être impliqué dans le processus de coagulation chez les vertébrés (Finn, 2007). Ces résultats indiquent que la Vg est une protéine impliquée dans la défense de l'organisme hôte contre les microbes, incluant les bactéries et les virus (Zhang *et al.*, 2011). **Prises ensemble, ces fonctions biologiques multiples pourraient expliquer en partie la forte variabilité inter-individuelle des réponses Vg obtenues, ce qui compliquerait l'utilisation de cette protéine comme un biomarqueur spécifique de la perturbation endocrinienne chez les mâles, en particulier pour les études de terrain.**

#### 6.4. Pertinence des marqueurs de reprotoxicité chez la femelle

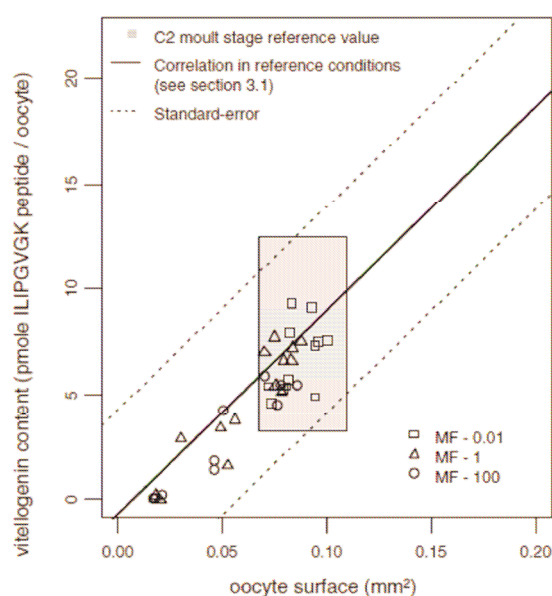
Peu de biomarqueurs robustes et fiables sont aujourd'hui disponibles pour diagnostiquer spécifiquement une perturbation endocrinienne chez les crustacés, et notamment les femelles. Comme chez les organismes mâles, c'est la mesure de la Vg qui a été la plus développée et utilisée. Pourtant, cette protéine est sujette à une forte variabilité naturelle en lien avec le cycle de reproduction (i.e., processus de vitellogenèse), impliquant ainsi la nécessité de connaître parfaitement le cycle de reproduction de l'organisme test pour permettre une lecture fiable de la teneur en cette protéine. Par conséquent, une utilisation pertinente de ce biomarqueur nécessite de caractériser les niveaux de base de la Vg en fonction de leur statut reproducteur (e.g., vitellogenèse primaire ou secondaire). De plus, quand bien même ce processus a été parfaitement décrit, l'étude à elle seule de la modulation de la synthèse de la Vg chez les femelles ne peut pas être *defacto* considérée comme une réponse spécifique d'une perturbation endocrinienne puisqu'elle peut également être la conséquence de stress perturbant l'allocation énergétique, le système nerveux, etc.

En lien avec le manque d'outils moléculaires, la majorité des travaux menés chez les crustacés femelles repose actuellement sur des approches individuelles en lien avec la reproduction, la mue ou encore le développement embryonnaire (LeBlanc, 2007). L'objectif de ces approches est d'évaluer l'impact de composés sur un ensemble de processus de la reproduction, directement liés à une régulation endocrinienne spécifique. Les effets observés suite à un stress chimique peuvent aussi bien résulter d'une perturbation spécifique de la signalisation endocrinienne que d'une contamination plus globale affectant la *fitness* des organismes. Ainsi, la comparaison de l'ensemble des réponses obtenues sur ces divers processus de la reproduction permet de constituer un faisceau de preuves et de conclure sur le potentiel PE ou non du contaminant étudié (Verslycke *et al.*, 2004 ; Verslycke *et al.*, 2007).

Dans ce contexte, les crustacés constituent des espèces intéressantes pour ces approches, puisqu'elles présentent la particularité que tous les processus impliqués dans la reproduction, la mue, la vitellogenèse et le développement embryonnaire, soient parfaitement synchronisés. Ces processus physiologiques (e.g., mue, vitellogenèse et embryogenèse) sont connus pour être régulés par des voies hormonales différentes. Ainsi, il est possible de faire l'hypothèse que la désynchronisation d'un de ces processus par rapport aux autres aide à identifier des composés chimiques ayant un mode d'action spécifique et notamment le risque d'être un PE (Verslycke *et al.*, 2004 ; Verslycke *et al.*, 2007).

Chez *G. fossarum*, les différents processus de la reproduction que sont la mue, la vitellogenèse (croissance ovocytaire et fertilité) et le développement embryonnaire ont été récemment décrits dans notre laboratoire (Geffard *et al.*, 2010). Au cours de mes travaux de thèse, l'objectif de ce dernier chapitre était d'étudier l'impact de composés sur la synchronisation de ces processus et d'évaluer la possibilité de proposer cette démarche pour caractériser le potentiel PE de substances.

Dans un premier temps, nous avons validé la fonction de la Vg dans la reproduction de cette espèce, en décrivant les teneurs du peptide d'intérêt (ILIPGVGK) chez des femelles au cours de leur cycle de mue et du développement embryonnaire. Au cours de ces travaux, nous avons également montré que la mesure de la surface ovocytaire, proposé par Geffard et al. (2010), est un indicateur pertinent pour décrire et caractériser la vitellogenèse puisqu'il existe une excellente relation entre la surface moyenne des ovocytes et la teneur en Vg dans les organismes. Par conséquent, il a été choisi d'utiliser la mesure des ovocytes, approche simple à mettre en place et non destructive, comme indicateur du processus de vitellogenèse chez la femelle. Enfin, les résultats présentés dans la publication n° 3 montrent que la synthèse de la Vg (croissance ovocytaire) peut être spécifiquement modulée en exposant des femelles à des PE (cas du méthyle-farnesoate); ceci valide, en conditions contaminées, que la surface ovocytaire reste un bon indicateur de la teneur en Vg chez les femelles (**Figure 6.15**).



**Figure 6.15.** Corrélation entre le niveau de Vg (exprimée en pmole ILIPGVGK peptide par ovocyte, axe y) et la surface moyenne des ovocytes (exprimée en mm<sup>2</sup>, axe x) chez les femelles *G. fossarum* de stade de mue C2 après 21 jours d'exposition au méthyle-farnesoate.

Dans un second temps, l'objectif a été d'étudier l'impact de composés sur la synchronisation des divers processus décrits et liés à la reproduction et d'évaluer la pertinence de cette démarche comme outil d'identification de composés à mode d'action PE. Pour cela, il a été réalisé des expositions aussi bien au laboratoire sur des molécules cibles, que sur le terrain, à l'aide d'organismes encagés (**Publication n°5**).

**Tableau 6.1. Récapitulatif des effets observés à la lecture de plusieurs réponses individuelles chez les femelles *G. fossarum* exposées pendant 21 jours en conditions contrôlées de laboratoire à des composés modèles.**

20HE : 20-hydroxyecdysone ; BZ : benzophénone CA : carbamazépine ; CY : cyprotérone ; MF : méthyle-farnesoate ; MX : méthoxyfénozide ; PZ : propiconazole ; RP : (R)-propranolol ; + : stimulation ; - : inhibition

Famille de substance substance	Hormones crustacés		Pesticides		Produits pharmaceutiques			
	20HE	MF	MX	PZ	BZ	CY	CA	RP
<b>Processus physiologique</b> <i>Marqueur associé</i>								
<b>Mue</b> <i>stade de mue</i>	-		-					
<b>Vitellogenèse</b> <i>surface ovocytaire</i>		-		+	+		+	+
<b>Fertilité</b> <i>Nombre d'ovocytes</i>						+ / -	+	
<b>Embryogenèse</b> <i>anomalies embryonnaires (%)</i>				+	+	+	+	+

Le **Tableau 6.1** présente la synthèse des résultats obtenus pour des hormones de crustacés (20-hydroxyecdysone et méthyle-farnesoate), des pesticides (méthoxyfénozide et propiconazole) et des composés pharmaceutiques (benzophénone, carbamazépine, cyprotérone (R)-propranolol). Tout d'abord ces travaux constituent une source d'information sur l'impact de composés largement présents et rejetés en milieux aquatiques et pour lesquels peu de données d'écotoxicité sont disponibles à l'heure actuelle dans la littérature.

Dans un contexte de perturbation endocrinienne, ces résultats montrent que la mesure simultanée des divers processus liés à la reproduction a permis d'identifier des composés capables de perturber de façon spécifique l'un de ces processus, permettant ainsi de les identifier comme composés à fort risque PE. Par exemple, nous avons montré que la 20-hydroxyecdysone et le méthoxyfénozide (analogue de l'hormone de mue) perturbent spécifiquement le processus de mue chez *G. fossarum*, conduisant à un retard de cette réponse. La similarité de réponse obtenue pour cette hormone et son analogue montre l'intérêt d'une telle approche dans le cadre de l'évaluation des risques pour ce type d'insecticide vis-à-vis d'organismes non cibles comme le gammare. De la même façon, ces travaux ont permis de montrer que le propiconazole (insecticide azolé), la benzophénone, la carbamazépine et le (R)-propranolol perturbent de façon spécifique le processus de la vitellogenèse, en stimulant la synthèse de la Vg. A l'inverse, le méthyle-farnesoate inhibe spécifiquement la synthèse de cette protéine. Enfin, pour les composés pharmaceutiques, aucun mode d'action spécifique n'a pu être mis en évidence.

Les travaux présentés dans la publication n°5 montrent que cette démarche reposant sur le suivi simultané de plusieurs processus impliqués dans la reproduction 1 – permet d'évaluer l'impact de

composés sur la reproduction de cette espèce et 2 – peut être proposé comme un outil pertinent pour évaluer le risque PE de composés.

Dans la dernière partie de mes travaux, nous avons également étudié l'intérêt de cette démarche pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques, avec un regard sur l'évaluation du potentiel PE des milieux étudiés, ceci à l'aide d'organismes encagés. Pour cela, des organismes ont été exposés sur 5 sites classés en référence par rapport à leur niveau de contamination et huit sites soumis à des pressions chimiques diverses. Des effets significatifs sur la reproduction (fertilité et développement embryonnaire) ont été observés pour trois des sites impactés testés, montrant l'intérêt d'une telle approche de terrain pour le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques. La proposition de ce type de biotest de terrain répond en partie au manque cruel d'outils aujourd'hui disponibles pour le diagnostic de la toxicité des milieux aquatiques. En effet et en réponse aux exigences de la DCE notamment, les approches actuellement utilisées (chimie et bioindication) pour évaluer la qualité des écosystèmes aquatiques ne permettent pas de discriminer des stress d'origine physique de stress d'origine chimique, étape pourtant indispensable pour la restauration des milieux. C'est dans ce contexte, que la proposition d'outils tel que le test de reprotoxicité *in situ* chez le gammare est pertinente et présente un grand intérêt.

Enfin, au cours de ces travaux de terrain, aucun site étudié ne s'est caractérisé par un mode d'action spécifique sur l'une des réponses étudiées, ne permettant pas de les classer en fonction de leur potentiel PE.



## CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

Les démarches réglementaires visant à fournir des données relatives à la dangerosité des substances de synthèse mises sur le marché (e.g., REACH) ainsi qu'à évaluer la qualité de l'eau et de la santé des écosystèmes (e.g., DCE) impliquent de développer et de valider des outils de diagnostic pertinents tels que les biomarqueurs. Dans l'environnement, les PE font de nos jours partie des substances à risque pour lesquelles il est nécessaire de mieux identifier leur présence et caractériser leurs effets, notamment au niveau des écosystèmes aquatiques qui fournissent biens et services à l'Homme. Les invertébrés qui présentent une grande diversité de stratégie de régulation endocrinienne, cible directe des PE, doivent être d'avantage intégrés dans l'évaluation du risque PE dans les programmes de recherche et de biosurveillance. Dans ce contexte, le développement et la validation d'outils spécifiques de la perturbation endocrinienne chez les invertébrés revêt un enjeu majeur pour répondre à ces objectifs.

Le premier axe de ma thèse s'est intéressé à une problématique méthodologique visant à proposer une approche novatrice permettant de développer la mesure de la Vg chez *Gammarus fossarum* et d'autres espèces d'invertébrés et ainsi permettre une plus large utilisation de ce biomarqueur en écotoxicologie. L'originalité de ces travaux reposait sur l'utilisation de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) afin de développer une méthode alternative à celles classiquement utilisées jusqu'à maintenant pour doser cette protéine, c'est à dire l'ELISA ou la méthode ALP. La **Publication n°1** a présenté les travaux de développement et de validation de l'essai LC-MS/MS chez le gammare : de l'identification des peptides spécifiques de la Vg jusqu'à la validation d'une méthode de quantification absolue du peptide le plus sensible et le plus spécifique. Cette méthodologie revêt plusieurs avantages en terme de performance analytique (sensible, fiable et reproductible) ; ce qui la rend très compétitive vis-à-vis de l'ELISA. *Toutefois, le protocole de préparation des échantillons reste perfectible, par exemple en réduisant le temps de digestion (quelques minutes en utilisant des microvolumes) et en automatisant la purification des échantillons.*

Le second objectif de ma thèse a été de confirmer l'intérêt de la spectrométrie de masse couplée à l'utilisation des banques génomiques (GenBank et EMBL) pour l'identification de peptides spécifiques de la Vg (à la base de la mise au point d'un essai LC-MS/MS), chez plusieurs espèces d'invertébrés incluant des mollusques, des crustacés et des insectes. La **Publication n°2** a montré trois approches possibles pour l'identification de peptides spécifiques de la Vg chez les invertébrés. [1] Ces travaux ont permis de valider que la spectrométrie de masse est un outil pertinent pour développer rapidement et facilement une méthode de mesure de ces peptides chez des espèces pour lesquelles on dispose d'une séquence, même partielle, de cette protéine. [2] Malgré la conservation modérée de cette protéine au cours de l'évolution, nous avons montré que certains peptides spécifiques de la Vg étaient conservés entre espèces ; et que par conséquent, la spectrométrie de masse permet de les détecter chez des espèces non séquencées



phylogénétiquement proches. Enfin, les alignements de séquences, qui sont classiquement utilisés afin de définir des amorces spécifiques en génomique fonctionnelle, peuvent également être exploités afin d'identifier des peptides d'intérêt chez des espèces non séquencées. *L'ère génomique (séquençage de génome chez de plus en plus d'organismes) dans laquelle nous nous trouvons pourrait permettre d'exploiter encore plus d'informations dans les banques de données et ainsi donner plus de poids à de telles approches.*

Le second axe de ma thèse s'intéressait à une problématique écotoxicologique visant à évaluer l'intérêt de la mesure de la Vg chez les mâles *Gammarus fossarum* comme marqueur spécifique de l'exposition à des PE au laboratoire et sur le terrain (encagement d'organismes).

Le premier objectif a été d'étudier la pertinence de la mesure de Vg dans le cadre d'expérimentations au laboratoire afin d'évaluer la capacité d'identifier des PE potentiels chez cette espèce pour laquelle peu d'informations étaient disponibles. La **Publication n°3** a montré que les substances, pour la plupart relativement peu étudiées, étaient susceptibles d'induire une production anormale de cette protéine chez ces organismes. Pourtant le résultat des expositions souligne [1] une grande variabilité inter-individuelle des réponses obtenues et [2] l'absence de réponses concentration-dépendantes pour les inductions de Vg, et ce pour des concentrations allant du nanogramme au milligramme par litre.

Le second objectif a été de caractériser dans un premier temps la variabilité naturelle des teneurs en Vg par rapport à un facteur biotique (le stade de spermatogenèse) et à des facteurs spatiaux-temporels ; ceci dans le but de limiter la variabilité de ce biomarqueur, d'obtenir des valeurs de référence et ainsi d'augmenter la sensibilité et la fiabilité de cet outil. Ensuite, la pertinence de ce biomarqueur dans le cadre d'expérimentations *in situ* via la transplantation d'organismes standardisés (taille et statut reproducteur) a été étudiée. La **Publication n°4** a souligné [1] la possibilité de contrôler la variabilité naturelle du niveau de base de la Vg en sélectionnant des organismes de taille homogène, quelque soit leur statut reproducteur, [2] l'impact de facteurs environnementaux provoquant de fortes variations du niveau de base, [3] une forte variabilité inter-individuelle des réponses obtenues chez les organismes transplantés et [4] des niveaux faibles d'induction de la Vg chez les gammarés (facteur 10).

*Ces travaux soulèvent plusieurs perspectives de travail chez le gammaré : (i) étudier le lien entre l'exposition à un PE modèle (induction de Vg par le MF par exemple) et les effets potentiels à des niveaux d'organisation supérieurs (TISSULAIRE : altération de la structure des gonades ? ; INDIVIDUEL : baisse de la fertilité masculine ? hausse de l'intersexualité ?) ; (ii) caractériser les récepteurs nucléaires comme EcR pour développer des marqueurs permettant d'appréhender une approche plus mécanistique de la perturbation endocrinienne (e.g., modulation des quantités, test ligand-récepteur). Ces marqueurs permettraient en effet d'identifier précisément des substances capables d'interférer ces voies de régulation hormonale cruciales chez les crustacés.*

Le troisième volet de ma thèse s'est intéressé à évaluer l'intérêt de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez les femelles (*Gammarus fossarum*) dans le cadre d'expérimentations au laboratoire et *in situ*. La **Publication n°5** a permis d'une part d'identifier des substances capables de perturber spécifiquement certains processus physiologiques tels que la mue (hormone ecdystéroïde et un analogue de synthèse) ou la vitellogenèse secondaire (terpénoïde) ; et d'autre part des substances exerçant une toxicité plus globale sur la production d'ovocytes et/ou le développement des embryons.

Pour conclure les travaux qui ont été réalisés au cours de ma thèse, [1] le développement de la mesure de Vg chez les invertébrés est un exemple du potentiel de la spectrométrie de masse pour développer et valider des méthodes de quantification protéique sensibles, spécifiques et reproductibles. Dans ce contexte, on peut prévoir qu'avec l'augmentation constante du nombre de séquences dans les banques génomiques (en lien avec la baisse des coûts du séquençage, notamment avec les nouvelles générations de pyroséquençage), la spectrométrie de masse pourrait rapidement s'imposer comme un outil de pointe pour le développement et l'application de biomarqueurs protéiques en écotoxicologie. De plus, la possibilité de mesurer simultanément plusieurs protéines dans un échantillon (c.a.d. le multiplexage) permettrait de généraliser la mise en place d'approches multi-marqueurs chez les espèces d'intérêt. [2] L'étude de la Vg chez le crustacé modèle *Gammarus fossarum* a permis de soulever des questions quant à la pertinence de ce biomarqueur chez cette espèce, et plus particulièrement sur la fonction de la Vg chez les organismes ovipares (immunité et stress oxydant). [3] L'étude des PE chez les invertébrés est un vaste chantier qui nécessite de mieux caractériser leurs systèmes de régulation hormonale afin de cibler les réponses les plus pertinentes permettant d'évaluer l'exposition et les effets à des PE.



## REFERENCES

- Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P. D., Larsen, B. K., Andersen, O. K. and Narbonne, J. F. (2004). "Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols." Marine Environmental Research **58**(2-5): 437-441.
- Abdu, U., Davis, C., Khalaila, I. and Sagi, A. (2002). "The vitellogenin cDNA of *Cherax quadricarinatus* encodes a lipoprotein with calcium binding ability, and its expression is induced following the removal of the androgenic gland in a sexually plastic system." General and Comparative Endocrinology **127**(3): 263-272.
- Agency, U. S. E. P. (2001). "Methods for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants with the amphipod *Leptocheirus plumulosus*." EPA/600/R-01/020. Washington, DC.
- Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A. P., Haworth, S., Feist, S. and Thain, J. E. (1999). "The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder." Science of the Total Environment **233**(1-3): 5-20.
- Alonso, A., De Lange, H. J. and Peeters, E. T. H. M. (2009). "Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor." Chemosphere **75**(3): 341-346.
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A. and Omholt, S. W. (2003). "Social exploitation of vitellogenin." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **100**(4): 1799-1802.
- Amiard, J. C., Caquet, T. and Lagadic, L. (1998). Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Paris, Lavoisier, TEC & DOC: 308.
- Amparyup, P., Klinbunga, S. and Jarayabhand, P. (2010). "Identification and expression analysis of sex-specific expression markers of thai abalone *Haliotis asinina*, linneaus, 1758." Journal of Shellfish Research **29**(3): 765-773.
- Andersen, H. R., Halling-Sorensen, B. and Kusk, K. O. (1999). "A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*." Ecotoxicology and Environmental Safety **44**(1): 56-61.
- Andersen, H. R., Wollenberger, L., Halling-Sorensen, B. and Kusk, K. O. (2001). "Development of copepod nauplii to copepodites - A parameter for chronic toxicity including endocrine disruption." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(12): 2821-2829.
- Anderson, T. A., Levitt, D. G. and Banaszak, L. J. (1998). "The structural basis of lipid interactions in lipovitellin, a soluble lipoprotein." Structure **6**(7): 895-909.
- Andrew, M. N., Dunstan, R. H., O'Connor, W. A., Van Zwieten, L., Nixon, B. and MacFarlane, G. R. (2008). "Effects of 4-nonylphenol and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol exposure in the Sydney rock oyster, *Saccostrea glomerata*: Vitellogenin induction and gonadal development." Aquatic Toxicology **88**(1): 39-47.

- Andrew, M. N., O'Connor, W. A., Dunstan, R. H. and MacFarlane, G. R. (2010). "Exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol causes dose and temporally dependent changes in intersex, females and vitellogenin production in the sydney rock oyster." Ecotoxicology **19**(8): 1440-1451.
- Arukwe, A. and Goksøyr, A. (2003). "Eggshell and egg yolk proteins in fish: Hepatic proteins for the next generation: Oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption." Comparative Hepatology **2**( ): Article number 4, 21p.
- Attrill, M. J. and Depledge, M. H. (1997). "Community and population indicators of ecosystem health: Targeting links between levels of biological organisation." Aquatic Toxicology **38**(1-3): 183-197.
- Auttarat, J., Phiriyangkul, P. and Utarabhand, P. (2006). "Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguensis*." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **143**(1): 27-36.
- Avarre, J. C., Lubzens, E. and Babin, P. J. (2007). "Apolipoprotein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B." BMC Evolutionary Biology **7**.
- Avarre, J. C., Michelis, R., Tietz, A. and Lubzens, E. (2003). "Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNAs." Biology of Reproduction **69**(1): 355-364.
- Babin, P. J. (2008). "Conservation of a vitellogenin gene cluster in oviparous vertebrates and identification of its traces in the platypus genome." Gene **413**(1-2): 76-82.
- Babin, P. J., Bogerd, J., Kooiman, F. P., Van Marrewijk, W. J. A. and Van Der Horst, D. J. (1999). "Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor." Journal of Molecular Evolution **49**(1): 150-160.
- Baer, K. N. and Owens, K. D. (1999). "Evaluation of selected endocrine disrupting compounds on sex determination in *Daphnia magna* using reduced photoperiod and different feeding rates." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **62**(2): 214-221.
- Baker, M. E. and Chandsawangbhuwana, C. (2008). "Motif analysis of amphioxus, lamprey and invertebrate estrogen receptors: Toward a better understanding of estrogen receptor evolution." Biochemical and Biophysical Research Communications **371**(4): 724-728.
- Baldwin, W. S., Bailey, R., Long, K. E. and Klaine, S. (2001). "Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteroid exposure in *Daphnia magna*." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(7): 1564-1569.
- Baldwin, W. S., Graham, S. E., Shea, D. and LeBlanc, G. A. (1997). "Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(9): 1905-1911.
- Baldwin, W. S., Milam, D. L. and Leblanc, G. A. (1995). "Physiological and biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen diethylstilbestrol." Environmental Toxicology and Chemistry **14**(6): 945-952.
- Banaszak, L., Sharrock, W. and Timmins, P. (1991). "Structure and function of a lipoprotein: Lipovitellin." Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry **20**: 221-246.

- Banoub, J., Thibault, P., Mansour, A., Cohen, A., Heeley, D. H. and Jackman, D. (2003). "Characterisation of the intact rainbow trout vitellogenin protein and analysis of its derived tryptic and cyanogen bromide peptides by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight-mass spectrometry and electrospray ionisation quadrupole/time-of-flight mass spectrometry." European Journal of Mass Spectrometry **9**(5): 509-524.
- Barnard, J. L. and Barnard, C. M. (1983). Freshwater Amphipoda of the world- I. Evolutionary patterns. Virginia, Hayfield associates (ed.).
- Bejarano, A. C. and Chandler, G. T. (2003). "Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(12): 3009-3016.
- Beketov, M. A. and Liess, M. (2008). "Potential of 11 pesticides to initiate downstream drift of stream macroinvertebrates." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **55**(2): 247-253.
- Bellés, X., Martín, D. and Piulachs, M. D. (2005). The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. **50**: 181-199.
- Bergeron, J. M., Crews, D. and McLachlan, J. A. (1994). "PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination." Environmental Health Perspectives **102**(9): 780-781.
- Besse, J. P. and Garric, J. (2008). "Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation." Toxicology Letters **176**(2): 104-123.
- Betancourt-Lozano, M., Baird, D. J., Sangha, R. S. and González-Farías, F. (2006). "Induction of morphological deformities and moulting alterations in *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles exposed to the triazole-derivative fungicide tilt." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **51**(1): 69-78.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K. and Das, I. (2007). "Cryptic species as a window on diversity and conservation." Trends in Ecology and Evolution **22**(3): 148-155.
- Billinghurst, Z., Clare, A. S. and Depledge, M. H. (2001). "Effects of 4-n-nonylphenol and 17[ $\beta$ ]-oestradiol on early development of the barnacle *Elminius modestus*." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **257**(2): 255-268.
- Billinghurst, Z., Clare, A. S., Fileman, T., McEvoy, J., Readman, J. and Depledge, M. H. (1998). "Inhibition of barnacle settlement by the environmental oestrogen 4-nonylphenol and the natural oestrogen 17[ $\beta$ ] oestradiol." Marine Pollution Bulletin **36**(10): 833-839.
- Billinghurst, Z., Clare, A. S., Matsumura, K. and Depledge, M. H. (2000). "Induction of cypris major protein in barnacle larvae by exposure to 4-n-nonylphenol and 17 $\beta$ -oestradiol." Aquatic Toxicology **47**(3-4): 203-212.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J. and Hansen, P. D. (1999). "Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A potential biomarker for endocrine disruption." Environmental Toxicology **14**(5): 455-465.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Blaise, C., Gagné, F., Salazar, M., Salazar, S., Trottier, S. and Hansen, P. D. (2003). "Experimentally-induced feminisation of freshwater mussels after long-term exposure to a municipal effluent." Fresenius Environmental Bulletin **12**(8): 865-870.
- Blanchet-Tournier, M.-F. (1980). Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (PALLAS) : Controles endocries et interactions. Sciences Naturelles. Paris, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6): 175.
- Blockwell, S. J., Maund, S. J. and Pascoe, D. (1999). "Effects of the organochlorine insecticide lindane (gamma-C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>) on the population responses of the freshwater amphipod *Hyalella azteca*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(6): 1264-1269.
- Blockwell, S. J., Pascoe, D. and Taylor, E. J. (1996a). "Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.)." Chemosphere **32**(9): 1795-1803.
- Blockwell, S. J., Taylor, E. J., Jones, I. and Pascoe, D. (1998). "The influence of fresh water pollutants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the Feeding activity of *Gammarus pulex* (L.)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **34**(1): 41-47.
- Blockwell, S. J., Taylor, E. J., Phillips, D. R., Turner, M. and Pascoe, D. (1996b). "A scanning electron microscope investigation of the effects of pollutants on the hepatopancreatic ceca of *Gammarus pulex* (L.)." Ecotoxicology and Environmental Safety **35**: 209-211.
- Bloor, M. C. and Banks, C. J. (2006). "An evaluation of mixed species in-situ and ex-situ feeding assays: The altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*." Environment International **32**(1): 22-27.
- Bodin, N., Burgeot, T., Stanisière, J. Y., Bocquené, G., Menard, D., Minier, C., Boutet, I., Amat, A., Cherel, Y. and Budzinski, H. (2004). "Seasonal variations of a battery of biomarkers and physiological indices for the mussel *Mytilus galloprovincialis* transplanted into the northwest Mediterranean Sea." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **138**(4): 411-427.
- Borlakoglu, J. T. and Kickuth, R. (1990). "Behavioral changes in *Gammarus pulex* and its significance in the toxicity assessment of very low levels of environmental pollutants." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **45**(2): 258-265.
- Borst, D. W., Laufer, H., Landau, M., Chang, E. S., Hertz, W. A., Baker, F. C. and Schooley, D. A. (1987). "Methyl farnesoate and its role in crustacean reproduction and development." Insect Biochemistry **17**(7): 1123-1127.
- Borst, D. W., Ogan, J., Tsukimura, B., Claerhout, T. and Holford, K. C. (2001). "Regulation of the Crustacean Mandibular Organ1." American Zoologist **41**(3): 430-441.
- Boutet, I., Moraga, D., Marinovic, L., Obreque, J. and Chavez-Crooker, P. (2008). "Characterization of reproduction-specific genes in a marine bivalve mollusc: Influence of maturation stage and sex on mRNA expression." Gene **407**(1-2): 130-138.
- Brausch, J. M. and Rand, G. M. (2011). "A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity." Chemosphere **82**(11): 1518-1532.
- Breitholtz, M. and Bengtsson, B. E. (2001). "Oestrogens have no hormonal effect on the development and reproduction of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*." Marine Pollution Bulletin **42**(10): 879-886.

- Breitholtz, M. and Wollenberger, L. (2003). "Effects of three PBDEs on development, reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*." *Aquatic Toxicology* **64**(1): 85-96.
- Breitholtz, M., Wollenberger, L. and Dinan, L. (2003). "Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*." *Aquatic Toxicology* **63**(2): 103-118.
- Brooks, S. and Mills, L. (2003). "The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*." *Comparative Biochemistry and Physiology A-Physiology* **135**: 527-537.
- Brooks, S., Tyler, C. R. and Sumpter, J. P. (1997). "Egg quality in fish: What makes a good egg?" *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **7**(4): 387-416.
- Brown, R. J., Conradi, M. and Depledge, M. H. (1999). "Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766)." *Science of the Total Environment* **233**(1-3): 77-88.
- Brown, R. J., Rundle, S. D., Hutchinson, T. H., Williams, T. D. and Jones, M. B. (2003). "A copepod life-cycle test and growth model for interpreting the effects of lindane." *Aquatic Toxicology* **63**(1): 1-11.
- Burkhart, J. G., Helgen, J. C., Fort, D. J., Gallagher, K., Bowers, D., Propst, T. L., Gernes, M., Magner, J., Shelby, M. D. and Lucier, G. (1998). "Induction of mortality and malformation in *Xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities." *Environmental Health Perspectives* **106**(12): 841-848.
- Byard, E. H. (1975). The female specific protein and reproduction in the lobster, *Homarus americanus*. London, Ontario, University of Western Ontario.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S. and Forget-Leray, J. (2007). "Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda)." *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* **147**(4): 841-849.
- Carlson, G. R., Dhadialla, T. S., Hunter, R., Jansson, R. K., Jany, C. S., Lidert, Z. and Slawecki, R. A. (2001). "The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist." *Pest Management Science* **57**(2): 115-119.
- Cary, T. L., Chandler, G. T., Volz, D. C., Walse, S. S. and Ferry, J. L. (2004). "Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*." *Environmental Science & Technology* **38**(2): 522-528.
- Castellani, C. and Altunbaş, Y. (2006). "Factors controlling the temporal dynamics of egg production in the copepod *Temora longicornis*." *Marine Ecology Progress Series* **308**: 143-153.
- Celander, M. C., Goldstone, J. V., Denslow, N. D., Iguchi, T., Kille, P., Meyerhoff, R. D., Smith, B. A., Hutchinson, T. H. and Wheeler, J. R. (2011). "Species extrapolation for the 21st century." *Environmental Toxicology And Chemistry* **30**(1): 52-63.
- Celestial, D. M. and McKenney, C. L. (1994). "The influence of an insect growth-regulator on the larval development of the mud crab *Rhithropanopeus harrisi*." *Environmental Pollution* **85**: 169-173.



- Chandler, G. T., Cary, T. L., Volz, D. C., Walse, S. S., Ferry, J. L. and Klosterhaus, S. L. (2004). "Fipronil effects on estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: A rapid life-cycle assay in 96-well microplate format." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(1): 117-124.
- Chang, E. S. and Mykles, D. L. (2011). "Regulation of crustacean molting: A review and our perspectives." General and Comparative Endocrinology **172**(3): 323-330.
- Charniaux-Cotton, H. (1954a). "Discovery in, an amphipod crustacean (*Orchestia gammarella*) of an endocrine gland responsible for the differentiation of primary and secondary male sex characteristics. [Découverte chez un crustacé amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation de caractères sexuels primaires et secondaires mâles.]" Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences **239**(13): 780-782.
- Charniaux-Cotton, H. (1954b). "Implantation de gonades de sexe opposé à des mâles et des femelles chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*)." Compte Rendu de l'Académie des Science de Paris **238**: 953-955.
- Charniaux-Cotton, H. (1955). "Le déterminisme hormonal des caractères sexuels d'*Orchestia gammarella* (Pallas) (Crustacé Amphipode)." Compte Rendu de l'Académie des Science de Paris **240**: 1487-1489.
- Charniaux-Cotton, H. (1965). Hormonal control of sex differentiation in invertebrates. Organogenesis. Dehaan, R. L. and Ursprung, H. New York, Holt, Rinehart, and Winston: 701-740.
- Charniaux-Cotton, H. (1973). "Description et contrôle de l'ovogénèse chez les Crustacés supérieurs." Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysologie **13**(hors série): 21-30.
- Charniaux-cotton, H. (1985). "Vitellogenesis and its control in malacostracan crustacea." Integrative and Comparative Biology **25**(1): 197-206.
- Charniaux-Cotton, H. and Payen, G. (1988). Crustacean reproduction. Endocrinologie of selected invertebrate types. Laufer, H. and Downer, R. G. H. New York, Liss, A.R. . **2**: 279-303.
- Chen, J. S., Sappington, T. W. and Raikhel, A. S. (1997). "Extensive sequence conservation among insect, nematode, and vertebrate vitellogenins reveals ancient common ancestry." Journal of Molecular Evolution **44**(4): 440-451.
- Chen, L., Jiang, H., Zhou, Z., Li, K., Deng, G. Y. and Liu, Z. (2004). "Purification of vitellin from the ovary of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) and development of an antivitelin ELISA." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **138**(3): 305-311.
- Chen, S., Chen, D. F., Yang, F., Nagasawa, H. and Yang, W. J. (2011). "Characterization and processing of superoxide dismutase-fused vitellogenin in the diapause embryo formation: A special developmental pathway in the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*." Biology of Reproduction **85**(1): 31-41.
- Chevreaux, E. and Fage, L. (1970). Faune de France, Tome 9 : Amphipodes. Nendeln (Liechtenstein).
- Chu, K. H., Wong, C. K. and Chiu, K. C. (1997). "Effects of the insect growth regulator (S)-methoprene on survival and reproduction of the freshwater cladoceran *Moina macrocopa*." Environmental Pollution **96**(2): 173-178.

- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Puinean, A. M., Hill, E. M., Minier, C., Osada, M., Fenlon, K. and Rotchell, J. M. (2010). "Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis." Environmental Pollution **158**(9): 2977-2984.
- Clare, A. S., Rittschof, D. and Costlow, J. D. J. (1992). "Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans." Journal of Experimental Zoology **262**(4): 436-440.
- Clements, W. H. (2000). "Integrating effects of contaminants across levels of biological organization: An overview." Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery **7**(2): 113-116.
- Coccia, E., De Lisa, E., Di Cristo, C., Di Cosmo, A. and Paolucci, M. (2010). "Effects of estradiol and progesterone on the reproduction of the freshwater crayfish *Cherax albidus*." Biological Bulletin **218**(1): 36-47.
- Cohen, A. M. and Banoub, J. H. (2010). Application of Mass Spectrometry for the Analysis of Vitellogenin, a Unique Biomarker for Xenobiotic Compounds. Detection of Biological Agents for the Prevention of Bioterrorism. Banoub, J.: 301-318.
- Cohen, A. M., Jahouh, F., Sioud, S., Rideout, R. M., Morgan, M. J. and Banoub, J. H. (2009). "Quantification of Greenland halibut serum vitellogenin: a trip from the deep sea to the mass spectrometer." Rapid Communications in Mass Spectrometry **23**(7): 1049-1060.
- Cohen, A. M., Mansour, A. A. H. and Banoub, J. H. (2005). "'De novo' sequencing of Atlantic cod vitellogenin tryptic peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry: similarities with haddock vitellogenin." Rapid Communications in Mass Spectrometry **19**(17): 2454-2460.
- Cohen, A. M., Mansour, A. A. H. and Banoub, J. H. (2006). "Absolute quantification of Atlantic salmon and rainbow trout vitellogenin by the 'signature peptide' approach using electrospray ionization QqToF tandem mass spectrometry." Journal of Mass Spectrometry **41**(5): 646-658.
- Colborn, T., Vom Saal, F. S. and Soto, A. M. (1993). "Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans." Environmental Health Perspectives **101**(5): 378-384.
- Cold, A. and Forbes, V. E. (2004). "Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*." Aquatic Toxicology **67**(3): 287-299.
- Cooke, I. M. and Sullivan, R. E. (1982). Hormones and neurosecretion. The Biology of Crustacea. Atwood, H. and Sandeman, D. New York, Academic Press. **3**: 206-291.
- Costa, F. O. and Costa, M. H. (1999). "Life history of the amphipod *Gammarus locusta* in the Sado estuary (Portugal)." Acta Oecologica **20**(4): 305-314.
- Costa, F. O., Neuparth, T., Correia, A. D. and Helena Costa, M. (2005). "Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints." Marine Environmental Research **60**(1): 93-110.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. V., Paruelo, J., Raskin, R. G., Sutton, P. and van den Belt, M. (1997). "The value of the world's ecosystem services and natural capital." Nature **387**(6630): 253-260.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Coulaud, R. (2012). Modélisation et changement d'échelles pour l'évaluation écotoxicologique : application à deux macroinvertébrés aquatiques, *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode) et *Potamopyrgus antipodarum* (mollusque gastéropode). . Lyon, Université de Lyon 1.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S. and Chaumot, A. (2011). "In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring." Water Research **45**(19): 6417-6429.
- Crane, M., Attwood, C., Sheahan, D. and Morris, S. (1999). "Toxicity and bioavailability of the organophosphorus insecticide pirimiphos methyl to the freshwater amphipod *Gammarus pulex* L. in laboratory and mesocosm systems." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(7): 1456-1461.
- Cripe, G. M., McKenney, C. L., Høglund, M. D. and Harris, P. S. (2003). "Effects of fenoxycarb exposure on complete larval development of the xanthid crab, *Rhithropanopeus harrisi*." Environmental Pollution **125**: 295-299.
- Cronin, L. E. (1947). "Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun." Journal of Morphology **81**: 209-240.
- Cunningham, P. A. and Myers, L. E. (1987). "Effects of diflubenzuron (dimilin) on survival, molting, and behavior of juvenile fiddler crabs, *Uca pugnator*." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **16**: 745-752.
- Dalvin, S., Frost, P., Loeffen, P., Skern-Mauritzen, R., Baban, J., Rønnestad, I. and Nilsen, F. (2011). "Characterisation of two vitellogenins in the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis*: Molecular, functional and evolutionary analysis." Diseases of Aquatic Organisms **94**(3): 211-224.
- Damiens, G., His, E., Gnassia-Barelli, M., Quiniou, F. and Roméo, M. (2004). "Evaluation of biomarkers in oyster larvae in natural and polluted conditions." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **138**(2): 121-128.
- de Kort, C. A. D. and Granger, N. A. N. (1996). "Regulation of JH titers: The relevance of degradative enzymes and binding proteins." Archive of Insect Biochemistry and Physiology **33**: 1-26.
- De Lange, H. J., Noordoven, W., Murk, A. J., Lüring, M. and Peeters, E. T. H. M. (2006). "Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals." Aquatic Toxicology **78**(3): 209-216.
- De Lange, H. J., Peeters, E. T. H. M. and Lüring, M. (2009). "Changes in ventilation and locomotion of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) in response to low concentrations of pharmaceuticals." Human and Ecological Risk Assessment **15**(1): 111-120.
- De Loof, A. and Huybrechts, R. (1998). "'Insects do not have sex hormones': A myth?" General and Comparative Endocrinology **111**(3): 245-260.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianni-Risbourg, S., Geffard, O. and Geffard, A. (2009). "Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment." Chemosphere **77**(11): 1569-1576.
- deFur, P., Crane, M., Ingersoll, C. and Tattersfield, L. (1999). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment. Pensacola, SETAC Press.

- deFur, P. L. (2004). "Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing." ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources **45**(4): 484-493.
- Deng, X., Rempel, M. A., Armstrong, J. and Schlenk, D. (2007). "Seasonal evaluation of reproductive status and exposure to environmental estrogens in hornyhead turbot at the municipal wastewater outfall of Orange County, CA." Environmental Toxicology **22**(5): 464-471.
- Denslow, N. D., Chow, M. C., Kroll, K. J. and Green, L. (1999). "Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics." Ecotoxicology **8**(5): 385-398.
- Depledge, M. H. and Billingham, Z. (1999). "Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates." Marine Pollution Bulletin **39**(1-12): 32-38.
- Depledge, M. H. and Fossi, M. C. (1994). "The role of biomarkers in environmental assessment. (2) Invertebrates." Ecotoxicology **3**(3): 161-172.
- Depledge, M. H. and Galloway, T. S. (2005). "Healthy animals, healthy ecosystems." Frontiers in Ecology and the Environment **3**(5): 251-258.
- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R. and Le, D. P. (1998). "New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity." Annual Review Of Entomology **43**: 545-569.
- Ding, X., Nagaraju, G. P. C., Novotney, D., Lovett, D. L. and Borst, D. W. (2010). "Yolk protein expression in the green crab, *Carcinus maenas*." Aquaculture **298**(3-4): 325-331.
- Dodson, S. I., Merritt, C. M., Shannahan, J. P. and Shults, C. M. (1999). "Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulex*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(7): 1568-1573.
- Douzery, E. J. P., Snell, E. A., Baptiste, E., Delsuc, F. and Philippe, H. (2004). "The timing of eukaryotic evolution: Does a relaxed molecular clock reconcile proteins and fossils?" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(43): 15386-15391.
- Drach, P. (1939). "Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes." Annales de l'Institut Oceanographique **19**(3): 103-391.
- Drach, P. and Tchernigovtzeff, C. (1967). "Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. ." Vie Milieu **18**: 595-607.
- Dreon, M., Lavarias, S., Garin, C. F., Heras, H. and Pollero, R. J. (2002). "Synthesis, distribution, and levels of an egg lipoprotein from the apple snail *Pomacea canaliculata* (mollusca: Gastropoda)." Journal of Experimental Zoology **292**(3): 323-330.
- Dunn, C. W., Hejnal, A., Matus, D. Q., Pang, K., Browne, W. E., Smith, S. A., Seaver, E., Rouse, G. W., Obst, M., Edgecombe, G. D., Sorensen, M. V., Haddock, S. H. D., Schmidt-Rhaesa, A., Okusu, A., Kristensen, R. M., Wheeler, W. C., Martindale, M. Q. and Giribet, G. (2008). "Broad phylogenomic sampling improves resolution of the animal tree of life." Nature **452**(7188): 745-749.
- Durica, D. S., Chung, A. C. K. and Hopkins, P. M. (1999). "Characterization of EcR and RXR gene homologs and receptor expression during the molt cycle in the crab, *uca pugnator*." American Zoologist **39**(4): 758-773.

- Eggers, T. O. and Martens, A. (2001). "Bestimmungsschlüssel der Süßwasser-Amphipoda (Crustacea) Deutschlands." Lauterbornia **42**: 1-68.
- Felten, V. (2003). Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda): Approche intégrée à différents niveaux d'organisation. Physiologie et biologie des organismes, populations, interactions, Université de Metz: 339.
- Felten, V., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aujoulat, F., Garric, J. and Geffard, O. (2008a). "Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* exposed to acid stress." Comparative Biochemistry and Physiology, C: Toxicology and Pharmacology **147**(2): 189-197.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J. and Geffard, O. (2008b). "Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea : Amphipoda) exposed to cadmium." Aquatic Toxicology **86**(3): 413-425.
- Felten, V. and Guerold, F. (2001). "Hyperventilation and loss of hemolymph Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress : a preliminary study." Dis. Aquat. Org. **45**: 77-80.
- Felten, V. and Guerold, F. (2006). "Short-term physiological responses to a severe acid stress in three macroinvertebrate species: A comparative study." Chemosphere **63**(9): 1427-1435.
- Fent, K., Kunz, P. Y., Zenker, A. and Rapp, M. (2010). "A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor." Marine Environmental Research **69**(SUPPL. 1): S4-S6.
- Fent, K., Weston, A. A. and Caminada, D. (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals." Aquatic Toxicology **76**(2): 122-159.
- Férézou, J.-P., Barbier, M. and Berreur-Bonnenfant, J. (1978). "Biosynthèse de la farnésylacétone-(*E,E*) par les glandes androgènes du crabe *Carcinus maenas*." Helvetica Chimica Acta **61**(2): 669-674.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. and Garric, J. (2004). "Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?" Environmental Toxicology and Chemistry **23**(5): 1344-1354.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A. and Garric, J. (2003). "Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: Study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac." Ecotoxicology and Environmental Safety **55**(3): 359-370.
- Fialkowski, W., Calosi, P., Dahlke, S., Dietrich, A., Moore, P. G., Olenin, S., Persson, L. E., Smith, B. D., Špegys, M. and Rainbow, P. S. (2009). "The sandhopper *Talitrus saltator* (Crustacea: Amphipoda) as a biomonitor of trace metal bioavailabilities in European coastal waters." Marine Pollution Bulletin **58**(1): 39-44.
- Fielding, N. J., MacNeil, C., Dick, J. T. A., Elwood, R. W., Riddell, G. E. and Dunn, A. M. (2003). "Effects of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* on the feeding ecology of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda)." Journal of Zoology **261**(3): 321-325.

- Fingerman, M. (1997). "Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis." Physiological Zoology **70**(3): 257-269.
- Fingerman, M., Jackson, N. C. and Nagabhushanam, R. (1998). "Hormonally-regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution." Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **120**(3): 343-350.
- Finn, R. N. (2007). "Vertebrate yolk complexes and the functional implications of phosvitins and other subdomains in vitellogenins." Biology of Reproduction **76**(6): 926-935.
- Folmar, L. C., Denslow, N. D., Rao, V., Chow, M., Crain, D. A., Enblom, J., Marcino, J. and Guillette Jr, L. J. (1996). "Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant." Environmental Health Perspectives **104**(10): 1096-1101.
- Forbes, V. E., Palmqvist, A. and Bach, L. (2006). "The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(1): 272-280.
- Ford, A. T. (2008). "Can you feminise a crustacean?" Aquatic Toxicology **88**(4): 316-321.
- Ford, A. T. (2012). "Intersexuality in Crustacea: An environmental issue?" Aquatic Toxicology **108**: 125-129.
- Ford, A. T., Fernandes, T. F., Rider, S. A., Read, P. A., Robinson, C. D. and Davies, I. M. (2004). "Endocrine disruption in a marine amphipod? Field observations of intersexuality and de-masculinisation." Marine Environmental Research **58**(2-5): 169-173.
- Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C. and Leboulenger, F. (2005). "Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Pope)." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**(3): 288-294.
- Forrow, D. M. and Maltby, L. (2000). "Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding." Environmental Toxicology And Chemistry **19**(8): 2100-2106.
- Fortin, T., Salvador, A., Charrier, J. P., Lenz, C., Bettsworth, F., Lacoux, X., Choquet-Kastylevsky, G. and Lemoine, J. (2009). "Multiple reaction monitoring cubed for protein quantification at the low nanogram/milliliter level in nondepleted human serum." Analytical Chemistry **81**(22): 9343-9352.
- Fossi Tankoua, O., Buffet, P. E., Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Mouneyrac, C. and Berthet, B. (2011). "Potential influence of confounding factors (size, salinity) on biomarkers in the sentinel species *Scrobicularia plana* used in programmes monitoring estuarine quality." Environmental Science and Pollution Research **18**(8): 1253-1263.
- Friberg, N., Andersen, T. H., Hansen, H. O., Iversen, T. M., Jacobsen, D., Krojgaard, L. and Larsen, S. E. (1994). "The effect brown trout (*Salmo trutta* L.) on stream invertebrate drift, with special reference to *Gammarus pulex* (L.)." Hydrobiologia **294**: 105-110.
- Gagnaire, B., Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., Dévier, M. H. and Garric, J. (2009). "Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins." Aquatic Toxicology **92**(3): 155-167.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Gagné, F. and Blaise, C. (2000). "Organic alkali-labile phosphates in biological materials: A generic assay to detect Vitellogenin in biological tissues." Environmental Toxicology **15**(3): 243-247.
- Gagné, F. and Blaise, C. (2004). "Shell protein characteristics and vitellogenin-like proteins in brine shrimp *Artemia franciscana* exposed to municipal effluent and 20-hydroxyecdysone." Comparative Biochemistry and Physiology , C: Toxicology and Pharmacology **138**(4): 515-522.
- Gagné, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G. I. and Sabik, H. (2001a). "Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*." Environmental Pollution **115**(1): 97-106.
- Gagné, F., Blaise, C. and Pellerin, J. (2005). "Altered exoskeleton composition and vitellogenesis in the crustacean *Gammarus sp.* collected at polluted sites in the Saguenay Fjord, Quebec, Canada." Environmental Research **98**(1): 89-99.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J. and Gauthier-Clerc, S. (2002). "Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord." Marine Environmental Research **53**(3): 295-310.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S. and Viglino, L. (2003). "Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Quebec, Canada)." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **134**(2): 189-198.
- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S. and Hansen, P. D. (2001b). "Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio complanata*." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **128**(3): 213-225.
- Gagné, F., Bouchard, B., André, C., Farcy, E. and Fournier, M. (2011). "Evidence of feminization in wild *Elliptio complanata* mussels in the receiving waters downstream of a municipal effluent outfall." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **153**(1): 99-106.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996). "SEA VIEW and PHYLO\_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny." Computer Applications in the Biosciences **12**(6): 543-548.
- García, F., Cunningham, M. L., Garda, H. and Heras, H. (2008). "Embryo lipoproteins and yolk lipovitellin consumption during embryogenesis in *Macrobrachium borellii* (Crustacea: Palaemonidae)." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **151**(3): 317-322.
- Garcia, J., Munro, E. S., Monte, M. M., Fourrier, M. C. S., Whitelaw, J., Smail, D. A. and Ellis, A. E. (2010). "Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) serum vitellogenin neutralises infectivity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV)." Fish and Shellfish Immunology **29**(2): 293-297.
- Garmendia, J. M., Menchaca, I., Belzunce, M. J., Franco, J. and Revilla, M. (2010). "Seasonal variability in gonad development in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) on the Basque coast (Southeastern Bay of Biscay)." Marine Pollution Bulletin **61**(4-6): 259-266.
- Geffard, A., Amiard, J. C. and Amiard-Triquet, C. (2002). "Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker: Seasonal and intersite fluctuations." Biomarkers **7**(2): 123-137.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. (2010). "Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus*

- fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(10): 2249-2259.
- Geng, M., Ji, J. and Regnier, F. E. (2000). "Signature-peptide approach to detecting proteins in complex mixtures." Journal of Chromatography A **870**(1-2): 295-313.
- Gerhardt, A. (1995). "Monitoring behavioral responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion." Environment Sciences and Pollution Reserches **2**(1): 15-23.
- Gerhardt, A. (1996). "Behavioural early warning responses to polluted water - Performance of *Gammarus pulex* L. (Crustacea) and *Hydropsyche angustipennis* (Curtis) (Insecta) to a complex industrial Effluent." Environment Sciences and Pollution Reserches **3**(2): 63-70.
- Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C. and Stich, K. P. (1998). "New online biomonitoring system for *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea): In situ test below a copper effluent in south Sweden." Environmental Science & Technology **32**(1): 150-156.
- Ghekiere, A., Fenske, M., Verslycke, T., Tyler, C. and Janssen, C. (2005). "Development of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for vitellin in the mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea)." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **142**(1): 43-49.
- Ghekiere, A., Verslycke, T., De Smet, L., Van Beeumen, J. and Janssen, C. R. (2004). "Purification and characterization of vitellin from the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea; Mysidacea)." Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology **138**: 427.
- Ghekiere, A., Verslycke, T., Fockedey, N. and Janssen, C. R. (2006a). "Non-target effects of the insecticide methoprene on molting in the estuarine crustacean *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **332**(2): 226-234.
- Ghekiere, A., Verslycke, T. and Janssen, C. (2006b). "Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid *Neomysis integer*." General and Comparative Endocrinology **147**(2): 190-195.
- Gibbs, P. E., Bryan, G. W., Pascoe, P. L. and Burt, G. R. (1990). "Reproductive abnormalities in female *Ocenebra erinacea* (Gastropoda) resulting from tributyltin-induced imposex." Journal - Marine Biological Association of the United Kingdom **70**(3): 639-656.
- Greco, L. S. L., Sanchez, M. V., Nicoloso, G. L., Medesani, D. A. and Rodriguez, E. M. (2001). "Toxicity of cadmium and copper on larval and juvenile stages of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **41**: 333-338.
- Grieneisen, M. L. (1994). "Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans." Insect Biochemistry and Molecular Biology **24**(2): 115-132.
- Gross, M. Y., Maycock, D. S., Thorndyke, M. C., Morrilt, D. and Crane, M. (2001). "Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(8): 1792-1797.
- Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L. P. and Hartfelder, K. (2005a). "Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect." FEBS Letters **579**(22): 4961-4965.



- Guidugli, K. R., Piulachs, M. D., Bellés, X., Lourenço, A. P. and Simões, Z. L. P. (2005b). "Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*." Archives of Insect Biochemistry and Physiology **59**(4): 211-218.
- Gunamalai, V., Kirubakaran, R. and Subramoniam, T. (2004). "Hormonal coordination of molting and female reproduction by ecdysteroids in the mole crab *Emerita asiatica* (Milne Edwards)." General and Comparative Endocrinology **138**(2): 128-138.
- Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Mons, R., Queau, H., Mouthon, J. and Garric, J. (2010). "In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges." Water Research **44**(15): 4517-4528.
- Gust, M., Mouthon, J., Queau, H., Dussart, C., Buronfosse, T. and Garric, J. (2011). "Natural variability and response interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroid levels and energy status in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray)." General and Comparative Endocrinology **172**(2): 243-250.
- Gygi, S. P. and Aebersold, R. (2000). "Mass spectrometry and proteomics." Current Opinion in Chemical Biology **4**(5): 489-494.
- Haeba, M. H., Hilscherová, K., Mazurová, E. and Bláha, L. (2008). "Selected endocrine disrupting compounds (Vinclozolin, Flutamide, Ketoconazole and Dicofof): Effects on survival, occurrence of males, growth, molting and reproduction of *Daphnia magna*." Environmental Science and Pollution Research **15**(3): 222-227.
- Hagger, J. A., Lowe, D., Dissanayake, A., Jones, M. B. and Galloway, T. S. (2010). "The influence of seasonality on biomarker responses in *Mytilus edulis*." Ecotoxicology **19**(5): 953-962.
- Halanych, K. M. (2004). The new view of animal phylogeny. **35**: 229-256.
- Handy, R. D. and Depledge, M. H. (2000). "Physiological responses : Their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology." Ecotoxicology **8**: 329-349.
- Handy, R. D., Galloway, T. S. and Depledge, M. H. (2003). "A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology." Ecotoxicology **12**(1-4): 331-343.
- Hannas, B. R., Wang, Y. H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H. and LeBlanc, G. A. (2011). "Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*)." Aquatic Toxicology **101**(2): 351-357.
- Hanson, N., Förlin, L. and Larsson, Å. (2010). "Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: An example with biomarkers in perch." Environmental Toxicology and Chemistry **29**(11): 2616-2624.
- Hanson, N. and Larsson, Å. (2011). "Biomarker analyses in caged and wild fish suggest exposure to pollutants in an urban area with a landfill." Environmental Toxicology **26**(3): 315-324.
- Hanström, M. (1926). Vergleichende anatomie des nervensystems der wirbellosen tiere. Berlin, Springer.

- Hasegawa, Y., Haino-Fukushima, K. and Katakura, Y. (1987). "Isolation and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*." General and Comparative Endocrinology **67**(1): 101-110.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C. and Vonk, A. (2003). "Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence." Environmental Health Perspectives **111**(4): 568-575.
- Hayward, A., Takahashi, T., Bendena, W. G., Tobe, S. S. and Hui, J. H. L. (2010). "Comparative genomic and phylogenetic analysis of vitellogenin and other large lipid transfer proteins in metazoans." FEBS Letters **584**(6): 1273-1278.
- Hickey, J. J. and Anderson, D. W. (1968). "Chlorinated hydrocarbons and eggshell changes in raptorial and fish-eating birds." Science **162**(3850): 271-273.
- Hinsch, G. W. (1981). "Effects of juvenile hormone mimics on the ovary in the immature spider crab, *Libinia emarginata*." International Journal of Invertebrate Reproduction **3**: 237-244.
- Homola, E. and Chang, E. S. (1997). "Methyl farnesoate: Crustacean juvenile hormone in search of functions." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **117**(3): 347-356.
- Hopkins, P. M., Durica, D. and Washington, T. (2008). "RXR isoforms and endogenous retinoids in the fiddler crab, *Uca pugilator*." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **151**(4): 602-614.
- Hotta, K., Watanabe, T., Kishida, C., Nakamura, Y., Ohkubo, N., Matsubara, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. (2003). "Seasonality of serum levels of vitellogenin in male Japanese whiting, *Sillago japonica*, reared under natural temperature and photoperiod." Fisheries Science **69**(3): 555-562.
- Huang, D. J. and Chen, H. C. (2004). "Effects of chlordane and lindane on testosterone and vitellogenin levels in green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*)." International Journal of Toxicology **23**(2): 91-95.
- Huang, D. J., Chen, H. C., Wu, J. P. and Wang, S. Y. (2006). "Reproduction obstacles for the female green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*) after exposure to chlordane and lindane." Chemosphere **64**(1): 11-16.
- Hui, J. H. L., Hayward, A., Bendena, W. G., Takahashi, T. and Tobe, S. S. (2010). "Evolution and functional divergence of enzymes involved in sesquiterpenoid hormone biosynthesis in crustaceans and insects." Peptides **31**(3): 451-455.
- Hutchinson, T. H., Pounds, N. A., Hampel, M. and Williams, T. D. (1999). "Life-cycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(12): 2914-2920.
- Hwang, D. S., Lee, K. W., Han, J., Park, H. G., Lee, J., Lee, Y. M. and Lee, J. S. (2010). "Molecular characterization and expression of vitellogenin (Vg) genes from the cyclopoid copepod, *Paracyclops nana* exposed to heavy metals." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **151**(3): 360-368.
- Hwang, D. S., Lee, K. W. and Lee, J. S. (2009). **1163**: 417-420.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Hyne, R. V. (2011). "Review of the reproductive biology of amphipods and their endocrine regulation: Identification of mechanistic pathways for reproductive toxicants." Environmental Toxicology and Chemistry **30**(12): 2647-2657.
- Janer, G. and Porte, C. (2007). "Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates." Ecotoxicology **16**(1): 145-160.
- Jayasankar, V., Tsutsui, N., Jasmani, S., Saido-Sakanaka, H., Yang, W. J., Okuno, A., Hien, T. T. T., Aida, K. and Wilder, M. N. (2002). "Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*." Journal of Experimental Zoology **293**(7): 675-682.
- Jenny, M. J., Ringwood, A. H., Lacy, E. R., Lewitus, A. J., Kempton, J. W., Gross, P. S., Warr, G. W. and Chapman, R. W. (2002). "Potential indicators of stress response identified by expressed sequence tag analysis of hemocytes and embryos from the American oyster, *Crassostrea virginica*." Marine Biotechnology **4**(1): 81-93.
- Ji, Y., Lu, G., Wang, C., Song, W. and Wu, H. (2010). "Fish transplantation and stress-related biomarkers as useful tools for assessing water quality." Journal of Environmental Sciences **22**(11): 1826-1832.
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G. C., Sumpter, J. P. and Tyler, C. R. (2002). "Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents." Biology of Reproduction **66**(2): 272-281.
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Quéau, H., Chaumot, A. and Geffard, O. (2012). "Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males." Aquatic Toxicology **112-113**: 72-82.
- Juchault, P. and Legrand, J. J. (1978). "Study of androgenic gland function in crossed grafting between two species of terrestrial isopod crustacea. *Porcellio dilatatus* Brandt and *Armadillidium vulgare* Latreille: Concept of the specificity of androgenic hormone and neurohormones involved in the control of androgen function." ETUDE DU FONCTIONNEMENT DE LA GLANDE ANDROGENE DANS LE CAS D'IMPLANTATIONS CROISEES ENTRE DEUX ESPECES DE CRUSTACES ISOPODES TERRESTRES, PORCELLIO DILATATUS BRANDT ET ARMADILLIDIUM VULGARE LATREILLE: NOTION DE SPECIFICITE DE L'HORMONE ANDROGENE ET DES NEUROHORMONES IMPLIQUEES DANS LE CONTROLE DE LA FONCTION ANDROGENE **36**(2): 175-186.
- Junera, H. and Croisille, Y. (1980). "Site of vitellogenin synthesis in *Orchestia gammarella*, Pallas (Crustacea, Amphipoda). Correlation between an activation of protein synthesis in the sub-epidermal adipose tissue and vitellogenin production." RECHERCHE DU LIEU DE SYNTHÈSE DE LA VITELLOGENINE CHEZ LE CRUSTACE AMPHIPODE ORCHESTIA GAMMARELLA (PALLAS). MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVATION DE LA SYNTHÈSE PROTEIQUE DANS LE TISSU ADIPEUX SOUS-EPIDERMIQUE EN LIAISON AVEC LA PRODUCTION DE VITELLOGENINE **290**(11): 703-706.
- Kajiwara, M., Kuraku, S., Kurokawa, T., Kato, K., Toda, S., Hirose, H., Takahashi, S., Shibata, Y., Iguchi, T., Matsumoto, T., Miyata, T., Miura, T. and Takahashi, Y. (2006). "Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*." General and Comparative Endocrinology **148**(3): 315-326.
- Kalman, J., Buffet, P. E., Amiard, J. C., Denis, F., Mouneyrac, C. and Amiard-Triquet, C. (2010). "Assessment of the influence of confounding factors (weight, salinity) on the response of biomarkers in the estuarine polychaete *Nereis diversicolor*." Biomarkers **15**(5): 461-469.

- Kang, B. J., Nanri, T., Lee, J. M., Saito, H., Han, C. H., Hatakeyama, M. and Saigusa, M. (2008). "Vitellogenesis in both sexes of gonochoristic mud shrimp, *Upogebia major* (Crustacea): Analyses of vitellogenin gene expression and vitellogenin processing." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **149**(4): 589-598.
- Karaman, G. S. and Pinkster, S. (1977). "Freshwater *Gammarus* species from Europe, North Africa, and adjacent regions of Asia (Crustacea - Amphipoda) : Part 1. *Gammarus pulex* - group and related species." Bijdragen Tot De Dierkunde **47**(1): 1-97.
- Kast-Hutcheson, K., Rider, C. V. and LeBlanc, G. A. (2001). "The fungicide propiconazole interferes with embryonic development of the crustacean *Daphnia magna*." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(3): 502-509.
- Katakura, Y., Fujimaki, Y. and Unno, K. (1975). "Partial purification and characterisation of androgenic gland hormone from the isopod crustacean, *Armadillidium vulgare*." Annotationes Zoologicae Japonenses **48**: 203-209.
- Kato, Y., Tokishita, S., Ohta, T. and Yamagata, H. (2004a). "A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*." Gene **334**: 157-165.
- Kato, Y., Tokishita, S. I., Ohta, T. and Yamagata, H. (2004b). "A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*." Gene **334**(1-2): 157-165.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D. M., Sinks, T. and Tilson, H. A. (1996). "Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop." Environmental Health Perspectives **104**(SUPPL. 4): 715-740.
- Keay, J., Bridgham, J. T. and Thornton, J. W. (2006). "The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: Evolutionary and functional implications." Endocrinology **147**(8): 3861-3869.
- Kedwards, T. J., Blockwell, S. J., Taylor, E. J. and Pascoe, D. (1996). "Design of an electronically operated flow-trough respirometer and its use to investigate the effects of copper on the respiration rate of *Gammarus pulex* (L.)." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **57**: 610-616.
- Kevrekidis, T., Kourakos, G. and Boubonari, T. (2009). "Life history, reproduction, growth, population dynamics and production of *gammarus aequicauda* (Crustacea: Amphipoda) at extremely low salinities in a mediterranean lagoon." International Review of Hydrobiology **94**(3): 308-325.
- Kim, J., Kim, Y., Lee, S., Kwak, K., Chung, W. J. and Choi, K. (2011). "Determination of mRNA expression of DMRT93B, vitellogenin, and cuticle 12 in *Daphnia magna* and their biomarker potential for endocrine disruption." Ecotoxicology **20**(8): 1741-1748.
- Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., Koga, M. and Arizono, K. (2009). "Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*)." Journal of Toxicological Sciences **34**(2): 227-232.

- King, L. E., Ding, Q., Prestwich, G. D. and Tobe, S. S. (1995). "The characterization of a haemolymph methyl farnesoate binding protein and the assessment of methyl farnesoate metabolism by the haemolymph and other tissues from *Procambrus clarkii*." *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 25(4): 495-501.
- Kiparissis, Y., Metcalfe, T. L., Balch, G. C. and Metcalfe, C. D. (2003). "Effects of the antiandrogens, vinclozolin and cyproterone acetate on gonadal development in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." *Aquatic Toxicology* 63(4): 391-403.
- Klobučar, G. I. V., Štambuk, A., Pavlica, M., Sertić Perić, M., Kutuzović Hackenberger, B. and Hylland, K. (2010). "Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*)." *Ecotoxicology* 19(1): 77-84.
- Knowles, C. O., J., M. M. and Palawski, D. U. (1987). "Chronic effects of di-2-ethylhexyl phthalate on biochemical composition, survival and reproduction of *Daphnia magna*." *Environmental Toxicology and Chemistry* 6: 201-208.
- Krell, B., Moreira-Santos, M. and Ribeiro, R. (2011). "An estuarine mudsnail in situ toxicity assay based on postexposure feeding." *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(8): 1935-1942.
- Kreutzweiser, D. P., Capell, S. S., Wainiokeizer, K. L. and Eichenberg, D. C. (1994). "Toxicity of a new molt-inducing insecticide (RH-5992) to aquatic macroinvertebrates." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 28: 14-24.
- Kuhn, K. and Streit, B. (1994). "Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 398-404.
- Kunz, P. Y., Galicia, H. F. and Fent, K. (2006). "Comparison of in vitro and in vivo estrogenic activity of UV filters in fish." *Toxicological Sciences* 90(2): 349-361.
- Kunz, P. Y., Kienle, C. and Gerhardt, A. (2010a). **205: 1-76.**
- Kunz, P. Y., Kienle, C. and Gerhardt, A. (2010b). "*Gammarus spp.* in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: Toward integrated multilevel tests " *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 205: 1-76.
- Kusk, K. O., Avdolini, M. and Wollenberger, L. (2011). "Effect of 2,4-dihydroxybenzophenone (BP1) on early life-stage development of the marine copepod *Acartia tonsa* at different temperatures and salinities." *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(4): 959-966.
- Kusk, K. O. and Petersen, S. (1997). "Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*." *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(8): 1629-1633.
- Kusmierz, J. J., Sumrada, R. and Desiderio, D. M. (1990). "Fast atom bombardment mass spectrometric quantitative analysis of methionine-enkephalin in human pituitary tissues." *Analytical Chemistry* 62(21): 2395-2400.
- Kutlu, M., Düzen, A., Bayçu, C. and Özata, A. (2002). "A transmission electron microscope investigation of the effect of lead acetate on the hepatopancreatic ceca of *Gammarus pulex*." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 12: 181-187.

- Lacaze, E. (2011). Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum* : développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel, Université de Metz.
- Lacaze, E., Devaux, A., Jubeaux, G., Mons, R., Gardette, M., Bony, S., Garric, J. and Geffard, O. (2011a). "DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: Intrinsic variability and reference level." Science of the Total Environment **409**(17): 3230-3236.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A. and Geffard, O. (2011b). "DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment." Environmental Pollution **159**(6): 1682-1691.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S. and Devaux, A. (2010). "Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay." Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **700**(1-2): 32-38.
- Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S. and Devaux, A. (2011c). "Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay." Environmental Research **111**(5): 626-634.
- Lachaise, F., Carpentier, G., Somme, G., Colardeau, J. and Beydon, P. (1989). "Ecdysteroid synthesis by crab Y-organs." Journal of Experimental Zoology **252**(3): 283-292.
- Lachaise, F., Le Roux, A., Hubert, M. and Lafont, R. (1993). "The molting activity of crustaceans: Localization, activity, and endocrine control." Journal of Crustacean Biology **13**(2): 198-234.
- Lafont, R. and Mathieu, M. (2007). "Steroids in aquatic invertebrates." Ecotoxicology **16**(1): 109-130.
- Lagadic, L. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux, Masson.
- Langston, W. J., Burt, G. R., Chesman, B. S. and Vane, C. H. (2005). "Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in the aquatic environment." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **85**(1): 1-31.
- Laufer, H. and Biccferst, W. J. (2001). "Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development1." American Zoologist **41**(3): 442-457.
- Laufer, H. and Downer, R. G. H. (1988). Endocrinology of selected invertebrate types. New York, Liss, A. R.
- Laufer, H., Landau, M., Homola, E. and Borst, D. W. (1987). "Methyl farnesoate, its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean." Insect Biochemistry **17**: 1129-1131.
- Le Roux, M.-L. (1933). Recherches sur la sexualité des gammariens. Sciences Naturelles. Paris, Faculté des Sciences de l'Université de Paris: 136.
- Le, T. H., Lim, E. S., Lee, S. K., Park, J. S., Kim, Y. H. and Min, J. (2011). "Toxicity evaluation of verapamil and tramadol based on toxicity assay and expression patterns of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna*." Environmental Toxicology **26**(5): 515-523.
- LeBlanc, G. A. (2007). "Crustacean endocrine toxicology: A review." Ecotoxicology **16**(1): 61-81.

- LeBlanc, G. A., Campbell, P., den Besten, P., Brown, R., Chang, E., Coats, J., deFur, P., Dhadialla, T., Edwards, J., Riddiford, L., Simpson, M., Snell, T., M., T. and Matsumura, F. (1999). The endocrinology of invertebrates. Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment. deFur, P., Crane, M., Ingersoll, C. and Tattersfield, L. Pensacola, SETAC Press: 23–106.
- LeBlanc, G. A. and McLachlan, J. B. (1999). "Molt-independent growth inhibition of *Daphnia magna* by a vertebrate antiandrogen." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(7): 1450-1455.
- LeBlanc, G. A. and McLachlan, J. B. (2000). "Changes in the metabolic elimination profile of testosterone following exposure of the crustacean *Daphnia magna* to tributyltin." Ecotoxicology and Environmental Safety **45**(3): 296-303.
- LeBlanc, G. A., Mu, X. Y. and Rider, C. V. (2000). "Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*." Environmental Health Perspectives **108**(12): 1133-1138.
- Lee, F. Y., Shih, T. W. and Chang, C. F. (1997). "Isolation and characterization of the female-specific protein (vitellogenin) in mature female hemolymph of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: Comparison with ovarian vitellin." General and Comparative Endocrinology **108**(3): 406-415.
- Lee, K. W., Hwang, D. S., Rhee, J. S., Ki, J. S., Park, H. G., Ryu, J. C., Raisuddin, S. and Lee, J. S. (2008). "Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene from the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **150**(4): 395-402.
- Lee, R. F. and Noone, T. (1995). "Effect of reproductive toxicants on lipovitellin in female blue crabs, *Callinectes sapidus*." Marine Environmental Research **39**(1-4): 151-154.
- Leinio, S. and Lehtonen, K. K. (2005). "Seasonal variability in biomarkers in the bivalves *Mytilus edulis* and *Macoma balthica* from the northern Baltic Sea." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **140**(3-4): 408-421.
- Lemos, M. F. L., van Gestel, C. A. M. and Soares, A. M. V. M. (2010). "Reproductive toxicity of the endocrine disrupters vinclozolin and bisphenol A in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Latreille, 1804)." Chemosphere **78**(7): 907-913.
- Leung, K. M. Y., Svavarsson, J., Crane, M. and Morritt, D. (2002). "Influence of static and fluctuating salinity on cadmium uptake and metallothionein expression by the dogwhelk *Nucella lapillus* (L.)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **274**(2): 175-189.
- Li, K., Chen, L., Li, E., Zhao, X. and Guo, H. (2006). "The site of vitellogenin synthesis in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*." Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology **143**(4): 453-458.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T. and Mori, K. (1998). "Changes in vitellin during oogenesis and effect of estradiol-17 $\beta$  on vitellogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Invertebrate Reproduction and Development **33**(1): 87-93.
- Li, Z., Zhang, S. and Liu, Q. (2008). "Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity." PLoS ONE **3**(4).

- Liber, K., Goodfellow, W., den Besten, P., Clements, W., Galloway, T., Gerhardt, A., Green, A. and Simpson, S. (2007). "In situ-based effects measures: considerations for improving methods and approaches." Integrated Environmental Assessment and Management **3**(2): 246-258.
- Liu, M., Pan, J., Ji, H., Zhao, B. and Zhang, S. (2011). "Vitellogenin mediates phagocytosis through interaction with FcγR." Molecular Immunology **49**(1-2): 211-218.
- Liu, Q. H., Zhang, S. C., Li, Z. J. and Gao, C. R. (2009). "Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*)." Immunobiology **214**(4): 257-267.
- Livingstone, D. R., Mitchelmore, C. L., Peters, L. D., O'Hara, S. C. M., Shaw, J. P., Chesman, B. S., Doyotte, A., McEvoy, J., Ronisz, D., Larsson, D. G. J. and Förlin, L. (2000). "Development of hepatic CYP1A and blood vitellogenin in eel (*Anguilla anguilla*) for use as biomarkers in the Thames Estuary, UK." Marine Environmental Research **50**(1-5): 367-371.
- Lockyer, A. E., Spinks, J. N., Walker, A. J., Kane, R. A., Noble, L. R., Rollinson, D., Dias-Neto, E. and Jones, C. S. (2007). "Biomphalaria glabrata transcriptome: Identification of cell-signalling, transcriptional control and immune-related genes from open reading frame expressed sequence tags (ORESTES)." Developmental and Comparative Immunology **31**(8): 763-782.
- Lüring, M., Sargant, E. and Roessink, I. (2006). "Life-history consequences for *Daphnia pulex* exposed to pharmaceutical carbamazepine." Environmental Toxicology **21**(2): 172-180.
- Lye, C. M., Bentley, M. G., Clare, A. S. and Sefton, E. M. (2005). "Endocrine disruption in the shore crab *Carcinus maenas* - A biomarker for benthic marine invertebrates?" Marine Ecology Progress Series **288**: 221-232.
- Lye, C. M., Bentley, M. G. and Galloway, T. (2008). "Effects of 4-nonylphenol on the endocrine system of the shore crab, *Carcinus maenas*." Environmental Toxicology **23**(3): 309-318.
- Lye, C. M., Frid, C. L. J., Gill, M. E. and McCormick, D. (1997). "Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works." Marine Pollution Bulletin **34**(1): 34-41.
- Ma, Y. X., Matsuda, K. and Uchiyama, M. (2005). "Seasonal variations in plasma concentrations of sex steroid hormones and vitellogenin in wild male Japanese dace (*Tribolodon hakonensis*) collected from different sites of the Jinzu River basin." Zoological Science **22**(8): 861-868.
- MacNeil, C., Dick, J. T. A., Bigsby, E., Elwood, R. W., Montgomery, W. I., Gibbins, C. N. and Kelly, D. W. (2002). "The validity of the *Gammarus: Asellus* ratio as an index of organic pollution: abiotic and biotic influences." Water Research **36**: 75-84.
- Macneil, C., Dick, J. T. A. and Elwood, R. W. (1997). "The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept." Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society **72**(3): 349-364.
- Mak, A. S. C., Choi, C. L., Tiu, S. H. K., Hui, J. H. L., He, J. G., Tobe, S. S. and Chan, S. M. (2005). "Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: Hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression." Molecular Reproduction and Development **70**(3): 288-300.



- Malbouisson, J. F. C., Young, T. W. K. and Bark, A. W. (1995). "Use of feeding rate and re-pairing of precopulatory *Gammarus pulex* to assess toxicity of gamma-hexachlorocyclohexane (Lindane)." Chemosphere **30**(8): 1573-1583.
- Maltby, L. (1992). "The use of the physiological energetics of *Gammarus pulex* to assess toxicity: A study using artificial streams." Environmental Toxicology and Chemistry **11**: 79-85.
- Maltby, L., Clayton, S. A., Wood, R. M. and McLoughlin, N. (2002). "Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(2): 361-368.
- Maltby, L., Naylor, C. and Calow, P. (1990). "Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate." Ecotoxicology and Environmental Safety **19**: 292-300.
- Maranhão, P. and Marques, J. C. (2003). "The influence of temperature and salinity on the duration of embryonic development, fecundity and growth of the amphipod *Echinogammarus marinus* Leach (Gammaridae)." Acta Oecologica **24**(1): 5-13.
- Marcial, H. S., Hagiwara, A. and Snell, T. W. (2003). "Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(12): 3025-3030.
- Marin, M. G., Rigato, S., Ricciardi, F. and Matozzo, V. (2008). "Lethal and estrogenic effects of 4-nonylphenol in the cockle *Cerastoderma glaucum*." Marine Pollution Bulletin **57**(6-12): 552-558.
- Markov, G., Lecointre, G., Demeneix, B. and Laudet, V. (2008). "The "street light syndrome", or how protein taxonomy can bias experimental manipulations." BioEssays **30**(4): 349-357.
- Markov, G. V., Tavares, R., Dauphin-Villemant, C., Demeneix, B. A., Baker, M. E. and Laudet, V. (2009). "Independent elaboration of steroid hormone signaling pathways in metazoans." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **106**(29): 11913-11918.
- Martin-Diaz, M., Sales, D. and Del Valls, T. A. (2004). "Influence of salinity in hemolymph vitellogenin of the shore crab *Carcinus maenas*, to be use as a biomarker of contamination." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **73**: 870-877.
- Martin-Diaz, M., Tuberty, S. R., McKenney, C. L. J., Blasco, J., Sarasquete, C. and Delvalls, T. A. (2006). "The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in *Procambarus clarkii* to establish biavailability of Cd and Zn after a mining spill." Environmental Monitoring and Assessment **116**: 169-184.
- Martín-Díaz, M. L., Villena-Lincoln, A., Bamber, S., Blasco, J. and DelValls, T. Á. (2005). "An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*." Chemosphere **58**(5): 615-626.
- Martin, G., Juchault, P., Sorokine, O. and Van Dorsselaer, A. (1990). "Purification and characterization of androgenic hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. (crustacea, oniscidea)." General and Comparative Endocrinology **80**(3): 349-354.
- Martin, G., Sorokine, O., Moniatte, M., Bulet, P., Hetru, C. and Van Dorsselaer, A. (1999). "The structure of a glycosylated protein hormone responsible for sex determination in the isopod, *Armadillidium vulgare*." European Journal of Biochemistry **262**(3): 727-736.

- Martin, J. W. and Davis, G. E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea. Sciences Series, Natural History Museum of Los Angeles Country. Los Angeles.
- Matozzo, V., Binelli, A., Parolini, M., Locatello, L. and Marin, M. G. (2010). "Biomarker responses and contamination levels in the clam *Ruditapes philippinarum* for biomonitoring the Lagoon of Venice (Italy)." Journal of Environmental Monitoring **12**(3): 776-786.
- Matozzo, V., Formenti, A., Donadello, G. and Marin, M. G. (2012). "A multi-biomarker approach to assess effects of Triclosan in the clam *Ruditapes philippinarum*." Marine Environmental Research **74**: 40-46.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M. G., Ricciardi, F. and Blaise, C. (2008). "Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review." Environment International **34**(4): 531-545.
- Matozzo, V. and Marin, M. G. (2005). "Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*?" Environmental Research **97**(1): 43-49.
- Matozzo, V. and Marin, M. G. (2008). "Can 17- $\beta$  estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*?" Environmental Toxicology and Pharmacology **26**(1): 38-44.
- Matsumoto, T., Nakamura, A. M., Mori, K. and Kayano, T. (2003). "Molecular characterization of a cDNA encoding putative vitellogenin from the Pacific oyster *Crassostrea gigas*." Zoological Science **20**(1): 37-42.
- Matsumoto, T., Yamano, K., Kitamura, M. and Hara, A. (2008). "Ovarian follicle cells are the site of vitellogenin synthesis in the Pacific abalone *Haliotis discus hannai*." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **149**(3): 293-298.
- Matthiessen, P. (2003a). "Endocrine disruption in marine fish." Pure. Appl. Chem. **75**: 2249-2261.
- Matthiessen, P. (2003b). "Historical perspective on endocrine disruption in wildlife." Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 2197-2206.
- Matthiessen, P., Sheahan, D., Harrison, R., Kirby, M., Rycroft, R., Turnbull, A., Volkner, C. and Williams, R. (1995). "Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland." Ecotoxicology and Environmental Safety **30**(2): 111-119.
- Matthiessen, P. and Sumpter, J. P. (1998). "Effects of estrogenic substances in the aquatic environment." EXS **86**: 319-335.
- Mazurová, E., Hilscherová, K., Triebkorn, R., Köhler, H. R., Maršálek, B. and Bláha, L. (2008). "Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans: Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants." Biologia **63**(2): 139-150.
- McCarthy, J. F. and Shugart, L. R. (1990). Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton, Florida, USA, Lewis Publishers.
- McKenney, C. L. and Celestial, D. M. (1993). "Variations in larval growth and metabolism of an estuarine shrimp *Palaemonetes pugio* during toxicosis by an insect growth-regulator." Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology **105**(2): 239-245.

- McKenney, C. L. and Celestial, D. M. (1996). "Modified survival, growth and reproduction in an estuarine mysid (*Mysidopsis bahia*) exposed to a juvenile hormone analogue through a complete life cycle." Aquatic Toxicology **35**: 11-20.
- McKenney, C. L., Cripe, G. M., Foss, S. S., Tuberty, S. R. and Høglund, M. (2004). "Comparative embryonic and larval developmental responses of estuarine shrimp (*Palaemonetes pugio*) to the juvenile hormone agonist fenoxycarb." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **47**(4): 463-470.
- McKenney, C. L., Jr. (2005). "The influence of insect juvenile hormone agonists on metamorphosis and reproduction in estuarine Crustaceans." Integrative and Comparative Biology **45**(1): 97-105.
- McKenney, J. C. L. and Matthews, E. (1990). "Influence of an insect growth regulator on the larval development of an estuarine shrimp." Environmental Pollution **64**(2): 169-178.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R. M. and Yu, H. (2000). "Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(8): 2085-2092.
- Menezes, S., Soares, A., Guilhermino, L. and Peck, M. R. (2006). "Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: Temperature, salinity and handling stress effects." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **335**(1): 114-122.
- Meusy, J.-J., Junera, H. and Y., C. (1974). "Données sur la synthèse de la fraction protéique femelle chez *Orchestia gammarella* Palas (Crustacé Amphipode), au cours de l'intermue et chez les femelles en repos sexuel." Compte Rendu de l'Académie des Science de Paris **279**: 587-590.
- Miège, C., Choubert, J. M., Ribeiro, L., Eusèbe, M. and Coquery, M. (2009). "Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results." Environmental Pollution **157**(5): 1721-1726.
- Milanesi, L., Monje, P. and Boland, R. (2001). "Presence of estrogens and estrogen receptor-like proteins in *Solanum glaucophyllum*." Biochemical and Biophysical Research Communications **289**(5): 1175-1179.
- Moreira, S. M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L. and Ribeiro, R. (2006). "An in situ postexposure feeding assay with *Carcinus maenas* for estuarine sediment-overlying water toxicity evaluations." Environmental Pollution **139**(2): 318-329.
- Moroz, L. L., Edwards, J. R., Puthanveettil, S. V., Kohn, A. B., Ha, T., Heyland, A., Knudsen, B., Sahni, A., Yu, F., Liu, L., Jezzini, S., Lovell, P., Iannuccilli, W., Chen, M., Nguyen, T., Sheng, H., Shaw, R., Kalachikov, S., Panchin, Y. V., Farmerie, W., Russo, J. J., Ju, J. and Kandel, E. R. (2006). "Neuronal Transcriptome of *Aplysia*: Neuronal Compartments and Circuitry." Cell **127**(7): 1453-1467.
- Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J. C. and Rainbow, P. S. (2001). "Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in and out of the reproductive season." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **129**(3): 193-209.
- Mu, X. and LeBlanc, G. A. (2002a). "Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity." General and Comparative Endocrinology **129**(2): 127-133.
- Mu, X. and Leblanc, G. A. (2002b). "Environmental anti-ecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*." Journal of Experimental Zoology **292**(3): 287-292.

- Mu, X. and LeBlanc, G. A. (2003). "Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity." General and Comparative Endocrinology **129**(2): 127-133.
- Mu, X. and LeBlanc, G. A. (2004). "Synergistic interaction of endocrine-disrupting chemicals: Model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(4): 1085-1091.
- Mykles, D. L. (2011). "Ecdysteroid metabolism in crustaceans." Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **127**(3-5): 196-203.
- Nagaraju, G. P. C. (2007). "Is methyl farnesoate a crustacean hormone?" Aquaculture **272**(1-4): 39-54.
- Nagaraju, G. P. C. (2011). "Reproductive regulators in decapod crustaceans: An overview." Journal of Experimental Biology **214**(1): 3-16.
- Nagaraju, G. P. C., Suraj, N. J. and Reddy, P. S. (2003). "Methyl farnesoate stimulates gonad development in *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae)." Crustaceana **76**(10): 1171-1178.
- Nakagawa, Y. and Henrich, V. C. (2009). "Arthropod nuclear receptors and their role in molting." FEBS Journal **276**(21): 6128-6157.
- Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N. and Goto, S. (1999). "Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*." Biochemical and Biophysical Research Communications **264**(2): 580-583.
- Nakatsuji, T., Lee, C. Y. and Watson, R. D. (2009). "Crustacean molt-inhibiting hormone: Structure, function, and cellular mode of action." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **152**(2): 139-148.
- Nakatsuji, T. and Sonobe, H. (2004). "Regulation of ecdysteroid secretion from the Y-organ by molt-inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*." General and Comparative Endocrinology **135**(3): 358-364.
- Nassef, M., Kim, S. G., Seki, M., Kang, I. J., Hano, T., Shimasaki, Y. and Oshima, Y. (2010). "In ovo nanoinjection of triclosan, diclofenac and carbamazepine affects embryonic development of medaka fish (*Oryzias latipes*)." Chemosphere **79**(9): 966-973.
- Nates, S. F. and McKenney, C. L. (2000). "Growth, lipid class and fatty acid composition in juvenile mud crabs (*Rhithropanopeus harrisi*) following larval exposure to fenoxycarb, insect juvenile hormone analog." Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology **127**: 317-325.
- Naylor, C., Maltby, L. and Calow, P. (1989). "Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore." Hydrobiologia **188/189**: 517-523.
- Nebeker, A. V. and Schuytma, G. S. (1998). "Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **35**(3): 441-446.
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page Jr, R. E. and Amdam, G. V. (2007). "The gene vitellogenin has multiple coordinating effects on social organization." PLoS Biology **5**(3): 0673-0677.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Neuparth, T., Correia, A. D., Costa, F. O., Lima, G. and Costa, M. H. (2005). "Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I. Biochemical endpoints." Marine Environmental Research **60**(1): 69-91.
- Nikinmaa, M. and Rytönen, K. T. (2011). "Functional genomics in aquatic toxicology—Do not forget the function." Aquatic Toxicology **105**(3-4, Supplement): 16-24.
- Nilsen, B. M., Berg, K., Arukwe, A. and Goksøyr, A. (1998). "Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring." Marine Environmental Research **46**(1-5): 153-157.
- Nilsen, B. M., Berg, K., Eidem, J. K., Kristiansen, S. I., Brion, F., Porcher, J. M. and Goksøyr, A. (2004). "Development of quantitative vitellogenin-ELISAs for fish test species used in endocrine disruptor screening." Analytical and Bioanalytical Chemistry **378**(3): 621-633.
- Norris, D. O. and Carr, J. A. (2006). Endocrine disruption: biological basis for health effects in wildlife and humans, Oxford University Press.
- Oberdörster, E., Brouwer, M., Hoexum-Brouwer, T., Manning, S. and McLachlan, J. A. (2000). "Long-term pyrene exposures of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, affects molting and reproduction of exposed males and offspring of exposed females." Environmental Health Perspectives **108**(7): 641-646.
- Oberdorster, E., Rice, C. D. and Irwin, L. K. (2000). "Purification of vitellin from grass shrimp *Palaemonetes pugio*, generation of monoclonal antibodies, and validation for the detection of lipovitellin in Crustacea." Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology and Endocrinology **127**(2): 199-207.
- Oda, S., Tatarazako, N., Watanabe, H., Morita, M. and Iguchi, T. (2005). "Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs." Chemosphere **61**(8): 1168-1174.
- Oehlmann, J. and Schulte-Oehlmann, U. (2003). "Endocrine disruption in invertebrates." Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 2207-2218.
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U. and Oehlmann, J. (2004a). Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. International Review of Cytology, Academic Press. **Volume 236**: 1-44.
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U. and Oehlmann, J. (2004b). Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates, International Review of Cytology. Press, A. **236**: 1-44.
- Ohira, T., Okumura, T., Suzuki, M., Yajima, Y., Tsutsui, N., Wilder, M. N. and Nagasawa, H. (2006). "Production and characterization of recombinant vitellogenesis-inhibiting hormone from the American lobster *Homarus americanus*." Peptides **27**(6): 1251-1258.
- Oikari, A. (2006). "Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants." Aquatic Toxicology **78**(4): 370-381.
- Okumura, T. and Aida, K. (2000). "Hemolymph vitellogenin levels and ovarian development during the reproductive and non reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*." Fisheries Science **66**(4): 678-685.

- Okuno, A., Hasegawa, Y. and Nagasawa, H. (1997). "Purification and properties of androgenic gland hormone from the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare*." Zoological Science **14**(5): 837-842.
- Okuno, A., Katayama, H. and Nagasawa, H. (2000). "Partial characterization of vitellin and localization of vitellogenin production in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare*." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **126**(3): 397-407.
- Okuno, A., Yang, W. J., Jayasankar, V., Saido-Sakanaka, H., Huong, D. T. T., Jasmani, S., Atmomarsono, M., Subramoniam, T., Tsutsui, N., Ohira, T., Kawazoe, I., Aida, K. and Wilder, M. N. (2002). "Deduced primary structure of vitellogenin in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, and yolk processing during ovarian maturation." Journal of Experimental Zoology **292**(5): 417-429.
- Olmstead, A. W. and LeBlanc, G. A. (2001a). "Temporal and quantitative changes in sexual reproductive cycling of the cladoceran *Daphnia magna* by a juvenile hormone analog." Journal of Experimental Zoology **290**: 148-155.
- Olmstead, A. W. and Leblanc, G. A. (2002). "Juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*." Journal of Experimental Zoology **293**(7): 736-739.
- Olmstead, A. W. and LeBlanc, G. A. (2003). "Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*." Environmental Health Perspectives **111**(7): 919-924.
- Olmstead, A. W. and LeBlanc, G. A. (2007). "The environmental endocrine basis of gynandromorphism (Intersex) in a Crustacean." International Journal of Biological Sciences **3**(2): 77-84.
- Olmstead, A. W. and LeBlanc, G. L. (2001b). "Low exposure concentration effects of methoprene on endocrine-regulated processes in the Crustacean *Daphnia magna*." Toxicological Sciences **62**(2): 268-273.
- Ortiz-Zarragoitia, M. and Cajaraville, M. P. (2006). "Biomarkers of exposure and reproduction-related effects in mussels exposed to endocrine disruptors." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **50**(3): 361-369.
- Ortiz-Zarragoitia, M. and Cajaraville, M. P. (2010). "Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay)." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(5): 693-701.
- Osada, M., Harata, M., Kishida, M. and Kijima, A. (2004). "Molecular Cloning and Expression Analysis of Vitellogenin in Scallop, *Patinopekten yessoensis* (Bivalvia, Mollusca)." Molecular Reproduction and Development **67**(3): 273-281.
- Osada, M., Takamura, T., Sato, H. and Mori, K. (2003). "Vitellogenin Synthesis in the Ovary of Scallop, *Patinopekten yessoensis*: Control by Estradiol-17 $\beta$  and the Central Nervous System." Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology **299**(2): 172-179.
- Palma, P., Palma, V. L., Matos, C., Fernandes, R. M., Bohn, A., Soares, A. M. V. M. and Barbosa, I. R. (2009). "Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*." Chemosphere **74**(5): 676-681.
- Pampanin, D. M., Marangon, I., Volpato, E., Campesan, G. and Nasci, C. (2005). "Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy)." Environmental Pollution **136**(1): 103-107.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Pan, S., Aebersold, R., Chen, R., Rush, J., Goodlett, D. R., McIntosh, M. W., Zhang, J. and Brentnall, T. A. (2009). "Mass spectrometry based targeted protein quantification: Methods and applications." Journal of Proteome Research **8**(2): 787-797.
- Paran, B. C., Fierro, I. J. and Tsukimura, B. (2010). "Stimulation of ovarian growth by methyl farnesoate and eyestalk ablation in penaeoidean model shrimp, *Sicyonia ingentis* Burkenroad, 1938." Aquaculture Research **41**(12): 1887-1897.
- Parks, L. G. and LeBlanc, G. A. (1996). "Reductions in steroid hormone biotransformation/elimination as a biomarker of pentachlorophenol chronic toxicity." Aquatic Toxicology **34**(4): 291-303.
- Pascoe, D., Kedwards, T. J., Maund, S. J., Muthi, E. and Taylor, E. J. (1994). "Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay - The *Gammarus pulex* (L.) precopula separation (GaPPS) test." Water Research **28**(2): 369-372.
- Payen, G. G. and Costlow, J. D. (1977). "Effects of a juvenile hormone mimic on male and female gametogenesis of the mud-crab *Rhithropanopeus harrisi* (Gould) (Brachyura: Xanthidae)." The Biological Bulletin **152**(2): 199-208.
- Peakall, D. B. (1994). "The role of biomarkers in environmental assessment. (1) Introduction." Ecotoxicology **3**(3): 157-160.
- Peterson, K. J., Lyons, J. B., Nowak, K. S., Takacs, C. M., Wargo, M. J. and McPeck, M. A. (2004). "Estimating metazoan divergence times with a molecular clock." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(17): 6536-6541.
- Pfeifer, S., Schiedek, D. and Dippner, J. W. (2005). "Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp* from the south-western Baltic Sea." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **320**(1): 93-103.
- Phiriyangkul, P. and Utarabhand, P. (2006). "Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin in the banana shrimp, *Penaeus* (*Litopenaeus*) *merguiensis* and sites of vitellogenin mRNA expression." Molecular Reproduction and Development **73**(4): 410-423.
- Pisanelli, B., Benedetti, M., Fattorini, D. and Regoli, F. (2009). "Seasonal and inter-annual variability of DNA integrity in mussels *Mytilus galloprovincialis*: A possible role for natural fluctuations of trace metal concentrations and oxidative biomarkers." Chemosphere **77**(11): 1551-1557.
- Porte, C., Janer, G., Lorusso, L. C., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M. P., Fossi, M. C. and Canesi, L. (2006). "Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **143**(3): 303-315.
- Poynton, H. C., Varshavsky, J. R., Chang, B., Cavigliolo, G., Chan, S., Holman, P. S., Loguinov, A. V., Bauer, D. J., Komachi, K., Theil, E. C., Perkins, E. J., Hughes, O. and Vulpe, C. D. (2007). "*Daphnia magna* ecotoxicogenomics provides mechanistic insights into metal toxicity." Environmental Science and Technology **41**(3): 1044-1050.
- Prato, E., Biandolino, F. and Scardicchio, C. (2008). "Implications for toxicity tests with amphipod *Gammarus aequicauda*: Effects of temperature and salinity on life cycle." Environmental Technology **29**(12): 1349-1356.

- Prestwich, G. D., Bruce, M. J., Ujváry, I. and Chang, E. S. (1990). "Binding proteins for methyl farnesoate in lobster tissues: Detection by photoaffinity labeling." General and Comparative Endocrinology **80**(2): 232-237.
- Puinean, A. M., Labadie, P., Hill, E. M., Osada, M., Kishida, M., Nakao, R., Novillo, A., Callard, I. P. and Rotchell, J. M. (2006). "Laboratory exposure to 17 $\beta$ -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*." Aquatic Toxicology **79**(4): 376-383.
- Puinean, A. M. and Rotchell, J. M. (2006). "Vitellogenin gene expression as a biomarker of endocrine disruption in the invertebrate, *Mytilus edulis*." Marine Environmental Research **62**(SUPPL. 1): S211-S214.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., Costello, M. J., Wilson, J. G. and Mothersill, C. (2006). "Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **142**(1-2): 118-127.
- Quinn, B., Gagné, F., Costello, M., McKenzie, C., Wilson, J. and Mothersill, C. (2004). "The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*)." Aquatic Toxicology **66**(3): 279-292.
- Quinn, B., Gagné, F., Weber, J. P. and Blaise, C. (2005). "Ecotoxicological effects of a semi-submerged municipal dump (Castle harbour, Bermuda) on the Calico scallop *Argopecten gibbus*." Marine Pollution Bulletin **51**(5-7): 534-544.
- Quinn, B., Schmidt, W., O'Rourke, K. and Hernan, R. (2011). "Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on biomarker expression in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and their comparison with standardised toxicity tests." Chemosphere **84**(5): 657-663.
- R Development Core Team (2008a). R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing.
- R Development Core Team (2008b). "R: A language and environment for statistical computing." R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Raag, R., Appelt, K., Xuong, N. H. and Banaszak, L. (1988). "Structure of the lamprey yolk lipid-protein complex lipovitellin-phosvitin at 2.8 Å resolution." Journal of Molecular Biology **200**(3): 553-569.
- Raikhel, A. S. and Dhadialla, T. S. (1992). "Accumulation of yolk proteins in insect oocytes." Annual Review Of Entomology **37**(1): 217-251.
- Raviv, S., Parnes, S., Segall, C., Davis, C. and Sagi, A. (2006). "Complete sequence of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) vitellogenin cDNA and its expression in endocrinologically induced sub-adult females." General and Comparative Endocrinology **145**(1): 39-50.
- Reddy, M. S., Bhagyalashkim, A. and Ramamurthi, R. (1982). "BHC-induced molt inhibition in the fresh-water rice field crab (*Oziotelphusa senex senex* Fabricius)." Journal of Experimental Zoology **223**: 183-184.
- Reddy, M. S. and Rao, K. R. (1987). "Phosphamidon and lidane induced molt inhibition in the marine prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius)." National Academy Science Letters-India **10**: 255-257.



- Reddy, P. R., Nagaraju, G. P. C. and Reddy, P. S. (2004). "Involvement of methyl farnesoate in the regulation of molting and reproduction in the freshwater crab *Oziotelphusa senex senex*." Journal of Crustacean Biology **24**(3): 511-515.
- Regier, J. C., Shultz, J. W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzer, R., Martin, J. W. and Cunningham, C. W. (2010). "Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein-coding sequences." Nature **463**(7284): 1079-1083.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., Binelli, A. and Marin, M. G. (2010). "Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments." Water Research **44**(6): 1725-1736.
- Ricciardi, F., Matozzo, V. and Marin, M. G. (2008). "Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction." Marine Pollution Bulletin **57**(6-12): 365-372.
- Rider, C. V., Gorr, T. A., Olmstead, A. W., Wasilak, B. A. and LeBlanc, G. A. (2005). "Stress signaling: coregulation of hemoglobin and male sex determination through a terpenoid signaling pathway in a crustacean." Journal of Experimental Biology **208**: 15-23.
- Riffeser, M. and Hock, B. (2002). "Vitellogenin levels in mussel hemolymph - A suitable biomarker for the exposure to estrogens?" Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **132**(1): 75-84.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J. and Zauke, G.-P. (2000). Crustaceans as Bioindicators. Biomonitoring of polluted water - Reviews on actual topics, environmental research forum. Gerhardt, A. Zürich, Trans Tech Publications - Scitech Publications. **9**: 161-194.
- Rinderhagen M, R. J., Zauke G-P (2000). Crustaceans as bioindicators. In: Gerhardt A (ed) Biomonitoring of polluted water—reviews on actual topics, environmental research forum. **9. Trans Tech Publications—Scitech Publications, Zürich**: 161-194.
- Rodríguez, E. M., López Greco, L. S., Medesani, D. A., Laufer, H. and Fingerman, M. (2002). "Effect of methyl farnesoate, alone and in combination with other hormones, on ovarian growth of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, during vitellogenesis." General and Comparative Endocrinology **125**(1): 34-40.
- Rodríguez, E. M., Medesani, D. A. and Fingerman, M. (2007). "Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **146**(4): 661-671.
- Roman, Y. E., De Schampelaere, K. A. C., Nguyen, L. T. H. and Janssen, C. R. (2007). "Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment." Science of the Total Environment **387**(1-3): 128-140.
- Rono, M. K., Whitten, M. M. A., Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E. A. and Marois, E. (2010). "The major yolk protein vitellogenin interferes with the anti-plasmodium response in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*." PLoS Biology **8**(7).
- Rosen, O., Manor, R., Weil, S., Gafni, O., Linial, A., Aflalo, E. D., Ventura, T. and Sagi, A. (2010). "A sexual shift induced by silencing of a single insulin-like gene in crayfish: Ovarian upregulation and testicular degeneration." PLoS ONE **5**(12).

- Rosenberg, D. M. and Resh, V. H. (1993). Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates. New York, Chapman & Hall.
- Roux, L. A. (1970). "Les gammarès du groupe *pulex*. Essai de systématique biologique. I. - Etude Morphologique et Morphométrique." Archives de Zoologie Expérimentale et Générale **111**: 313-356.
- Rudolph, P. H. and Spaziani, E. (1992). "Formation of ecdysteroids by Y-organs of the crab, *Menippe mercenaria*. II. Incorporation of cholesterol into 7-dehydrocholesterol and secretion products in vitro." General and Comparative Endocrinology **88**(2): 235-242.
- Sagi, A., Homola, E. and Laufer, H. (1993). "Distinct reproductive types of male spider crabs *Libinia emarginata* differ in circulating and synthesizing methyl farnesoate." The Biological Bulletin **185**(2): 168-173.
- Sagi, A., Khalaila, I., Abdu, U., Shoukrun, R. and Weil, S. (1999). "A newly established ELISA showing the effect of the androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*." General and Comparative Endocrinology **115**(1): 37-45.
- Sanders, M. B., Billingham, Z., Depledge, M. H. and Clare, A. S. (2005). "Larval development and vitellin-like protein expression in *Palaemon elegans* larvae following xeno-oestrogen exposure." Integrative and Comparative Biology **45**(1): 51-60.
- Sappington, T., Oishi, K. and Raikhel, A. (2002). Structural characteristics of insect vitellogenin. Reproductive biology of invertebrates. Raikhel, A. S. and Sappington, T. W., Enfield. **XII**: pp 69–101.
- Sappington, T. W. (2002). "The major yolk proteins of higher diptera are homologs of a class of minor yolk proteins in lepidoptera." Journal of Molecular Evolution **55**(4): 470-475.
- Sappington TW, O. K., Raikhel AS. Structural characteristics of insect vitellogenin. In: Raikhel AS, Sappington TW (eds) Reproductive biology of invertebrates, vol XII (part A). Science Publishers Inc., Enfield, pp 69–101 (2002).
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K. U., Nagel, R., Kohler, H. R. and Triebkorn, R. (2006). "Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda)." Ecotoxicology **15**(2): 143-156.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebkorn, R. and Köhler, H.-R. (2005). "Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **49**: 53-61.
- Schmitt, C., Vogt, C., Van Ballaer, B., Brix, R., Suetens, A., Schmitt-Jansen, M. and de Deckere, E. (2010). "In situ cage experiments with *Potamopyrgus antipodarum*-A novel tool for real life exposure assessment in freshwater ecosystems." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(7): 1574-1579.
- Schmitz, E. H. (1992). Amphipoda. Microscopic Anatomy of invertebrates. Harrison, F. W. and Humes, A. G. New York, John Wiley and Son.
- Schulz, R. (2003). "Using a freshwater amphipod in situ bioassay as a sensitive tool to detect pesticide effects in the field." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(5): 1172-1176.

- Seehuus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. and Amdam, G. V. (2006). "Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress." Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America **103**(4): 962-967.
- Serrano-Pinto, V., Landais, I., Ogliastro, M. H., Gutiérrez-Ayala, M., Mejía-Ruíz, H., Villarreal-Colmenares, H., García-Gasca, A. and Vázquez-Boucard, C. (2004). "Vitellogenin mRNA expression in *Cherax quadricarinatus* during secondary vitellogenic at first maturation females." Molecular Reproduction and Development **69**(1): 17-21.
- Sharpe, R. L., MacLatchy, D. L., Courtenay, S. C. and Van Der Kraak, G. J. (2004). "Effects of a model androgen (methyl testosterone) and a model anti-androgen (cyproterone acetate) on reproductive endocrine endpoints in a short-term adult mummichog (*Fundulus heteroclitus*) bioassay." Aquatic Toxicology **67**(3): 203-215.
- Sharrock, W. J., Rosenwasser, T. A., Gould, J., Knott, J., Hussey, D., Gordon, J. I. and Banaszak, L. (1992). "Sequence of lamprey vitellogenin. Implications for the lipovitellin crystal structure." Journal of Molecular Biology **226**(3): 903-907.
- Shi, X., Zhang, S. and Pang, Q. (2006). "Vitellogenin is a novel player in defense reactions." Fish and Shellfish Immunology **20**(5): 769-772.
- Sieratowicz, A., Kaiser, D., Behr, M., Oetken, M. and Oehlmann, J. (2011). "Acute and chronic toxicity of four frequently used UV filter substances for *Desmodesmus subspicatus* and *Daphnia magna*." Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering **46**(12): 1311-1319.
- Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Lemoine, J., Geffard, O. and Salvador, A. (2010). "Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*)." Journal of Chromatography A **1217**(31): 5109-5115.
- Smolenaars, M. M. W., Madsen, O., Rodenburg, K. W. and Van Der Horst, D. J. (2007). "Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily." Journal of Lipid Research **48**(3): 489-502.
- Snyder, M. J. and Mulder, E. P. (2001). "Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure." Aquatic Toxicology **55**(3-4): 177-190.
- Soetaert, A., Moens, L. N., Van Der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R. and De Coen, W. M. (2006). "Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **142**(1-2): 66-76.
- Solé, M., Barceló, D. and Porte, C. (2002). "Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus carpio*, in relation to sewage treatment plants." Aquatic Toxicology **60**(3-4): 233-248.
- Souty, C., Besse, G. and Picaud, J. L. (1982). "Ecdysone stimulates the rate of vitellogenin release in haemolymph of the terrestrial crustacean isopoda *Porcellio dilatatus* brandt." STIMULATION PAR L'ECDYSONE DU TAUX HEMOLYMPHATIQUE DE LA VITELLOGENINE CHEZ LE CRUSTACE ISOPODE TERRESTRE PORCELLIO DILATATUS BRANDT **294**(22): 1057-1059.

- Spaziani, E. and Kater, S. B. (1973). "Uptake and turnover of cholesterol 14C in Y organs of the crab *Hemigrapsus* as a function of the molt cycle." General and Comparative Endocrinology **20**(3): 534-549.
- Spaziani, E., Mairson, M. P., Wang, W. L. and McÜougall, H. E. (1999). "Signaling pathways for ecdysteroid hormone synthesis in crustacean y-organs." American Zoologist **39**(3): 496-512.
- Spaziani, E., Rees, H. H., Wang, W. L. and Watson, R. D. (1989). "Evidence that Y-organs of the crab *Cancer antennarius* secrete 3-dehydroecdysone." Molecular and Cellular Endocrinology **66**(1): 17-25.
- Spaziani, E. and Wang, W. L. (1993). "Biosynthesis of ecdysteroid hormones by crustacean Y-organs: Conversion of cholesterol to 7-dehydrocholesterol is suppressed by a steroid 5 $\alpha$ -reductase inhibitor." Molecular and Cellular Endocrinology **95**(1-2): 111-114.
- Stanley, J. K., Ramirez, A. J., Mottaleb, M., Chambliss, C. K. and Brooks, B. W. (2006). "Enantiospecific toxicity of the  $\beta$ -blocker propranolol to *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*." Environmental Toxicology and Chemistry **25**(7): 1780-1786.
- Streit, B. and Kuhn, K. (1994). "Effects of organophosphorous insecticides on autochthonous and introduced *Gammarus* species." Water Science and Technology **29**(3): 233-240.
- Studer, R. A. and Robinson-Rechavi, M. (2009). "How confident can we be that orthologs are similar, but paralogs differ?" Trends in Genetics **25**(5): 210-216.
- Subramoniam, T. (2000). "Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis." Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology **125**(2): 135-156.
- Subramoniam, T. (2011). "Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans." Fisheries Science **77**(1): 1-21.
- Subramoniam, T., Tirumalai, R., Gunamalai, V. and Hoffmann, K. H. (1999). "Embryonic ecdysteroids in a mole crab, *Emerita asiatica* (Milne-Edwards)." Journal of Biosciences **24**(1): 91-96.
- Sumpter, J. P. and Jobling, S. (1995). "Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment." Environmental Health Perspectives **103**(SUPPL. 7): 173-178.
- Sundelin, B. and Eriksson, A. K. (1998). "Malformations in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic Sea." Marine Ecology Progress Series **171**: 165-180.
- Sundelin, B., Ryk, C. and Malmberg, G. (2000). "Effects on the sexual maturation of the sediment-living amphipod *Monoporeia affinis*." Environmental Toxicology **15**(5): 518-526.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Fujita, T., Mamiya, Y. and Sonobe, H. (1996). "Ovarian and hemolymph ecdysteroids in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (malacostracan crustacea)." General and Comparative Endocrinology **104**(2): 129-138.
- Suzuki, S., Yamasaki, K. and Katakura, Y. (1990). "Vitellogenin synthesis in andrectomized males in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare* (Malacostracan crustacea)." General and Comparative Endocrinology **77**(2): 283-291.

- Tachet, H., Bournaud, M., Richoux, P. and Usseglio-Polatera (2000). Invertébrés d'eau douce : Systématiques, biologie, écologie. Paris.
- Tahara, D., Suitoh, K. and Hattori, H. (2005). "Hemolymph vitellogenin levels during final maturation and post-spawning in the female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*." Aquaculture **245**(1-4): 311-319.
- Takáč, P., Ahl, J. S. B. and Laufer, H. (1998). "Methyl farnesoate binding proteins in tissues of the spider crab, *Libinia emarginata*." Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology **120**(4): 769-775.
- Taleb, Z. M., Benali, I., Gherras, H., Ykhlef-Allal, A., Bachir-Bouiadjra, B., Amiard, J. C. and Boutiba, Z. (2009). "Biomonitoring of environmental pollution on the Algerian west coast using caged mussels *Mytilus galloprovincialis*." Oceanologia **51**(1): 63-84.
- Tarrant, A. M., Behrendt, L., Stegeman, J. J. and Verslycke, T. (2011). "Ecdysteroid receptor from the American lobster *Homarus americanus*: EcR/RXR isoform cloning and ligand-binding properties." General and Comparative Endocrinology **173**(2): 346-355.
- Tatarazako, N., Oda, S., Watanabe, H., Morita, M. and Iguchi, T. (2003). "Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*." Chemosphere **53**(8): 827-833.
- Tatarazako, N., Takao, Y., Kishi, K., Onikura, N., Arizono, K. and Iguchi, T. (2002). "Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnid (*Ceriodaphnia dubia*)." Chemosphere **48**(6): 597-601.
- Taylor, E. J., Jones, D. P., Maund, S. J. and Pascoe, D. (1993). "A new method for measuring the feeding activity of *Gammarus pulex* (L)." Chemosphere **26**(7): 1375-1381.
- Tester, P. A. and Costlow, J. D. (1981). "Effect of insect growth-regulator dimilin (TH-6040) on fecundity and egg viability of the marine copepod *Arcatia tonsa*." Marine Ecology-Progress Series **5**: 297-302.
- Thomson, S. A., Baldwin, W. S., Wang, Y. H., Kwon, G. and LeBlanc, G. A. (2009). "Annotation, phylogenetics, and expression of the nuclear receptors in *Daphnia pulex*." BMC Genomics **10**: 500.
- Thornton, J. W. (2003). "Nonmammalian nuclear receptors: Evolution and endocrine disruption." Pure and Applied Chemistry **75**(11-12): 1827-1839.
- Tiu, S. H. K., Hui, H. L., Tsukimura, B., Tobe, S. S., He, J. G. and Chan, S. M. (2009). "Cloning and expression study of the lobster (*Homarus americanus*) vitellogenin: Conservation in gene structure among decapods." General and Comparative Endocrinology **160**(1): 36-46.
- Tiu, S. H. K., Hui, J. H. L., He, J. G., Tobe, S. S. and Chan, S. M. (2006a). "Characterization of vitellogenin in the shrimp *Metapenaeus ensis*: Expression studies and hormonal regulation of MeVg1 transcription in vitro." Molecular Reproduction and Development **73**(4): 424-436.
- Tiu, S. H. K., Hui, J. H. L., Mak, A. S. C., He, J. G. and Chan, S. M. (2006b). "Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*." Aquaculture **254**(1-4): 666-674.
- Tobe, S. S. and Bendena, W. G. (1999). The regulation of juvenile hormone production in arthropods. Functional and evolutionary perspectives. **897**: 300-310.

- Tokishita, S., Kato, Y., Kobayashi, T., Nakamura, S., Ohta, T. and Yamagata, H. (2006). "Organization and repression by juvenile hormone of a vitellogenin gene cluster in the crustacean, *Daphnia magna*." Biochemical and Biophysical Research Communications **345**(1): 362-370.
- Tong, Z., Li, L., Pawar, R. and Zhang, S. (2010). "Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities." Immunobiology **215**(11): 898-902.
- Trayler, K. M. and Davis, J. A. (1996). "Sensitivity of *Daphnia carinata* sensu lato to the insect growth regulator, pyriproxyfen." Ecotoxicology and Environmental Safety **33**: 154-156.
- Trisyono, A., Puttler, B. and Chippendale, G. M. (2000). "Effect of the ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the lady beetle, *Coleomegilla maculata*." Entomologia Experimentalis et Applicata **94**(1): 103-105.
- Tsang, W. S., Quackenbush, L. S., Chow, B. K., Tiu, S. H., He, J. G. and Chan, S. M. (2003). "Organization of the shrimp vitellogenin gene: evidence of multiple genes and tissue specific expression by the ovary and hepatopancreas." Gene **303**((1-2)): 99-109.
- Tsukimura, B., Bender, J. S. and Linder, C. J. (2000). "Development of an anti-vitellin ELISA for the assessment of reproduction in the ridgeback shrimp, *Sicyonia ingentis*." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **127**(2): 215-224.
- Tsukimura, B. and Kamemoto, F. I. (1991). "In vitro stimulation of oocytes by presumptive mandibular organ secretions in the shrimp, *Penaeus vannamei*." Aquaculture **92**(C): 59-66.
- Tsutsui, N., Kawazoe, I., Ohira, T., Safiah, J., Yang, W. J., Wilder, M. N. and Aida, K. (2000). "Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *penaeus japonicus*." Zoological Science **17**(5): 651-660.
- Tsutsui, N., Kim, Y. K., Jasmani, S., Ohira, T., Wilder, M. N. and Aida, K. (2005). "The dynamics of vitellogenin gene expression differs between intact and eyestalk ablated kuruma prawn *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*." Fisheries Science **71**(2): 249-256.
- Tsutsui, N., Saido-Sakanaka, H., Yang, W. J., Jayasankar, V., Jasmani, S., Okuno, A., Ohira, T., Okumura, T., Aida, K. and Wilder, M. N. (2004). "Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin in the coonstriped shrimp, *Pandalus hypsinotus* and site of vitellogenin mRNA expression." Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology **301**(10): 802-814.
- Tuberty, S. R. and McKenney, C. L. (2005). "Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides." Integrative and Comparative Biology **45**(1): 106-117.
- Tyler, C. R. and Sumpter, J. P. (1996). "Oocyte growth and development in teleosts." Reviews in Fish Biology and Fisheries **6**(3): 287-318.
- Tyler, C. R., Van Der Eerden, B., Jobling, S., Panter, G. and Sumpter, J. P. (1996). "Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish." Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology **166**(7): 418-426.

- Ura, K., Kai, T., Sakata, S., Iguchi, T. and Arizono, K. (2002). "Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*." Journal of Health Science **48**(6): 583-586.
- van den Brandhof, E. J. and Montforts, M. (2010). "Fish embryo toxicity of carbamazepine, diclofenac and metoprolol." Ecotoxicology and Environmental Safety **73**(8): 1862-1866.
- van den Broek, I., Sparidans, R. W., Schellens, J. H. M. and Beijnen, J. H. (2008). "Quantitative bioanalysis of peptides by liquid chromatography coupled to (tandem) mass spectrometry." Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences **872**(1-2): 1-22.
- van den Heuvel-Greve, M., Postma, J., Jol, J., Kooman, H., Dubbeldam, M., Schipper, C. and Kater, B. (2007). "A chronic bioassay with the estuarine amphipod *Corophium volutator*: Test method description and confounding factors." Chemosphere **66**(7): 1301-1309.
- Vandenbergh, G. F., Adriaens, D., Verslycke, T. and Janssen, C. R. (2003). "Effects of 17[alpha]-ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*." Ecotoxicology and Environmental Safety **54**(2): 216-222.
- Ventura, T., Rosen, O. and Sagi, A. (2011). "From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades." General and Comparative Endocrinology **173**(3): 381-388.
- Verslycke, T., Ghekiere, A., Raimondo, S. and Janssen, C. (2007). "Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals." Ecotoxicology **16**(1): 205-219.
- Verslycke, T. A., Fockedey, N., McKenney, C. L., Jr., Roast, S. D., Jones, M. B., Mees, J. and Janssen, C. R. (2004). "Mysid crustaceans as potential test organisms for the evaluation of environmental endocrine disruption: a review." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(5): 1219-1234.
- Vidal, M. L., Bassères, A. and Narbonne, J. F. (2002). "Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller)." Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **132**(1): 93-104.
- Vincent, S. G. P., Keller, R. and Subramoniam, T. (2001). "Development of vitellogenin-ELISA, an in vivo bioassay, and identification of two vitellogenesis-inhibiting hormones of the tiger shrimp *Penaeus monodon*." Marine Biotechnology **3**(6): 561-571.
- Volz, D. C. and Chandler, G. T. (2004). "An enzyme-linked immunosorbent assay for lipovitellin quantification in copepods: A screening tool for endocrine toxicity." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(2): 298-305.
- Volz, D. C., Kawaguchi, T. and Chandler, G. T. (2002). "Purification and characterization of the common yolk protein, vitellin, from the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*." Preparative Biochemistry and Biotechnology **32**(2): 103-116.
- Von Der Ohe, P. C. and Liess, M. (2004). "Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds." Environmental Toxicology and Chemistry **23**(1): 150-156.
- Wallace, R. A., Walker, S. L. and Hauschka, P. V. (1967). "Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high-density lipoprotein from the eggs of decapods." Biochemistry **6**(6): 1582-1590.

- Wang, H. Y., Olmstead, A. W., Li, H. and LeBlanc, G. A. (2005). "The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*." *Aquatic Toxicology* **74**(3): 193-204.
- Watson, R. D. and Spaziani, E. (1985). "Biosynthesis of ecdysteroids from cholesterol by crab Y-organs, and eyestalk suppression of cholesterol uptake and secretory activity, in vitro." *General and Comparative Endocrinology* **59**(1): 140-148.
- Watts, M. M., Pascoe, D. and Carroll, K. (2001). "Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens." *Water Research* **35**(10): 2347-2352.
- Watts, M. M., Pascoe, D. and Carroll, K. (2002). "Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol." *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(2): 445-450.
- Webster, S. G., Keller, R. and Dirksen, H. (2012). "The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction." *General and Comparative Endocrinology* **175**(2): 217-233.
- Weisbrod, C. J., Kunz, P. Y., Zenker, A. K. and Fent, K. (2007). "Effects of the UV filter benzophenone-2 on reproduction in fish." *Toxicology and Applied Pharmacology* **225**(3): 255-266.
- Welton, J. S. (1979). "Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream." *Freshwater Biology* **9**: 263-285.
- Werner, I. (2004). "The influence of salinity on the heat-shock protein response of *Potamocorbula amurensis* (Bivalvia)." *Marine Environmental Research* **58**(2-5): 803-807.
- Westram, A. M., Jokela, J., Baumgartner, C. and Keller, I. (2011). "Spatial Distribution of Cryptic Species Diversity in European Freshwater Amphipods (*Gammarus fossarum*) as Revealed by Pyrosequencing." *PLoS ONE* **6**(8): art. no. e23879.
- Wiklund, A. K. E. and Sundelin, B. (2004). "Biomarker sensitivity to temperature and hypoxia - A seven year field study." *Marine Ecology Progress Series* **274**: 209-214.
- Wilder, M. N., Subramoniam, T. and Aida, K. (2002). "Yolk proteins of Crustacea".
- Willig, A. and Keller, R. (1976). "Biosynthesis of  $\alpha$  and  $\beta$  ecdysone by the crayfish *Orconectes limosus* in vivo and by its Y organs in vitro." *Experientia* **32**(7): 936-937.
- Wollenberger, L. (2005). Toxicity tests with crustaceans for detecting sublethal effects of potential endocrine disrupting chemicals. *Environment & Resources*. Lyngby, Technical University of Denmark.
- Wollenberger, L., Breitholtz, M., Kusk, K. O. and Bengtsson, B. E. (2003). "Inhibition of larval development of the marine copepod *Acartia tonsa* by four synthetic musk substances." *Science of the Total Environment* **305**(1-3): 53-64.
- Wollenberger, L., Dinan, L. and Breitholtz, M. (2005). "Brominated flame retardants: Activities in a crustacean development test and in an ecdysteroid screening assay." *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**(2): 400-407.



- Wu, W. Z., Li, W., Xu, Y. and Wang, J. W. (2001). "Long-term toxic impact of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the reproduction, sexual differentiation, and development of different life stages of *Gobiocypris rarus* and *Daphnia magna*." Ecotoxicology and Environmental Safety **48**(3): 293-300.
- Wunschel, D., Schultz, I., Skillman, A. and Wahl, K. (2005). "Method for detection and quantitation of fathead minnow vitellogenin (Vtg) by liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." Aquatic Toxicology **73**(3): 256-267.
- Wynne, C., Edwards, N. J. and Fenselau, C. (2010). "Phyloproteomic classification of unsequenced organisms by top-down identification of bacterial proteins using capLC-MS/MS on an Orbitrap." Proteomics **10**(20): 3631-3643.
- Xie, S., Sun, L., Liu, F. and Dong, B. (2009). "Molecular characterization and mRNA transcript profile of vitellogenin in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*." Molecular Biology Reports **36**(2): 389-397.
- Xuereb, B. (2009). Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*, Université de Metz: 348p.
- Xuereb, B., Bezin, L., Chaumot, A., Budzinski, H., Augagneur, S., Tutundjian, R., Garric, J. and Geffard, O. (2011). "Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males." Ecotoxicology **20**(6): 1286-1299.
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J. and Geffard, O. (2009a). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys." Aquatic Toxicology **93**(4): 225-233.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J. and Geffard, O. (2009b). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration." Aquatic Toxicology **94**(2): 114-122.
- Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J. and Geffard, O. (2007). "Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos." Toxicology **236**(3): 178-189.
- Yang, F., Xu, H. T., Dai, Z. M. and Yang, W. J. (2005). "Molecular characterization and expression analysis of vitellogenin in the marine crab *Portunus trituberculatus*." Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology **142**(4): 456-464.
- Yang, G., Kille, P. and Ford, A. T. (2008). "Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates?" Aquatic Toxicology **88**(1): 81-87.
- Yano, I. and Hoshino, R. (2006). "Effects of 17  $\beta$ -estradiol on the vitellogenin synthesis and oocyte development in the ovary of kuruma prawn (*Marsupenaeus japonicus*)." Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology **144**(1): 18-23.
- Zapata-Perez, O., Del-Rio, M., Dominguez, J., Chan, R., Ceja, V. and Gold-Bouchot, G. (2005). "Preliminary studies of biochemical changes (ethoxycoumarin O-deethylase activities and vitellogenin induction) in two species of shrimp (*Farfantepenaeus duorarum* and *Litopenaeus setiferus*) from the Gulf of Mexico." Ecotoxicology and Environmental Safety **61**(1): 98-104.

- Zhang, F., Bartels, M. J., Brodeur, J. C. and Woodburn, K. B. (2004). "Quantitative measurement of fathead minnow vitellogenin by liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry using a signature peptide of vitellogenin." Environmental Toxicology And Chemistry **23**(6): 1408-1415.
- Zhang, L., Gible, R. and Baer, K. N. (2003). "The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*." Ecotoxicology and Environmental Safety **55**(3): 330-337.
- Zhang, S., Sun, Y., Pang, Q. and Shi, X. (2005). "Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin." Fish and Shellfish Immunology **19**(1): 93-95.
- Zhang, S., Wang, S., Li, H. and Li, L. (2011). "Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector." International Journal of Biochemistry and Cell Biology **43**(3): 303-305.
- Zmora, N., Trant, J., Chan, S. M. and Chung, J. S. (2007). "Vitellogenin and its messenger RNA during ovarian development in the female blue crab, *Callinectes sapidus*: Gene expression, synthesis, transport, and cleavage." Biology of Reproduction **77**(1): 138-146.
- Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M. and Cajaraville, M. P. (2006). "Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study." Aquatic Toxicology **78**(SUPPL.): S109-S116.
- Zou, E. and Fingerman, M. (1997a). "Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*." Ecotoxicology and Environmental Safety **38**(3): 281-285.
- Zou, E. and Fingerman, M. (1997b). "Synthetic estrogenic agents do not interfere with sex differentiation but do inhibit molting of the cladoceran *Daphnia magna*." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **58**(4): 596-602.
- Zulkosky, A. M., Ferguson, P. L. and McElroy, A. E. (2002). "Effects of sewage-impacted sediment on reproduction in the benthic crustacean *Leptocheirus plumulosus*." Marine Environmental Research **54**(3-5): 615-619.