



THESE

UNIVERSITE DE METZ

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Présentée par Benoît XUEREB

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR

Spécialité : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*

Soutenue le 19 octobre 2009 devant la commission d'examen suivante :

Directeur de thèse	Paule VASSEUR	Professeur, Université de Metz
Encadrant	Olivier GEFFARD	Chargé de recherche, Cemagref
Rapporteurs	François GAGNE	Directeur de recherche, Environ- nement Canada
	Patrick FLAMMARION	Directeur scientifique, ONEMA
Examinateurs	Claude AMIARD-TRIQUET	Directrice de recherche, Université de Nantes
	François LEBOULENGER	Professeur, Université du Havre

A mon épouse Sabrina.

A mes parents et mes sœurs.

A Mister Gf.

A ma famille et mes proches.

A tous ceux qui m'ont soutenu durant mes années de thèse.

Un voyage de mille lieues commence toujours par un premier pas. LAO TSE

REMERCIEMENTS

Je souhaiterais tout d'abord remercier Paule VASSEUR, professeur à l'université de Metz, pour avoir accepté la direction de cette thèse. Merci pour les soutiens et les conseils que vous m'avez prodigués.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes qui ont accepté de constituer ce jury de thèse.

Je suis très honoré que messieurs François GAGNE, chargé de recherche pour Environnement Canada et Patrick FLAMMARION, directeur de recherche à l'ONEMA, aient accepté la charge de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je suis également très reconnaissant envers madame Claude AMIARD-TRIQUET, directrice de recherche CNRS à l'Université de Nantes, et monsieur François LEBOULENGER, professeur à l'Université du Havre, de m'avoir accordé un peu de leur temps pour participer à ce jury en tant qu'examinateurs.

J'exprime toute ma gratitude à Jeanne GARRIC, directrice du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref et co-encadrante scientifique de cette thèse, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche. Ces années passées dans votre laboratoire ont été très bénéfiques à mon épanouissement en tant que jeune chercheur.

Je ne serais ô combien remercier mon encadrant scientifique, Olivier GEFFARD, chargé de recherche au laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref, à l'origine de ce projet, de m'avoir offert l'oportunité de réaliser cette thèse. Tu as été très présent, tout au long de ces années, tout en me permettant d'acquérir de l'autonomie. Ton encadrement m'a énormément apporté, tant sur le plan scientifique et professionnel que sur le plan humain. Je te remercie pour ton écoute et les nombreux conseils que tu m'as apportés et qui m'ont permis de me donner la confiance nécéssaire pour les présentations orales. Je te suis également reconnaissant pour ton aide durant la rédaction des publications présentes dans ce travail. Au cours de toutes nos discutions scientifiques et autres, nous avons toujours été très honnêtes et je pense que c'est l'une des raisons pour laquelle nous nous sommes toujours si bien entendus.

Je souhaiterais également remercier les personnes qui ont participé aux comités de pilotage de cette thèse :

- Tout d'abord, un grand merci à madame CHARMENTIER-DAURES, maître de conférences à l'Université Montpellier II, pour m'avoir fait bénéficier de ces connaissances sur la physiologie des crustacés.

- Merci à Joëlle FORGET-LERAY, professeur à l'Université du Havre, pour ces conseils concernant les dosages de l'acétylcholinestérase chez les crustacés. Merci, également pour m'avoir offert l'opportunité d'occuper un post d'ATER qui me permette de poursuivre la rédaction de ma thèse. - Merci à Laurent BEZIN, chargé de recherche CNRS à l'université Lyon I, pour m'avoir fait bénéficier de son expertise sur les techniques de biologie moléculaire, ainsi que pour m'avoir accueilli et laisser libre accès au matériel du LPICM.

J'adresse toute ma sympatie aux membres du laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref :

- Merci à Arnaud CHAUMOT pour ces nombreux conseils en statistique.

- Merci à Raphël MONS pour m'avoir toujours accompagné durant mes prélèvements sur le terrain et avoir participé à la mise en place des expérimentations de laboratoire. Plus sérieusement, nos nombreux échanges m'ont permis de mieux cerner la gente féminine. Passe le bonjour à papa !

- Merci à Renaud TUTUNDJIAN (dit Torros) pour les coups de mains apportés durant les maniplulations de biologie moléculaire.Grâce à toi, la géopolitique du football et ACDC n'ont plus aucun secret pour moi.

- Merci à Hervé QUEAU pour s'être occupé des élevages de gammares à plusieurs reprises ainsi que pour son soutien technique.

- Merci à Khedidja ABBACI pour le temps passé à réaliser les coupes histologiques.

- Merci à Patrice NOURY pour m'avoir initié au dosage de l'acétylcholinestérase.

- Merci à tous les autres membres qui n'ont pas été cité ici, pour la gentillesse et la bonne humeur dont ils ont fait preuve durant toutes ces années.

Une petite mention spéciale pour Vincent FELTEN, "Warick ", qui fut mon initiateur à la manipulation du gammare, mais également un excellent ami au cours des années qu'il a passé à Lyon, et encore aujourd'hui.

J'en profite pour remecier Colette, Béatrice, Rafate, Maximus, Fabrice et Aurélien qui ont aigaillé mes séjours au LPICM. Salutations, également, à Céline dit « Neunoeil », Perrine, Marie, Julie, Amed et Toby ainsi que toutes les personnes du LEMA qui m'ont apporté leurs conseils et leur sympathie durant mon séjour au Havre.

Un grand merci aux enseignants et encadrants qui, au cours de mon cursus universitaire, m'ont vraiment donné l'envie de faire de la recherche. Je pense en particulier aux professeurs Charles François BOUDOURESQUE et Guy CHARMENTIER, ainsi qu'aux docteurs Céline SPANINGS-PIERROT et Stamatis VARSAMOS.

Mes derniers remerciements et non les moindres vont à mes proches. Merci à vous Papa, Maman, Méla, malgré les kilomètres nous séparant vous m'avez toujours énormément soutenu. Merci à toi, Sabrina, sans ton soutien, ta confiance et ton amour, ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCT	^T ION
CHAPITRE I	: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE9
1. Indie	cateurs de stress neurotoxique dans le milieu11
1.1. Cla	assification et fonction des cholinestérases12
1.2. Pri	ncipaux inhibiteurs de cholinestérase d'origine anthropique15
1.2.1.	Inhibiteurs spécifiques15
1.2.2.	Molécules pouvant moduler l'activité ChE17
1.3. App	plications des cholinestérases en tant que biomarqueurs dans le milieu naturel
1.3.1.	Les organismes utilisés en milieu aquatique
1.3.2.	Les artéfacts d'interprétation de la mesure des cholinestérases
1.3.3.	Méthode d'utilisation des cholinestérases comme biomarqueur dans le
	milieu
1.4. Inte	erprétation des variations de l'activité des cholinestérases en terme d'effets . 29
1.4.1.	Relation entre inhibition des cholinestérases et mortalité
1.4.2.	Relation entre inhibition des cholinestérases et effets sub-létaux
2. Pert	urbations endocriniennes chez les invertébrés
2.1. Ph	vlogénie et endocrinologie comparée des invertébrés
2.2. En	docrinologie des crustacés
2.2.1.	Fonctionnement et anatomie du système endocrinien
2.2.2.	<i>Régulation hormonale de la mue</i>
2.2.3.	Régulation hormonale de la différenciation sexuelle et la gamétogénèse 42
2.2.4.	Autres molécules suceptibles d'être impliquées dans la régulation
	endocrinienne des crustacés
2.3. Per	rturbations du système hormonal chez les crustacés
2.3.1.	Observations en milieu naturel

2.3.2.	Approche expérimentale	50
2.3.3.	Manque d'outils spécifiques d'une perturbation endocrinienne	53
2.4. Bion	narqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne : le dosage de	la
vitel	logénine	54
2.4.1.	Méthodes de dosages	55
2.4.2.	Application de la mesure de la Vtg en tant que biomarqueur chez l	es
	crustacés	57

3.	0	rganisme sentinelle : <i>Gammarus Fossarum</i>	60
3.1.		Systématique	60
3.2.	Ì	Répartition géographique et écologie	60
3.3.	Ì	Morphologie et clefs de détermination	62
3.4.	Ì	Reproduction des gammares	64
3.	4.1	1. Anatomie de l'appareil reproducteur	64
3.	4.2	2. Cycle de reproduction et cycle d'inter-mue	66
3.	4.3	3. L'accouplement	66
3.5.	Ì	Utilisation des gammares en écotoxicologie	58

4. But des travaux.....70

1.	Matériel biologique	75
1.1.	Prélèvement	75
1.2.	Maintien en laboratoire	76

2.	Expérimentations	77
2.1.	Expérimentations sous conditions contrôlées, en laboratoire	77
2.2.	Bioessais in situ	82

3.	Marq	ueurs biologiques	83
3.1.	La n	nesure de l'activité des cholinestérases	83
3.	1.1.	Conditionnement des échantillons	83

3.1.2	Obtention des extraits enzymatiques	34
3.1.3	Dosage enzymatique	34
3.1.4	Dosages protéiques	86
3.2 . 1	Marqueurs comportementaux	7
3.2.1	. Mesure du taux d'alimentation	7
3.2.2	Mesure de l'activité locomotrice	39
3.3 . 1	Marqueurs de perturbation de la reproduction chez la femelle9	1
3.3.1	. Détermination des stades d'inter-mue	1
3.3.2	Marqueurs de perturbation de la reproduction	2
<i>3.4. 1</i>	La mesure de l'expression du gène de la vitellogénine (Vtg) par RT calibrée	_
1	PCR en temps réel)4
3.4.1	. Conditionnement des échantillons9)4
3.4.2	Extraction des ARN totaux)5
3.4.3	. Transcription inverse (i.e. reverse transcription ou RT) calibrée)6
3.4.4	. Amplification quantitative des ADNc de la Vtg par réaction d	le
	polymérisation en chaîne quantifiée en temps réel (PCR temps réel)9)8

CHAPITRE III : SYNTHÈSE DES TRAVAUX...... 103

1.	Mesure et interprétation de l'activité des cholinestérases	105
1.1.	Caractérisation et sensibilité des activités cholinestérasiques	105
1.2.	Impact de facteurs confondants	106
1.3.	Interprétation de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase en te	rme
	d'effet au niveau de l'individu	113
1.4.	Application in situ	116

2.	Developpement de marqueurs de perturbation endocrinienne en lien avec la
	reproduction117
2.1.	Caractérisation du cycle de reproduction chez la femelle 117
2.2.	Développement et application de la mesure d'expression du gène de la
	vitellogénine

CHAPI CHOL	TRE IV: MESURE ET INTERPRÉTATION DE L'ACTIVITÉ DES INESTERASES
1.	Caractérisation des activités cholinestérases133
2.	Impact de facteurs confondants157
3.	Interprétation de l'inhibition de l'activité acétyl-cholinestérase en terme d'effets au niveau individuel175
4.	Application <i>in situ</i>
CHAPI ENDO 1.	TRE V : DÉVELOPPEMENT DE MARQUEURS DE PERTURBATIONS CRINIENNES EN LIEN AVEC LA REPRODUCTION
2.	Développement et application de la mesure d'expression du gène codant pour la vitellogénine
CONC	LUSIONS ET PERSPECTIVES261
RÉFÉF	RENCES BIBLIOGRAPHIQUES
BIBLI	OGRAPHIE PERSONNELLE
ANNEX	XES

LISTE DES ABREVIATIONS

ACh : acétylcholine
ATCh : acétylthiocholine
AChE : acétylcholinestérase
ADN : acide(s) déoxyribo-nucléique(s)
ADNc : acide(s) déoxyribo-nucléique(s) complémentair(s)
AGH : androgénique glande hormone
ARN : acide(s) ribo-nucléique(s)
ARNm : acide(s) ribo-nucléique(s) messager(s)
BSA : albumine de sérum bovin
BCh : butyrylcholine
BTCh : butyrylthiocholine
BChE : butyrylcholinestérase
$BW284c51:1,5\mbox{-bis} (4\mbox{-allyldimethylammoniumphenyl})\mbox{-pentan-3-one dibromide}$
Cb : carbamate
Cd : cadmium
ChE : cholinestérase
CI_{50} : concentration à laquelle 50 % de l'activité enzymatique est inhibée
CL ₅₀ : concentration létale pour 50 % des individus
CP : cyprotérone acétate
CPE : chlorpyrifos
DO : densité optique
DTNB : acide dithio-bis-nitrobenzoïque
EcR : ecdysteroid receptor
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
ER : estrogen receptor
FR : feeding rate
GA : glande androgène
GABA : γ-aminobutyric acid
GIH : gonado-inhibiting hormone
GSH : gonado-stimulating hormone
HPLC : high performance liquid chromatography
HST: hotstart taq polymerase

- iso-OMPA : tetra-(monoisopropyl)pyrophosphor-tetra-mide
- Km : constante de Michaelis-Menten
- Ki : coefficient d'inhibition
- LA : locomotor activity
- LC-MS-MS : liquid chromatography-tandem mass spectrometry
- LOEC : low observed effect concentration
- MF : méthyle farnésoate
- MIH : hormone inhibitrice de la mue
- MOIH : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire
- MT : méthomyl
- NOEC : no observed effect concentration
- NP : nonylphénol
- OCDE : organisation for economic co-opération and development
- OP : organophosphoré
- OH : hormone ovarienne
- OM : organe mandibulaire
- OX/GS : complexe organe-X / glande du sinus
- OY : organe-Y
- PAL : phosphates alkali-labiles
- PCB : polychlorobiphényles
- PCR : réaction de polymérisation en chaine
- PCh : propionylcholine
- PTCh : propionylthiocholine
- PE : perturbateur(s) endocrinien(s)
- PS : point(s) de sortie
- Q.L. : quantification limit
- RT : rétro-transcrition
- VIH : vitellogenesis-inhibiting hormone
- VSOH : vitellogenin-stimulating ovariane hormone
- Vtg : vitellogènine
- YSH : Y-organe stimulating hormone
- 2-PAM : 2-aldoxime méthiodide
- 20HE : 20-hydroecdysone

LISTE DES FIGURES

Chapitre I

Figure I-1 : Transmission de l'influx nerveux au niveau d'une synapse cholinergique. (p.14) ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase.

- Figure I-2 : Représentation schématique d'une inhibition de l'AChE par des insecticides organophosphorés ou carbamates. (p.16)
- Figure I-3 : Représentation simplifiée du dernier modèle de l'arbre phylogénétique des métazoaires (d'après Markov *et al., 2008*). (p.34)
- 1R, 2R et 3R indique les évènements de duplication du génome survenus au cours de l'évolution des vertébrés.
- Figure I-4 : Représentation simplifiée de la phylogénie et des principaux morphotypes des crustacés contemporains (adapté d'après LeBlanc, 2007). (p.35)
- Figure I-5 : Schéma d'une vue latérale d'amphipode indiquant la position approximative des principaux centres de la régulation endocrinienne. (p. 37)
- c. : cérébron ; c.d. : canal déférent ; md. : mandibule ; om. : ommatidies ; ts : testicule ; v.s. : vésicule séminale.
- Figure I-6 : Structure chimique de la 20-hydroecdysone. (p.38)
- Figure I-7 : Structure chimique du méthyle farnésoate. (p.38)
- Figure I-8 : Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule les processus de la mue chez les crustacés malacostracés. (p.40)

(+) indique un contrôle positif, (-) un contrôle négatif et (?) une action non déterminée. MIH : hormone inhibitrice de la mue ; MOIH : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire ; MF : méthyle farnésoate ; SNC : système nerveux central ; 20HE : 20-hydroxyecdysone.

Figure I-9 : Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule la différenciation et la gamétogénèse chez les crustacés malacostracés. (p.42)

(+) indique un contrôle positif, (-) un contrôle négatif et (?) une action non déterminée. AGH : hormone androgène ; GIH : hormone gonado-inhibitrice ; GSH : hormone gonado-stimulatrice ; MF : méthyle farnésoate ; MIH : hormone inhibitrice de la mue ; MOIH : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire ; OH : hormone ovarienne ; SNC : système nerveux central ; VSOH : hormone ovarienne stimulatrice de la vitellogénèse ; 20HE : 20-hydroxyecdysone.

- Figure I-10 : Structure chimique de l'hormone juvénile des insectes, du méthyle farnésoate et de 3 exemples d'insecticides juvénoïdes : le méthoprène, le fénoxicarbe et le pyriproxifène (McKenney, 2005). (p.51)
- Figure I-11 : Représentation de *Gammarus fossarum* (selon Goedmarkers, 1972, vu dans Eggers et Martens). (p.60)

Figure I-12 : Répartition de Gammarus fossarum (selon Barnard et Barnard, 1983). (p.61)

Figure I-13 : Vue latérale d'un Gammaridae (adaptée d'après Chevreux et Fage, 1970; Roux, 1970). (p.62)

pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uropomères 1-3.

Figure I-14 : Schéma d'une coupe transversale au niveau du mésosoma d'une femelle de Gammaridae (adapté d'après Chevreux et Fage, 1970). (p.63)

ba : basipodite ; br : branchie ; c : cœur ; ca : carpopodite ; ci : chambre incubatrice ; cn : chaine nerveuse ; co : coxopodite ; d : dactylopodite ; h : caecum hépathique ; i : ischiopodite ; m : méropodite ; oe : œufs ; oo : oostégite ; pr : propodite ; P : péréiopode ; td : tube digestif.

Figure I-15 : Détail de l'uropode (a) et de l'antenne (b) de *Gammarus fossarum*. **(p.64)** art.4 : article 4 ; art. 5 : article 5.

Figure I-16 : Appareil génital des amphipodes (adapté d'après Charniaux-Cotton, 1965). (p.65)

 \circ : jeune mâle (la vésicule séminale n'est pas encore différenciée) ; \circ : femelle en vitellogénèse ; c mu : cellules à mucus ; GA : glande androgène ; gp : papille génitale ; mt : tissu mésenchimatique indifférencié ; oc I : ovocyte en vitellogénèse primaire ; oc II : ovocyte en vitellogénèse secondaire ; og : ovogonie ; ovd : oviducte ; ovd vst : oviducte vestigial ; spc : spermatocyte ; spg : spermatogonie ; spz : spermatozoïde ; vd : vas déférent ; vts vd : vestige du vas déférent.

Figure I-17 : Relation entre le cycle d'inter-mue, le cycle de reproduction (*i.e.* maturation des gonades, accouplement et développement embryonnaire) chez les amphipodes (adapté d'après Blanchet-Tournier, 1980). (p.67)

A, B, C, D : différents stades de mue ; E. : exuviation ; Vit. I^{aire} : vitellogénèse primaire ; Vit. II^{aire} : vitellogénèse secondaire.

Figure I-18 : Mâle et femelle Gammarus fossarum en précopulat (source personnelle). (p.67)

Chapitre II

Figure II-1 : Localisation du site de prélèvement de la Tour du Pin, sur le bassin versant de la Bourbre. (p.75)

Figure II-2 : Prélèvement des gammares (A) et séparation des différentes classes de taille par tamisage (B). (p.76)

f. : filet ; c.t. : colonne de tamis.

Figure II-3 : Dispositif de stabulation des gammares en laboratoire. A : vue générale. B : aquarium de stabulation. (p.77)

a.a. : alimentation d'air ; a.e. : alimentation d'eau ; a.s. : aquarium de stabulation ; b.m. : bain-marie thermorégulé ; b.t. : billes thermo-isolantes ; i.p. : identification des prélèvement ; n. : néon ; s. : surverse.

Figure II-4 : Photo d'un dispositif expérimental ; exemple d'un test d'exposition en semistatique de 21 j. au méthomyl. (p.78)

b. : Bécher d'exposition ; b.m. : bain-marie thermorégulé ; cr. : cryostat ; f.a. : feuille d'aulne ; id. : identifiant de l'expérimentation ; plan expérimental ; t.b. : toile à bulter ; th. : thermostat.

Figure II-5 : Représentation schématique du dispositif expérimental d'exposition en continu. (p.81)

b. : bulleur ; f.d. : facteur de dilution ; rb. robinet ; s.m. : solution mère ; t. : tuyau.

Figure II-6 : Dispositif expérimental d'exposition *in situ*. (p.82)

b.r : block rocheux ; c.e. : chambre d'exposition ; c.p. : cagette de protection ; c.s. : collier de serrage ; m. PVC : manchon en PVC ; t.b. : toile à bluter.

- Figure II-7 : Principe de la méthode colorimétrique d'Ellman *et al.* (1961). (A) Réaction 1 : Exemple de l'hydrolyse de l'acéthylthiocholine par l'acétylcholinestérase et formation de la thiocholine. (B) Réaction 2 : Réaction de thiocholine avec le DTNB et formation du TNB absorbant à 405 nm. (p.85)
- **Figure II-8** : Représentation simplifiée de la procédure utilisée pour évaluer le taux d'alimentation via la mesure de surface de feuille consommée, dans une unité expérimentale (*i.e.* réplicat). (**p.88**)
- Figure II-9 : Représentation schématisée du montage expérimentale utilisé pour réaliser les vidéos de locomotions. (p.90)

b.p. : boite de Pétri ; c.n. : caméra numérique ; s.b.-m. : support de couleur blanc-mâte ; o. : ordinateur

Figure II-10 : Schéma du déplacement d'un gammare sur un plan bidimentionnel. (p.90)

Figure II-11 : Représentation schématique de la procédure utilisée pour déterminer le stade d'inter-mue des organismes. (p.92)

c.w.: ciseaux de Wecker; d.: dactilopodite; L.: lame; l.: lamelle; m.: microscope; m.s.: milieu de stabulation; p.: protopodite; s.: soie.

Figure II-12 : Représentation schématisée de la démarche utilisée pour mesurer les "marqueurs macroscopiques". (p.93)

b. : loupe binoculaire ; e. : embryons contenus dans la poche incubatrice ; L. : lame ; m. : microscope ; o. : ovocytes secondaires visibles au travers de la cuticule.

Figure II-13 : Comparaison des quantités d'ARN totaux extraits en fonction du nombre d'organismes, mâles ou femelles, broyés par échantillon. (p.96)
Les valeurs cont exprimées comme une mayonne + coerture (n = 2)

Les valeurs sont exprimées comme une moyenne \pm ecartype (n = 3).

- Figure II-14 : Principe de l'utilisation du SYBR Green en PCR quantitative : (A) le mélange réactionnel initial contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le SYBR Green non-lié ; (B) après hybridation des amorces, le SYBR Green se lie au double brin d'ADN et émet un signal fluorescent ; (C) pendant l'élongation, le nombre de molécules de SYBR Green liées augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. (P.98)
- Figure II-15 : (A) PCR quantitative réalisée sur une série de dilutions d'un standard pur. (B) Relation correspondante entre les points de sortie (PS) et les log₁₀ des concentrations en ADNc (en nombre de copies) présentes dans chaque point de la gamme. (p.99)
- Figure II-16 : Droite d'étalonnage de la quantification des ADNc de la Vtg par PCR temps réel au moyen du couple d'amorces VtgGf, dans les conditions d'amplification décrites précédemment. (p.101)

Chapitre III

Figure III-1 : Relations entre la concentration en protéine (g.l⁻¹) et l'activité AChE nonnormalisée (nmol.min⁻¹) ou l'activité AChE normalisée (nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) mesurées dans des extraits de femelle à différents stades de la reproduction (A et B) et de mâles analysés dans les cadre d'une étude de terrain (C et D). (p.108)

 (\bullet) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées et des œufs fraichement pondus dans le marsupium; (\circ) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées chez lesquelles les œufs ont été manuellement retirés du marsupium; (\blacktriangle) : femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades et des juvéniles fraichement éclos dans le marsupium; (Δ) : femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades chez lesquelles les juvéniles ont été manuellement retirés du marsupium; (\bigstar) : mâles.

Figure III-2 : Activité AChE (nmol.min⁻¹) mesurée sur des pools de *Gammarus fossarum* mâles et femelles (4 stades de reproduction différents). (p.109)

Les données sont rapportées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). L'absence de différence significative est indiquée par une lettre identique (p > 0.05). (\eth) : mâles; (\bigcirc 1) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées et des œufs fraichement pondus dans le marsupium; (\bigcirc 2) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées chez lesquelles les œufs ont été manuellement retirés du marsupium; (\bigcirc 3): femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades et des juvéniles fraichement éclos dans le marsupium; (\bigcirc 4): femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades chez lesquelles les juvéniles ont été manuellement retirés du marsupium

Figure III-3 : Relation entre l'activité AChE (nmol.min⁻¹) et le poids individuel moyen (mg) obtenu pour six classes de taille différentes. (p.110)

Les données sont reportées comme des valeurs individuelles. (\blacklozenge): classe 1; (\diamondsuit): classe 2; (\blacktriangle): classe 3; (\vartriangle): classe 4; (\Box): class 5; (\blacksquare): class 6

Figure III-4 : Variations annuelles de l'activité AChE (nmol.min⁻¹) mesurée chez des Gammarus fossarum collectés de Janvier 2007 à Janvier 2008 en amont de la Morcille (A), de l'Ardière (B), de la Bourbre (C) et de l'Agny (D). (p.112)

Les données sont reportées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). La ligne continue représente la moyenne annuelle ($8.4 \pm 0.5 \text{ nmol.min}^{-1}$), et les lignes en pointillés l'intervale de confiance à 95% (7.4–9.5 nmol.min⁻¹), des valeurs d'activité AChE obtenues pour la Morcille.

Figure III-5 : Relation entre l'activité AChE (% du control) et le taux d'alimentation (% of control ; A) ou la locomotion (% of control ; B) chez *G. fossarum* après 96 h d'exposition à cinq concentrations de chlorpyrifos (◆ CPE) et six concentrations de méthomyle (△ MT) témoins inclus. (p.114)

Les données sont reportées comme des moyennes \pm écart type (n = 5 pour l'activité AChE et le taux d'alimentation, et n = 18 pour la locomotion). La courbe en rouge (\blacklozenge ; indiquée par des flèches sur le graphe A) correspond à la relation obtenue entre le taux d'alimentation et l'activité AChE mesurée durant les 48 dernières heures d'exposition au chlorpyrifos (voir les résultats et la discussion de la publication n°4).

Figure III-6 : Activité AChE (moyennes ± ecart type, n = 5) mesurée chez Gammarus fossarum exposé sur les différentes stations étudiées et situées en amont et aval de stations d'épuration (*i.e.* Saône, Ardière, et Bourbre) ou de rejet minier (*i.e.* Amous). (p.117)

A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. Ligne bleu : valeur de référence et lignes en pointillés rouges : limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité AChE est significativement différente de son niveau de base naturel (Publication 3). Les points rouges représentent les stations définies *a priori* comme référence (Amont des rejets).

Figure III-7 : Changement tégumentaire du dactylopodite et du protopodite de la 3^{ème} et 4^{ème} paires de périopodes au cours du cycle de mue de *G. fossarum.* (p.119)

Stade A : cuticule du dactylopodite fine et molle; Stade B : épaississement de la cuticule du dactylopodite ; C1 : rétractation de l'épiderme du dactylopodite ; C2 : formation de fentes circulaires sur l'épiderme du dactylopodite causée par son invagination ; D1 : formation d'une cuticule sur le dactylopodite néoformé ; D2 : formation d'une cuticule sur les soies néoformées du protopodite.

Figure III-8 : Répartition des différents stades de développement embryonnaire observés dans les marsupium des femelles *G. fossarum* en fonction des stades de mue (n = 20 femelles par stade de mue). (p.119)

Du fait, de la courte durée du stade A, les stades de post-mue (*i.e.* AB) ont été regroupés en stade AB. Stade 1 : Embryon nouvellement fertilisé, ovale et indifférencié ; Stade 2 : Apparition de la ventroflexion ; Stade 3 : Apparition du céphalothorax et segmentation des appendices ; Stade 4 : Les yeux sont clairement visibles, et les appendices sont complètement développés ; Stade 5 : Juvénile nouvellement éclos.

Figure III-9 : Evolution de la structure histologique de l'ovaire au cours du cycle d'intermue des femelles chez *Gammarus fossarum*. (p.120)

Du fait, de la courte durée du stade A, les stades de postmue (*i.e.* AB) ont été regroupés en stade AB. cdf, cordon folliculaire ; cf, cellule folliculaire ; gl, gouttelette lipidique ; gv, globule vitellin ; O, oviducte ; odvs, ovocyte en début de vitellogénèse secondaire ; ofvp, ovocyte en fin de vitellogénèse primaire ; ovp, ovocyte en vitellogénèse primaire ; vg, vésicule germinative ; zg, zone germinative. Les barres d'échelle représentent 100 µm.

Figure III-10 : Surface ovocytaire (μm^2) , moyenne \pm écart type, n = 10) mesurée chez des femelles *Gammarus fossarum* en stade de mue C2 après 21 jours d'exposition au cadmium (Cd; 0.3, 1 et 3 $\mu g.1^{-1}$), méthomyle (MT; 5, 20 et 80 $\mu g.1^{-1}$) ou nonylphenol (NP; 0.05 et 5 $\mu g.1^{-1}$), ou de privation alimentaire (St; les organismes ont été mis en présence de nourriture durant 50 et 25 % du temps d'exposition). **(p.122)**

Cw: Contrôle sans-solvant, Cs: Contrôle solvant. *: différences significatives (p < 0.05) par rapport au contrôle; n.a. : non valable.

Figure III-11 : Nombre d'embryons normaux (%, moyenne ± écart type, n = 10) mesuré chez des femelles *Gammarus fossarum* en stade de C2 après 21 jours d'exposition au cadmium (Cd; 0.3, 1 et 3 μg.l⁻¹), méthomyle (MT; 5, 20 et 80 μg.l⁻¹) ou nonylphénol (NP; 0.05 et 5 μg.l⁻¹), ou de privation alimentaire (St; les organismes ont été mis en présence de nourriture durant 50 et 25 % du temps d'exposition). (p.122)

Cw: Contrôle sans-solvant, Cs: Contrôle solvant. *: différences significatives (p < 0.05) par rapport au contrôle; n.a.: non valable.

Figure III- 12 : Niveaux d'expression du gène Vtg chez des G. fossarum mâles (♂) et G. fossarum femelles au cours de leur cycle de reproduction (♀A-D2). (p.124)

A-D2 correspondent aux 6 stades de mue précédemment définis chez *G. fossarum* (Publication n°5). Les données sont reportées comme des moyennes \pm SEM du nombre d'ADNc quantifié par PCR en temps réel suite à la rétro-transcription des ARNm contenus dans 1 µg d'ARN totaux (n = 20 pour les mâles et 10 pour chacun des différents groupes de femelles). L'absence de différence significative est indiquée par une lettre identique (p > 0.05).

- Figure III- 13 : Description du cycle de reproduction chez la femelle *G. fossarum* sur la base des différents paramètres physiologiques étudiés au cours de nos travaux. (p.125)
- Figure III-14 : Niveaux d'expression du gène Vtg dans des pools d'ARN totaux de *G. fossarum* mâles exposés à différentes concentrations de nonylphénol (A) et de cyprotérone acétate (B) durant 2, 4, 8 et 16 jours. (p.126)

Les données sont reportées comme une seule valeur du nombre de copies d'ADNc quantifiées par PCR en temps réel suite à la rétro-transcription des ARNm contenus dans 1 µg d'ARN totaux poolés à partir de 5 extraits différents. C: contrôle sans solvant; CS: contrôle solvant.

Figure III-15 : Expression du gène Vtg des mâles *G. fossarum* maintenus dans des conditions contrôles avec et sans solvant (CS et C, respectivement) durant 2, 4, et 16 jours. (p.127)

Les données sont reportées comme des moyennes \pm SEM du nombre de copies d'ADNc quantifiées après rétrotranscription des ARNm contenues dans 1 µg d'ARN totaux (n = 5). * Indique une différence significative (p < 0.05). n.d. : non défini. Les niveaux d'expression des mâles maintenus 4 jours dans des conditions contrôles n'ont pas été mesurés.

Figure III-16 : Expression du gène Vtg chez des mâles G. fossarum transplantés durant 21 jours sur différents stations proches de la station dépuration de Bourgoin-Jallieu en Juin 2007 (A), et Fontaine-sur-Saône en Novembre 2007(B). (p128)

Les données sont reportées comme des moyennes \pm SEM du nombre de copies d'ADNc quantifiés après rétrotranscription des ARNm contenus dans 1 µg d'ARN totaux (n = 5 et n = 10 pour le graph A et B, respectivement). Les stations B1, B2 et S1 sont considérées comme référence car situées en amont des rejets des stations d'épuration.

Chapitre IV

Publication n°1

Figure 1: Substrate affinity of G. pulex ChEs evaluated at increasing concentrations of acetylthiocholine (ATCh: ●), propionylthiocholine (PTCh: □) and butyrylthiocholine (BTCh: ▲). (p138)

Data are reported as the mean \pm standard deviation of 3 independent experimentations.

Figure 2: Percent inhibition of G. pulex ChE activity by eserine. Inhibitor effects were tested on acetylthiocholine (ATCh: ●), propionylthiocholine (PTCh: □) and butyrylthiocholine (BTCh: ▲) hydrolysis. (p.138)

Data are reported as the mean \pm standard deviation of 3 independent experimentations. * = dose at which eserine induce significant effect (p < 0.05).

Figure 3: Percent inhibition of G. pulex ChE activity by BW284c51 (A) and iso-OMPA (B). Inhibitor effects were tested on acetylthiocholine (ATCh: ●), propionylthiocholine (PTCh: □) and butyrylthiocholine (BTCh: ▲) hydrolysis. (p.139)

Data are reported as the mean \pm standard deviation of 3 independent experimentations. * = dose at which BW284c51 induce significant effect on ATCh and PTCh hydrolysis (p < 0.05).

Figure 4: Effect of chlorpyrifos on G. pulex. (A) Percent inhibition of ChE activity during in vitro experiment; (B) Percent inhibition of ChE activity and survival during in vivo experiment. (p.140)

Inhibitor effects were tested on acetylthiocholine (ATCh) hydrolysis. Data are reported as the mean \pm standard deviation. * = dose at which chlopyrifos induce significant effect on ATCh hydrolysis and survival rate (p < 0.05).

Publication n°2

Figure 1: Substrate affinity of *P. antipodarum* (A) and *V. piscinalis* (B) ChEs measured at increasing concentrations of ASCh, PSCh and BSCh. (p.152)

Values are means of three replicates. Standard error is presented. a, b, and c represent significant differences between substrates at p < 0.05 (a > b > c).

Figure 2: Effects of eserine (A and B), iso-OMPA (C and D) and BW284c51 (E and F) on ChE activity in *P. antipodarum* (A, C and E) and *V. piscinalis* (B, D and F). (p.153) Values are means of three replicates. Standard error is presented. *: p < 0.05; ***: p < 0.001.</p>

Figure 3: ChE activities (percentage of control) for *P. antipodarum* (A) and *V. piscinalis* (B) during in vivo contamination with chlorpyrifos. (p.153)

Values are means of five replicates. Standard error is presented. ***: p < 0.001.

Note n°1

Figure 1 : Activités AChE (nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) mesurées sur des échantillons de *G. fossarum* stockés sous formes congelées et lyophilisées, après différentes périodes de conservation. (**p.160**)

Les données sont présentées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). La ligne en pointillés orange représente la valeur moyenne de l'activité AChE corporelle mesurée dans les pools d'organismes frais.

Figure 2 : Relation entre l'activité AChE (nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) et la concentration en protéines totales (g.l⁻¹) mesurée sur des échantillons de *G. fossarum* frais (▲), congelés (●) et lyophilisés (○). (p.161)

Les données sont reportées comme des valeurs individuelles.

Figure 3 : Activités AChE (nmol.min⁻¹) mesurées sur des échantillons de G. fossarum stockés sous forme congelée et lyophilisée, après différentes périodes de conservation. (p.161)

Les données sont présentées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). La ligne en pointillés orange représente la valeur moyenne de l'activité AChE corporelle non-normalisée mesurée dans les pools d'organismes frais.

Publication n°3

Figure 1: Relationships between protein concentration (g.L⁻¹) and no-normalized AChE activity (nmol.min⁻¹) or normalized AChE activity (nmol.min⁻¹.mg P⁻¹) measured in whole-body extract of females with different reproductive statuses (A and B) and males analysed during field survey (C and D). (p.168)

Data are reported as individual values. (•, \bigcirc 1) Females at the beginning of reproductive-moult cycle with few developed gonads and new-laids eggs in marsupium; (\bigcirc , \bigcirc 2) females at the beginning of reproductive-moult cycle with few developed gonads and for which the eggs were manally released from marsupium; (\blacktriangle , \bigcirc 3) females at the end of reproductive-moult cycle with mature oocytes in gonads and freshly hatched juveniles in marsupium; (\triangle , \bigcirc 4) females at the end of reproductive-moult cycle with mature oocytes in gonads and for which the freshly hatched juveniles were manually released to marsupium; (\blacklozenge) males analysed during field survey.

Figure 2: Whole body AChE activity (nmol.min⁻¹) measured in pools of *G. fossarum* males and females (four different reproductive statuses). (p.168)

Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5). Similar letter: no significant difference (p > 0.05). (\Diamond): Males; (\bigcirc 1): females at the beginning of reproductive-moult cycle with few developed gonads and new-laids eggs in marsupium; (\bigcirc 2): females at the beginning of reproductive-moult cycle with few developed gonads and for which the eggs were manually released from marsupium; (\bigcirc 3): females at the end of reproductive-moult cycle with mature occytes in gonads and freshly hatched juveniles in marsupium; (\bigcirc 4): females at the end of reproductive-moult cycle with mature occytes in gonads and for which the freshly hatched juveniles were manually released from marsupium.

Figure 3: Relationships between whole-body AChE activity (nmol.min⁻¹) and mean individual fresh-weight of organism pools (mg) for six size classes of sexually undifferentiated juvenile or adult male *G. fossarum*. (p.169) (\diamond) class 1; (\diamond) class 2; (\blacktriangle) class 5; (\square) class 5; (\square) class 6.

Figure 4: Whole body AChE activity (nmol.min⁻¹) of *G. fossarum* measured after 2 and 15 days of exposure to 6, 12, 18 and 24 °C. (p.169)

Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5).

Figure 5: Annual variations of whole-body AChE activity (nmol.min⁻¹) measured in G. fossarum collected from January 2007 to January 2008 in upstream part of Morcille River (A), Ardière River (B), Bourbre River (C) and Agny River (D). (p.169)

Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5). The continuous-line represents the annual mean of AChE activity values obtained for Morcille River ($8.4 \pm 0.5 \text{ nmol.min}^{-1}$), and dotted line, the 95 % confidence intervals (7.4 - 9.5 nmol.min⁻¹).

Publication n°4

Figure 1: Whole body AChE activity (nmol.min⁻¹) of *Gammarus fossarum* measured after 24, 48 and 96 h of *in vivo* contamination with the organophosphorous chlorpyrifos (A) and carbamate methomyl (B). Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5). (p.181)

* Denotes treatment significantly different from solvent control (A) and water control (B).

Control = water control; *Solvent* = solvent control.

Figure 2: Relationships between *Gammarus fossarum* whole-body AChE activity (% of control) and feeding rate (A; % of control) or locomotion (B; % of control) after 96 h of exposure to five chlorpyrifos concentrations including solvent control (◆ CPE) and six methomyl concentrations including water control (▲ MT). (p.182)

Data are reported as mean \pm standard error to the mean (n = 5 for AChE activity and feeding rate, and n = 18 for locomotion) in % of control value. The red dots (\diamond ; checked by arrow on graph A) represents relationships obtained between feeding rate and AChE activity measured from exposure period from 48 and 96 h (see Section 3 and 4).

Note n°2

Figure 1 : Sites d'études sur lesquels les tests *in situ* ont été mis en place. (**p.191**) A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. ● : stations d'étude ; ▲ : Rejet de station d'épuration.

Figure 2 : Activité AChE (moy ± E.T., n = 5) mesurée chez Gammarus fossarum exposé sur les différentes stations définies a priori comme référence (amont des rejets). (p.195)

A : Amous; Bj : Ardière; S : Saône et B : Bourbre. Ligne bleu : valeur de référence et lignes rouges en pointillés: limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité AChE est significativement différente de son niveau de base (Publication 3).

Figure 3 : Activité AChE (moy ± E.T., n = 5) mesurée chez Gammarus fossarum exposé sur les différentes stations étudiées et situées en amont et aval de stations d'épuration (*i.e.* Saône, Ardière, et Bourbre) ou de rejet minier (*i.e.* Amous). (p.196)

A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. Ligne bleu : valeur de référence et lignes en pointillés rouges : limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité AChE est significativement différente de son niveau de base (Publication 3). Les points rouges représentent les stations définies a priori comme référence (Amont des rejets) et présentées sur la figure 2.

Chapitre V

Publication n°5

- Figure 1: Integumental changes of dactylopodite and protopodite from first and second periopod pairs in *G. fossarum* during its moulting cycle. (p.229)
- **Figure 2:** *Gammarus fossarum*. Embryonic development ; each stage is characterized using criteria defined by McCahon & Pascoe (1988) in *G. pulex*. Cross section of maturing oocyte in relation to moult cycle. Scale bars : 100μm for AB and C1 moulting stages and 200 μm for C2, D1 and D2 moulting stages. (**p.229**)

FC : follicle cells; EVO : early vitellogenic oocyte; LVO : late vitellogenic oocyte; YV : yolk vesicle; LG : lipid globule

Figure 3: Oocyte surface (μ m2, mean \pm S.E., n = 10) in *Gammarus fossarum* females after a 21 days exposure to cadmium (Cd; 0.3, 1 and 3 μ g/L), methomyl (MT; 5, 20 and 80 μ g/L) and nonylphenol (NP; 0.05 and 5 μ g/L) contamination and to starvation diet (st; with food for 50 and 25 % of exposure time). (p.230)

Cw : solvent-free control, Cs: solvent control. * : significantly different (p < 0.05) from the control.

Figure 4: Normalized oocyte number (mean \pm S D) in C2 moult stage *Gammarus fossarum* females after a 21 days exposure to cadmium (Cd; 0, 0.3, 1 and 3 µg/L), methomyl (MT; 0, 5, 20 and 80 µg/L) and nonlyphenol (NP; 0, solvent-0, 0.05 and 5 µg/L); and starvation diet (100, 50 and 25% of total time). (p.230)

 $Cw: solvent\mbox{-free control}, Cs: solvent \mbox{ control}.$

- **Figure 5:** Normal embryo (%; mean \pm S D) in C2 moult stage *Gammarus fossarum* females after a 21 days exposure to cadmium (Cd; 0, 0.3, 1 and 3 µg/L), methomyl (MT; 0, 5, 20 and 80 µg/L) and nonlyphenol (NP; 0, solvent-0, 0.05 and 5 µg/L); and starvation diet (100, 50 and 25% of total time). **(p.231)**
- Cw : solvent-free control, Cs: solvent control. * : significantly different (p < 0.05) from the control.

Publication n°6

- Figure 1: Studied French sites showing a part of Rhône river basin and station B4 (A), that of stations S1 to S3 situated close to Fontaine-sur-Saône WTP (B), and that of stations B1 to B3 situated close to Bourgoin-Jallieu WTP. (●): cities; (●): studied station localizations; (▲): SWTP localization. (p.257)
- Figure 2: Gammarus fossarum Vtg gene expression levels measured in males (♂) and through the reproductive-moult cycle of sexually active females (♀A-D2). A-D2 corresponds to the 6 moult stages characterized in G. fossarum (Geffard et al., in submission). (p.258)

Data are reported as mean \pm SEM number of *c*DNA copies quantified by *real time PCR* following *RT* of *m*RNAs contained in 1 µg of *total*-RNAs (*n* = 20 for males and 10 for the different female groups). Similar letters indicate no significant difference between data bars (*p* > 0.05).

Figure 3: Vtg gene expression screening in pooled total-RNA of male G. fossarum exposed to different concentrations of nonylphenol (A) and cyproterone acetate (B) during 2, 4, 8 and 16 days. Data are reported as single value of cDNA copy number quantified by real time PCR following RT of mRNAs contained in 1 μg of pooled total-RNAs. SCF: solvent free-control; SC: solvent-control. (p.259)

The arrows point the experimental groups for which V_{tg} gene expression was secondarily measured from individually extracted *total*-RNAs: (1) V_{tg} gene expression in organisms of solvent free- and solvent-control groups at different exposure times, (2) comparison of V_{tg} gene expression of solvent-control and treatment with 0.05 µg.L⁻¹ of nonylphenol after a 16 days-exposure period, and (3) comparison of V_{tg} gene expression of solvent-control and treatment with 1 000 µg.L⁻¹ of cyproterone acetate after a 4 days-exposure period.

Figure 4: *Vtg* gene expression in male *G. fossarum* maintained in solvent free control (SCF) and solvent control (SC) conditions during 2, 4, and 16 days. (p.260)

Data are reported as mean \pm SEM of *c*DNA copy numbers quantified by *real time PCR* following *RT* of *m*RNAs contained in 1 µg of *total*-RNAs (*n* = 5). * Indicates significant differences (*p* < 0.05).

Figure 5: Vtg gene expression in male G. fossarum transplanted during 21 days at different stations close to water treatment plant of (A) Bourgoins-Jallieu in June 2007, and (B) Fontaine-sur-Saône in November 2007. (p.260)

Data are reported as mean \pm SEM of *c*DNA copy number quantified by *real time PCR* following *RT* of *m*RNAs contained in 1 µg of *total*-RNAs (*n* = 5 and *n* = 10 for the graph A and B, respectively).

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre I

 Tableau I-1 : Résultats d'études de caractérisation des ChE menées chez différents groupes taxonomiques d'invertébrés aquatiques. (p.13)

AChE' indique que l'isoforme présente toutes les caractéristiques d'une AChE de vertébrés. *Intermédiaire*' indique que l'isoforme présente des propriétés intermédiaires entre AChE et BChE de vertébrés. ACh, PCh et BCh signifient respectivement acétylcholine, propionylcholine et butyrylcholine. Le signe '=' indique des activités équivalentes alors que le signe '>>>' marquent une forte décroissance d'activité. Les signes + et – traduisent respectivement la présence ou l'absence d'inhibition.

* Bocquené *et al.* (1997) ont caractérisé deux AChE chez *C. gigas*, qu'ils ont nommées A (forme soluble) et B (forme transmembranaire).

Tableau I-2 : Constantes d'inhibitions (ki en mm⁻¹.min⁻¹) de ChE chez des espèces de divers phylums, pour différents organophosphorés et carbamates. (**p.18**)

Dans le cas du paraoxon, 'Et' et 'Mt' caractérisent la forme étyhlée ou méthylée du composé.

Tableau I-3 : Exemples d'études mettant en évidence le pouvoir inhibiteur, *in vitro* et *in vivo*,de quelques métaux sur les ChE d'organismes aquatiques. (p.19)

Les concentrations sont données en mg.L⁻¹. Les durées d'exposition *in vivo* sont indiquées entre parenthèses. LOEC = plus petite concentration testée pour laquelle un effet est observé ; NOEC : concentration sans effet

observé ; CI_{50} = concentration à laquelle on a 50 % d'inhibition, mis à part les concentrations pour lesquelles le niveau d'inhibition est indiqué entre parenthèses.

Tableau I-4 : Concentrations de demi-inhibition (CI₅₀; en μg.L⁻¹) in vitro de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques vis à vis de l'AChE de l'anguille électrique (Kang et Fang, 1997) et de l'AChE humaine (Jett et al., 1999). (p.21)

Les valeurs sont exprimées comme des moyennes \pm S.E.M.

- **Tableau I-5** : Relations entre la taille ou l'âge, et l'activité ChE basale chez quelques espèces
de poissons, crustacés et mollusques. (p.25)
- Tableau I-6 : Influence du sexe sur l'activité ChE basale, chez quelques organismes aquatiques. (p.26)
- Tableau I-7: Espèces de crustacés chez lesquelles des techniques de dosage de la vitelline par immuno-essais ont été validées. (p.56)
- Tableau I-8 : Espèces de crustacés chez lesquelles la séquence codante du gène de la vitellogénine a été partiellement ou complètement caratérisée. (p.57)
- **Tableau I-9** : Etudes ayant rapporté des modulations de la synthèse de vitellogénine chez des crustacés suite à une exposition à différents contaminants. (p.59)

Chapitre II

 Tableau II-1 : Enumération des différents tests réalisés en conditions contrôlées avec les conditions expérimentales détaillées. (p.79 - 80)

 $\mathcal{P}\mathbf{D2}$: Femelles en fin de cycle de reproduction : (1) Les embryons issus de la dernière ponte ont éclos et les néonates sortent du masurpium, et (2) les ovocytes secondaires contenus dans les gonades sont matures et prêts à être pondus.

T : Condition témoin ; TS : Condition témoin contenant du solvant en quantité égale à celle utilisée pour le dopage des milieux contaminés (toujours ≤ 0.1 ‰).

CP : cyprotérone acétate ; CPE : chlorpyrifos ; MT : méthomyle ; NP : nonylphénol ; Cd : cadmium.

M.F. : Morceau grossiers de feuille d'aulne ; D.F. disques de feuille d'aulne (n = nombre dans chaque réplicat).

 Tableau II-2 : Représentation des différents substrats testés pour le dosage des activités cholinestérases et leurs métabolites. (p.86)

Chapitre III

Table III-1: Surface ovocytaire (moyenne \pm écart type, n = 15) et nombre d'ovocytes et d'embryons (moyenne \pm écart type, n = 15; normalisée par la taille de la femelle) mesurés au cours des différents stades de mue chez la femelle *G. fossarum*. (p.120)

n.d. : non déterminé, les juvéniles nouvellement éclos n'ont pas été considérés car ils peuvent quitter librement le marsupium.

Tableau III-2 : Valeurs de l'expression du gène de la Vtg mesurée chez des mâles G. fossarum exposés durant 4 jours à 1 000 μg.l⁻¹ à la cyprotérone acétate ou 16 jours à 0.05 μg.l⁻¹ de nonylphénol, en comparaison avec les valeurs mesurées chez leurs témoins (*i.e.* Contrôles avec solvant) respectifs. (p.128)
 Les données sont reportées en nombre de copies d'ADNc quantifiées après rétrotranscription des ARNm contenus dans1 μg d'ARN totaux. CP: cyprotérone acétate; NP: nonylphénol.

Chapitre IV

Publication nº1

 Table 1: Michaelis-Menten constant (Km) of cholinesterase activity of some aquatic invertebrates. (p.141)

Excepted for *C. fulminea*, *D. magna*, *P. vulgaris*, *S. mantis* and *M. brandaris* the *K*m values were calculated using ATCh as substrate.

Table 2: AChE activity levels of some aquatic invertebrates reported in literature. (p.142)

Table 3: Comparaison of IC_{50} and LOEC of specific inhibitor, eserine, for some aquatic invertebrates. (p.143)

Publication n°2

 Table 1: Michaelis–Menten constant (*Km*) and maximum rate of substrate hydrolysis (*Vmax*) of ChEs of *P. antipodarum* and *V. piscinalis*. (p.152)

 Results are expressed as the mean + SE of three replicates

Results are expressed as the mean \pm SE of three replicates.

Publication n°3

Table 1: Values of different physico-chemical water characteristic (temperature, pH and conductivity) measured at each sampling and the monthly flow rate of studied sites (A: the Bourbre River; B: the Agny River; C: the Ardière River; D: the Morcille River). (p.167)

^a These values were produced by the DIREN (DIrections REgionales de l'ENvironement) of the Rhône-Alpes region (<u>http://www.rhone-alpes.ecologie.gouv.fr/</u>).

Publication n°4

Table 1: Physico-chemical characteristics of water (*i.e.* temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen) recorded during the two exposure tests (chlorpyrifos and méthomyle experiments), 10 min and 24 h following the renewal of test solutions. (p.180)

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n = 12).

Table 2: Nominal and measured concentrations of chlorpyrifos (mean ± standard deviation of duplicate) and methomyl in water samples taken during the experiments, following the renewal of tested solutions (*i.e.* initial concentrations) and after 24 hours of contamination (*i.e.* ending concentrations). (p.180)

Quantification limit (Q.L.) = 0.09 et 0.62 nM, for chlorpyrifos and methomyl, respectively.

Table 3: Mean survival rate (%) of *Gammarus fossarum* after 24, 48, 72 and 96 h of exposureto organophosphorous chlorpyrifos and carbamate methomyl. (p.180)

Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5).

* Denotes treatment significantly different from water control.

 Table 4: Feeding rates and locomotor activities (% of solvent control) of *Gammarus fossarum* exposed to organophosphorous chlorpyrifos and carbamate methomyl. (p.181)

Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5 for feeding rate and 18 for locomotor activity).

¹ Denotes chlorpyrifos treatment significantly different from solvent control.

² Denotes methomyl treatment significantly different from water control.

Chapitre V

Publication n°5

Table 1: Test conditions for the sub-lethal reprotoxicity in G. Fossarum. (p.226)

- **Table 2:** Oocyte surface (mean \pm SE, n = 15) and oocyte and embryo number (mean \pm SE, n = 15; normalized by the female size) in *G. fossarum* females, in relation to moulting cycle. n.d.: no determined, newly hatched young was not considered, since they can freely leave the brood-pouch. (**p.227**)
- **Table 3:** Occurrence (%) of different moult (B, C1, C2 and D1, see detail in text) and embryonic stages (1, 2, 3 and 4, see detail in text) in *G. fossarum* exposed to cadmium (Cd; 0, 0.3, 1 and 3 μ g/L), methomyl (MT; 0, 5, 20 and 80 μ g/L) and nonlyphenol (NP; 0, solvent-0, 0.05 and 5 μ g/L); and starvation diet (100, 50 and 25% of total time). n = 15, 12, 14 and 15 for Cd, MT and NP exposure and starvation diet experiment, respectively; n.a. : no available because data have been lost. (**p.228**)

Publication n°6

Table 1: Value distributions of *Vtg* gene expression from male *G. fossarum* exposed during 4 days to 1 000 μ g.L⁻¹ of cyproterone acetate, and from those exposed 16 days to 0.05 μ g.L⁻¹ of nonylphenol, and comparison with the values of respective solvent-control. (**p.256**)

Data are expressed in *c*DNA copy number quantified by *real time PCR* following *RT* of *m*RNAs contained in 1 μ g of *total*-RNAs. CP: cyproterone acetate; NP: nonylphenol.

INTRODUCTION

Le secteur de la chimie moderne a connu une croissance exponentielle durant la seconde moitié du XX^{ième} siècle. Depuis, l'utilisation de composés organiques de synthèse gère de nombreux aspects de nos activités industrielles, agricoles, urbaines et domestiques. En contre partie, la quantité et la diversité des substances chimiques rejetées dans l'environnement (atmosphérique, terrestre et aquatique) n'ont cessé de croître. Le compartiment aquatique est particulièrement exposé de par sa position en tant que réceptacle ultime pour une grande majorité des contaminants¹. La plupart de ces composés sont persistants et peuvent induire des effets biologiques à court ou à long terme (Burton, 1992), constituant un risque permanent tant sur le plan écologique que sanitaire (McCauley et al., 2000). La récente prise de conscience de l'importance et de la fragilité des biens et services que procurent les écosystèmes à l'homme (Costanza et al., 1997) s'est soldée par la volonté d'une gestion plus raisonnée des ressources. Par conséquent, (i) l'évaluation de la qualité des différents compartiments aquatiques, (ii) ainsi que la gestion des substances susceptibles d'y être introduites sont devenues des préoccupations majeures, favorisant l'émergence de cadres réglementaires à l'échelle nationale et européenne (e.g. Lois sur l'eau n° 64-1245, n°92-3 et n° 2006-1772; Directive cadre eau 2000/60/CE, DCE; Règlement européen n°1907/2006 d'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, REACH).

L'écotoxicologie est la discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leurs actions sur l'environnement (Truhaut, 1977). L'évaluation intégrée de la qualité du milieu aquatique repose à la fois sur l'analyse physico-chimique de l'eau, du sédiment et des organismes qui y vivent, et sur la mesure de réponses biologiques ; ceci dans le but non seulement de décrire le milieu étudié et de définir son niveau de contamination mais aussi de prévenir l'impact des polluants².

L'analyse chimique permet de déterminer localement le degré de contamination, d'identifier la fraction biodisponible pour les organismes et participe à la compréhension du cycle biogéochimique des composés. Néanmoins, la présence d'un xénobiotique³ n'indique pas par elle même des effets délétères sur les biocénoses. Les effets de mélange des

¹ Selon la Convention internationale pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est (OSPAR), un contaminant de l'environnement est une substance décelée dans un milieu où elle ne se trouve pas normalement.

² Selon la Convention OSPAR, un polluant est une substance qui est potentiellement nuisible pour l'homme et l'environnement du fait de ses propriétés physiques, chimiques ou biologiques et dont la présence est directement ou indirectement liée à l'activité humaine.

³ Désigne toute substance qui n'existe pas à l'état naturel (*i.e.* produite par des opérations de synthèses du génie chimique) (Ramade, 1998).

contaminants (*i.e.* effets synergiques, effets antagonistes) ne sont notamment pas pris en compte. De plus, les mesures chimiques présentent des limites : (*i*) des méthodes analytiques n'ont pas été développées pour chacune des quelques 100 000 molécules chimiques (sans compter leurs métabolites) commercialisées, (*ii*) la quantification des concentrations dans des échantillons naturels peut être complexifiée par des interactions particulaires ou des spéciations, enfin (*iii*) certaines substances peuvent présenter un risque à des concentrations inférieures aux limites de détections (Flammarion, 2002). L'évaluation biologique constitue ainsi un complément logique et indispensable à la surveillance chimique, permettant de contourner en partie les problèmes précédemment évoqués (Shugart *et al.*, 1992).

L'évaluation biologique repose sur l'étude de réponses biologiques réelles vis-à-vis de situations environnementales. L'idéal consisterait à étudier des variables biologiques qui soient à la fois précoces (rapidité de réponse à la contamination chimique) et sensibles (effet spécifique de la nature du contaminant et de sa concentration), mais aussi aptes à fonder un diagnostic sur la santé de l'écosystème sans attendre des dommages écologiques irréversibles (Flammarion, 2002). Mais en réalité de telles variables n'existent pas. L'approche la plus courante s'appuie sur des variables biologiques dont la pertinence écologique et les cinétiques de réponses sont complémentaires et dépendent étroitement de l'échelle d'organisation à laquelle elles situent : sub-individu (*i.e.* molécule, cellule, organe), individu (*e.g.* comportement, développement, croissance, reproduction, mortalité), population et communauté (Shugart *et al.*, 1992).

Au niveau le plus intégré au sens écologique, nous trouvons les indices reposant sur la structure des populations et/ou des communautés. Ces indices ont l'avantage d'apporter une appréciation globale de l'état de santé d'un écosystème. Cependant, cette approche ne permet pas, ou rarement, de différencier l'effet de facteurs de confusions pouvant conduire à la raréfaction d'une espèce (*e.g.* régime hydrodynamique, présence/absence et diversité d'habitas, compétition ou pression de prédation), de l'impact d'une pression anthropique. Ces outils de diagnostics utiles ne renseignent pas non plus sur les sources de pollution les plus dangereuses pour l'environnement et ne permettent donc pas, à eux seuls, de fonder des mesures de protection ciblées (Vindimian, 2001). De plus, les observations effectuées au niveau des populations et des communautés ne donnent qu'une information *a posteriori* quant aux impacts potentiels de l'activité anthropique.

L'étude des réponses aux niveaux inférieurs (*i.e.* individu et sub-individu) permet de caractériser plus précisément l'implication des polluants.

Les effets au niveau individuel, sur les traits d'histoire de vie tels que la survie, la croissance et la reproduction, susceptibles d'altérer la fitness⁴ des organismes, présentent un intérêt particulier car ils peuvent servir à alimenter des modèles prédictifs d'effet sur la dynamique des populations. L'essai biologique de toxicité (*i.e.* bioessais) basé sur la mesure de réponses individuelle est certainement l'approche la plus utilisée dans le cadre de diagnostics environnementaux. Il s'agit d'une adaptation des tests de toxicité⁵ classiquement utilisés sur des substances chimiques. Ces essais appliqués à des effluents industriels ou urbains, eau ou sédiments naturels renseignent sur l'impact toxique de la fraction biodisponible des molécules présentes dans la matrice étudiées. Les éventuelles interactions entre substances (i.e. synergies ou antagonismes) sont également intégrées dans le résultat final. Toutefois, les conditions expérimentales contrôlées de laboratoire ne reflètent pas les variations spatio-temporelles des caractéristiques du milieu (température, pH, dureté, oxygène, carbone organique) qui peuvent modifier la sensibilité des organismes, ainsi que la biodisponibilité et par conséquent la toxicité des contaminants. Plus récemment, des études ont été consacrées au développement de bioessais in situ (e.g. Crane et al., 1995; Crane et al., 1999; Schultz et Liess, 1999; Barata et al., 2007). Ces outils présentent les avantages développés au laboratoire (sensibilité, rapidité, simplicité) et permettent de déterminer la qualité réelle d'un milieu vis-à-vis d'une espèce (Geffard, 2001).

Durant ces trente dernières années, de nombreux efforts ont été centrés sur le développement d'outils permettant de mesurer des variables biologiques au niveau subindividuel, ou biomarqueurs, afin de caractériser les réponses sub-létales et les effets impliqués dans les étapes précoces d'intoxication d'un organisme par les polluants. La notion de biomarqueur a été définie par Lagadic (1997) comme « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, révélant l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ». Les biomarqueurs peuvent être sub-divisés en trois catégories :

(*i*) Les biomarqueurs d'exposition indiquent que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme. Généralement, les biomarqueurs d'exposition sont le résultat de l'interaction du polluant avec une molécule ou cellule cible.

⁴ Valeur adaptative qui décrit globalement la capacité d'un organisme à se reproduire.

⁵ Tests qui consistent à mettre en évidence une réponse biologique en fonction de doses ou de concentrations de toxiques en comparaison avec un témoin au travers de l'exposition en laboratoire des organismes directement à ces divers milieux.

(ii) Les biomarqueurs d'effet incluent tous changements biochimiques, physiologiques ou autres reconnus de façon établie comme étant associés à une quelconque altération de la santé de l'organisme.

(iii) Les biomarqueurs de sensibilité reflètent les variations, d'origine génétique, de la réponse à la contamination par les polluants.

Les biomarqueurs fournissent une indication précoce de la présence et/ou des effets d'une contamination du milieu. Ces outils présentent l'avantage de pouvoir caractériser le ou les mode(s) d'action d'un contaminant, certains biomarqueurs présentant une spécificité relative vis-à-vis d'un type de contaminant (*e.g.* l'induction de la synthèse des métallothionéines qui présente une certaine spécificité à l'encontre d'une contamination métallique). Les biomarqueurs peuvent être utilisés directement sur des organismes autoctones du milieu d'intérêt mais également dans le cadre de bioassais. Néanmoins, leur interprétation dans le milieu naturel se confronte encore au manque de valeurs de référence ainsi qu'une méconnaissance de leur variabilité naturelle (van der Oost *et al.*, 2003). De plus, la pertinence écologique de ces outils reste très controversée en partie dû au manque de données permettant d'établir des relations entre leurs réponses et des altérations à des niveaux d'organisation supérieurs (*e.g.* fitness des organismes, structure des populations) (Forbes *et al.*, 2006).

Dans ce contexte, les travaux présentés dans ce manuscrit sont centrés sur l'étude de réponses au niveau individuel et sub-individuel chez une espèce d'intérêt en écotoxicologie, l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*, dans le but de proposer des outils d'évaluation de la qualité d'eaux courantes soumises à des rejets anthropiques de divers origines (industrielles, urbaines et agricoles).

Gammarus fossarum a été retenu comme modèle d'étude pour plusieurs raisons. C'est une espèce qui est largement répartie dans les rivières d'Europe de l'ouest (des eaux douces aux eaux calcaires) (Barnard et Barnard, 1983). Les gammares remplissent un rôle clé dans le fonctionnement de leur réseau trophique de par son action sur la dégradation et la redistribution de la matière organique (Maltby et Crane, 1994; Felten, 2003), mais également en tant que ressource alimentaire pour divers espèces de macroinvertébrés, poissons, amphibiens et oiseaux (Welton, 1979; Friberg *et al.*, 1994; MacNeil *et al.*, 2000). *G. fossarum* est présent tout au long de l'année et facilement échantillonné. Son identification spécifique et la différenciation des sexes sont relativement aisées et non invasives. C'est un organisme qui peut être utilisé aussi bien en laboratoire que dans le milieu naturel, sur des populations autochtones ou au moyen de système de transplantation (Gerhardt *et al.*, 1998; Schultz et Liess, 1999). De plus, l'utilisation du genre *Gammarus* en écotoxicologie bénéficie d'un certain recul puisque le gammare a fait l'objet de nombreuses études, tous niveaux d'organisation confondus (*i.e.* de l'échelle moléculaire à l'échelle populationnelle).

L'objectif de ces travaux était de développer des outils indicateurs de perturbation en lien avec des grandes fonctions biologiques de l'organisme susceptibles d'influer sur la fitness des organismes. Les efforts ont été centrés sur l'étude de stress de nature neurotoxique et reprotoxique afin de privilégier la détection de contaminants parmi les plus problématiques sur le plan environnemental que sont les biocides et les perturbateurs endocriniens.

Un premier volet a été consacré à l'adaptation et l'optimisation, chez notre modèle d'étude, d'un biomarqueur utilisé depuis plusieurs années pour évaluer la neurotoxicité d'un composé ou du milieu : l'inhibition de l'activité enzymatique des cholinestérases (Fulton et Key, 2001). Pour cela, nous avons recherché à développer une méthodologie fiable et robuste basée sur la définition de valeurs de références afin de faciliter l'application et l'interprétation de ce marqueur dans le milieu naturel. Parallèlement, nous avons étudié les liens entre une inhibition des cholinestérases et des réponses au niveau individuel (survie et comportement) dans le but d'évaluer la possibilité d'interpréter ce marqueur d'exposition en terme d'effets sur des paramètres considérés comme écologiquement pertinents.

Le second volet concernait le développement d'outils capables de diagnostiquer l'impact d'une perturbation endocrinienne sur la reproduction de *G. fossarum*. Il est nécessaire de souligner qu'il existe très peu d'outils valides, à l'heure actuelle, permettant de diagnostiquer précisément l'impact d'une telle perturbation chez les crustacés. Notre démarche, ici, a été (*i*) de mettre au point un test de reprotoxicité basé sur la mesure simultanée de différents processus physiologiques afin de préciser le mode d'action du contaminant sur la reproduction et (*ii*), par analogie aux travaux effectués chez les poissons (Sumpter et Jobling, 1995; Matthiessen, 2003; Langston *et al.*, 2005), de développer la mesure l'expression du gène de la vitellogènine comme un biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne chez les organismes mâles.

Enfin, la pertinence de l'utilisation en milieux naturels des différents outils développés a été évaluée dans le cadre de campagne d'application *in situ*.

L'exposé de cette étude se décline en 5 différents chapitres. Le Chapitre I est consacré à une synthèse bibliographique des connaissances relatives à l'utilisation des

cholinestérases en tant que biomarqueurs de neurotoxicité et aux perturbations de la régulation endocrinienne en lien avec la reproduction chez les crustacés, ainsi qu'à une présentation de l'espèce retenue comme organisme sentinelle dans le cadre de ces travaux (*i.e. Gammarus fossarum*). Les différentes procédures de prélèvement, de maintien et d'exposition des organismes, ainsi que les méthodologies utilisées pour mesurer les différents marqueurs biologiques étudiés au cours de ces travaux sont présentées dans le **Chapitre II**. Dans le **Chapitre III**, l'ensemble des résultats obtenus, détaillés dans les chapitres suivants, est présenté sous forme de synthèse. Le chapitre suivant (**IV**) regroupe l'ensemble des travaux relatifs à la mesure de l'activité ChE chez *Gammarus fossarum*. Enfin, le **Chapitre V** l'ensemble des travaux visant à développer des marqueurs spécifiques d'une perturbation endocrinienne en lien avec la reproduction chez *Gammarus fossarum*.
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre expose, au travers d'une première partie, un état de l'art des connaissances relatives à l'utilisation des cholinestérases en tant que biomarqueurs de neurotoxicité, en se focalisant principalement sur la faune des milieux aquatiques et plus particulièrement sur les travaux réalisés chez les invertébrés.

La seconde partie a pour but de faire le point des connaissances actuelles concernant les perturbations de la régulation endocrinienne en lien avec la reproduction, chez les crustacés.

La troisième partie est consacrée à la présentation de l'espèce retenue comme organisme sentinelle dans le cadre de ces travaux, l'amphipode *Gammarus fossarum*.

Enfin, les objectifs de ce travail sont representés, de façon détaillée, dans la dernière partie.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

1. INDICATEURS DE STRESS NEUROTOXIQUE DANS LE MILIEU

Le système nerveux est le centre de contrôle du fonctionnement des activités végétatives et motrices des métazoaires. Il réceptionne les informations sensorielles et motrices en provenance du milieu extérieur ou du corps lui-même, et les véhicule directement ou *via* le système hormonal vers les organes effecteurs, en vue d'une réponse volontaire ou en attente d'une régulation réflexe adéquate. La fonction nerveuse conditionne directement la capacité d'un organisme à évoluer et à survivre dans son environnement.

Durant ces dernières décennies, plusieurs centaines de composés chimiques ont été identifiés comme neurotoxiques pour l'homme (Rice, 1999) et la faune sauvage (Hoffman *et al.*, 2003). Il est généralement établi que les changements dans la chimie du système nerveux, suite à l'exposition à des neurotoxiques, précèdent généralement de graves altérations de la santé de l'organisme (Stamler *et al.*, 2005). Ces changements neurochimiques (*i.e.* niveaux des neurotransmetteurs, l'activité des enzymes de métabolisation ainsi que l'occurrence et le fonctionnement des récepteurs) peuvent être utilisés pour diagnostiquer l'exposition et les effets causés par des neurotoxiques (Manzo *et al.*, 2001).

La mesure de l'activité des cholinestérases (ChE) est de loin le biomarqueur de neurotoxicité qui a été le plus étudié et le plus utilisé, ces dernières années, en toxicologie environnementale des milieux aquatiques ; les autres marqueurs tels que le métabolisme de l'acide γ -aminobutyric (*i.e.* GABA), les niveaux de monoamines (*e.g.* la sérotonines et dopamine) ou l'activité des monoamine-oxidase, n'ont fait l'objet que d'études ponctuelles (*e.g.* Gagné *et al.*, 2007).

Cette partie de la synthèse bibliographique propose un état de l'art des connaissances relatives à l'utilisation des ChE en écotoxicologie aquatique, notamment en ce qui concerne (*i*) les inhibiteurs spécifiques et non-spécifiques de ces enzymes, (*ii*) les difficultés liées à leur application en tant que biomarqueurs et (*iii*) les répercutions au niveau individuel d'une inhibition de leur activité, en s'intéressant plus particulièrement aux travaux réalisés chez les invertébrés. Nous commencerons, toutefois, par de brefs rappels concernant la classification et les fonctions des ChE.

1.1. Classification et fonction des cholinestérases

Classification

Deux types d'estérases ont été distingués selon leur interaction avec les organophosphorés (Aldridge, 1953) : les **estérases A** qui sont capables d'hydrolyser certains organophosphorés, et les **estérases B** qui sont inhibées par ces composés. Les estérases B regroupent différentes sous-familles, incluant notamment les **cholinestérases** (ChE), les **carboxylestérases**.

Par définition, les ChE catalysent préférentiellement les réactions d'hydrolyse d'esters de choline. Elles se distinguent également par leur sensibilité prononcée à l'éserine qui est un inhibiteur spécifique de cette famille d'enzymes (Eto, 1974).

Les vertébrés possèdent deux isoformes de cholinestérase correspondant à deux gènes distincts : l'acétylcholinestérases (AChE ; EC 3.1.1.7), et la butyrycholinestérases (BChE ; EC 3.1.1.8), également appelée pseudocholinestérase (revu par Massoulié et al., 1993). Ces isoformes se distinguent d'une part, par leur spécificité vis à vis de différents substrats : l'AChE hydrolyse préférentiellement l'acétylcholine. A l'inverse, la BChE n'a pas de substrat spécifique connu. Bien que ses propriétés catalytiques puissent varier d'une espèce à l'autre, elle hydrolyse préférentiellement les esters butyriques et propioniques de choline (e.g. butyrylcholine et propionylcholine), mais est également capables d'hydrolyser l'acétylcholine. D'autre part, ces deux isoformes peuvent également être différenciées sur la base de leur affinité pour divers inhibiteurs sélectifs, tel que le BW284c51 pour l'AChE, et l'ethopropazine, l'iso-OMPAet le bambuterol pour la BChE. Selon certains auteurs, cette dualité entre AChE et BChE est spécifique des vertébrés et serait probablement originaire d'une duplication d'un gène de ChE chez l'ancêtre commun des gnathostomes (Massoulié et al., 1993). Toutefois, si cette dichotomie ressort très clairement chez les vertébrés supérieurs, des activités ChE intermédiaires aux deux formes ont été reportées chez certains poissons.

Les propriétés biochimiques et pharmacologiques des ChE d'invertébrés ont fait l'objet de moins d'études. Ces travaux se focalisent exclusivement sur des espèces marines ou estuariennes, à quelques exceptions près comme le cladocère *Daphnia magna*, le bivalve *Corbicula fluminea*, le gastéropode *Biomphalaria glabrata* et l'oligochète *Lumbricus* *variegatus* (*Tab. I-1*). Une grande majorité de ces organismes ne semble posséder qu'une seule isoforme de ChE présentant les propriétés de l'AChE de vertébrés. Cependant, des ChE combinant les propriétés intermédiaires entre AChE et BChE ont été observées chez quelques espèces de crustacés inférieurs, mollusques, annélides et échinodermes.

 Tableau I-1 : Résultats d'études de caractérisation des ChE menées chez différents groupes taxonomiques d'invertébrés aquatiques.

Espèces	Tissus	Isoforme	Préférence pour les différents substrats	Répor	ıse au inhibiteu	rs séléctifs	Références
Crustacés				Esérine	BW284c51	iso -OMPA	
Décapodes							
Callinectes sapidus	Ganglions thoraciques	AChE	ACh > PCh > BCh	+	N.D.	N.D.	Monserrat et Bianchini, 2000 Habig <i>et al.</i> , 1988
Maia verrucosa	Corps entier	intermédiare	PCh > ACh > BCh	N.D.	N.D.	N.D.	Talesa et al., 1992
Palinurus vulgaris	Corps entier	intermédiare	BCh > PCh > ACh	ND	ND	ND	Talesa et al., 1992
Chasmagnathus granulata	Ganglions thoraciques	AChE	ACh > PCh >>> BCh	+	N.D.	N.D.	Monserrat et Bianchini, 1998
Palaemonetes pugio	Corps entier	AChE	ACh > PCh >>> BCh	+	+	-	Kev et Fulton, 2002
Palaemon serratus	Pédoncules oculaires	AChE	ACh > PCh >>> BCh	+	N.D	-	Frasco et al., 2006
Litopenaeus vannamei	Pédoncules oculaires	AChE	ACh > PCh > BCh	+	+	-	Garcia-de-la-Parra et al., 2006
1	Muscle	AChE	ACh > PCh > BCh	+	+	-	,,,
Stomatopodes							
Squilla mantis	Corps entier	AChE	PCh > ACh > BCh	N.D.	N.D.	N.D.	Principato et al., 1988
Copépodes							* ·
Lepeophtheirus salmonis	Corps entier	AChE	ACh > PCh > BCh	N.D.	N.D.	N.D.	Walday et Fonnum, 1989
Tigriopus brevcornis	Corps entier	AChE	ACh > PCh >>> BCh	+	+	-	Forget et Bocquené, 1999
Erytemora affinis	Corps entier	AChE	ACh >>> PCh > BCh	+	+	-	Forget et al., 2002
Branchiopodes							- ·
Artemia salina	Corps entier	intermédiare	ACh > PCh > BCh	+	+	-	Varo et al., 2002
Artemia parthengenetica	Corps entier	intermédiare	PTCh > ATCh > BTCh	+	+	+	Varo et al., 2002
Cladocères							
Dapnia magna	Corps entier	intermédiare	PTCh > ATCh > BTCh	+	+	+	Diamantino et al., 2003
Mollusques							
Lamellibranches							
Murex brandaris	Corps entier	intermédiare	PCh > ACh > BCh	ND	ND	ND	Talesa et al. 1990
Crassostrea gigas	Branchies	AChE (A et B)*	ACh > PCh > BCh	+	N D	-	Bocquené et al. 1997
Crassostrea rhizophora	Branchies	AChE	ND	+	ND	-	Monserrat et al. 2002
Mytilus edulis	Branchies	AChE	ACh > PCh > BCh	ND	N D	ND	Mora et al. 1999a
Mytilus galloprovincialis	Branchies	AChE	ACh > PCh > BCh	N D	N D	N D	Mora et al. 1999a
Corbicula fulminea	Corps entier	intermédiare	PCh > ACh > BCh	ND.	N D	N D	Mora et al. 1999a
Pecten jacobaeus	Branchies	intermédiare	PCh > BCh > ACh	ND	+	_	Bonacci et al. 2007
	Muscles aducteurs	AChE	ACh > PCh > BCh	N.D.	+	-	Bonacci et al., 2007
	Glande digesive	intermédiare	PCh > ACh > BCh	N.D.	+	+	Bonacci et al., 2007
Gastéropodes							
Biomphalaria glabrata	Corps entier	AChE	ACh > BCh	+	N.D.	-	Kristoff et al., 2006
Monodonta lineata	Muscle	intermédiare	PCh > ACh >>> BCh	+	+	+	Cunha et al., 2007
Nucella lapidus	Muscle	intermédiare	PCh > ACh > BCh	+	+	+	Cunha et al., 2007
Annélides							
Lumbriculus variegatus	Corps entier	intermédiare	$\Delta TCh = BTCh$	+	ND	+	Kristoff et al 2006
Arenicola marina	Corps entier	intermédiare	PCh > ACh >>> BCh	ND	N D	N D	Hannam et al 2008
Fabinadarmas	corps entited	mermediare	. eas neass bell	11.D.	n.p.	n.D.	
Paracentrotus lividus	Piede ambulacraires	intermédiare	ACh > PCh >>> BCh	+	+	+	Cumba at al. 2005
1 aracentrotus tiviaus	r ieus amoutaciaires	memeurare	ACII - FUI BUII	Ŧ	Ŧ	Ŧ	Cumia et al. , 2005

AChE indique que l'isoforme présente toutes les caractéristiques d'une AChE de vertébrés. *Intermédiaire* indique que l'isoforme présente des propriétés intermédiaires entre AChE et BChE de vertébrés. ACh, PCh et BCh signifient respectivement acétylcholine, propionylcholine et butyrylcholine. Le signe '=' indique des activités équivalentes alors que le signe '>>>' marquent une forte décroissance d'activité. Les signes + et – traduisent respectivement la présence ou l'absence d'inhibition.

* Bocquené *et al.* (1997) ont caractérisé deux AChE chez *C. gigas*, qu'ils ont nommées A (forme soluble) et B (forme transmembranaire).

De plus, des travaux ont montré que le nombre de gènes codant pour une même isoforme varie suivant selon le phylum considéré. Par exemple, chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, l'AChE est codée par trois gènes différents (Johnson *et al.*, 1988), alors que seulement un gène a été décrit chez la drosophile (Hall et Kankel, 1976). Il a également été

rapporté, chez quelques espèces de bivalves, qu'une même isoforme peu présenter des propriétés structurelles et/ou catalytiques distinctes en fonction des tissus ou des fractions cellulaires considérés (Bocquené *et al.*, 1997; Talesa *et al.*, 2001; Bonacci *et al.*, 2008).

Fonctions

L'AChE est principalement connue pour remplir un rôle clé dans la régulation de la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses cholinergiques. En effet, après le passage du potentiel d'action, l'AChE dégrade les neurotransmetteurs (*i.e.* acétylcholine) encore présents dans la fente synaptique, mettant ainsi un terme à la stimulation de la membrane post-synaptique (*Fig. I-1*).



Figure I-1 : Transmission de l'influx nerveux au niveau d'une synapse cholinergique. ACh : acétylcholine ; AChE : acétylcholinestérase.

Chez les vertébrés, l'acétylcholine est le principal neurotransmetteur intervenant au niveau des jonctions neuromusculaires. On retrouve également de nombreux neurones cholinergiques au niveau du système nerveux central et périphérique.

Chez les invertébrés, le rôle des voies cholinergiques n'est pas clairement établi. Chez les insectes et les crustacés, l'acétylcholine est principalement sollicité au niveau des neurones mécano- et chimiorécepteurs du système neurosensoriel, leurs jonctions neuromusculaires étant essentiellement de type glutaminergique et GABA-ergique (vu dans Braun et Mulloney, 1994; Fabian et Seyfarth, 1997). Toutefois, l'utilisation de l'acétylcholine par certains motoneurones innervant le système digestif et cardiovasculaire, et inter-neurones présents dans les pédoncules oculaires, a été mis en évidence chez quelques espèces de crustacé décapode (*e.g.* Pfeiffer et Glantz, 1989; Tatzaki et Tatzaki, 1997; Davidson *et al.*, 1998). De plus, chez ces organismes, des récepteurs spécifiques de l'acétylcholine (*i.e.* récepteurs

nicotiniques et muscariniques) sont présents au niveau du système nerveux central, du ganglion somato-gastrique et du ganglion cardiaque (Braun et Mulloney, 1994).

Certains auteurs ont suggéré que l'acétylcholinestérase pourrait être impliquée dans des fonctions non-synaptiques voir non-catalytiques, telles que dans la morphogenèse des stades embryonnaires précoces, le contrôle de la croissance des neutrites ou encore dans des mécanismes d'adhérence cellulaire (revu par Massoulié *et al.*, 1993).

Le rôle des BChE chez les vertébrés n'est pas clairement établi (revu par Massoulié *et al.*, 1993). Cependant, ces enzymes ne semblent pas intervenir au niveau de la transmission nerveuse. Massolié *et al.* (1993) pensent que les BChE pourraient être associées à la division et aux migrations cellulaires au début du développement des somites chez l'embryon, à des mécanismes de détoxication, et pourraient contrôler l'expression de l'AChE dans les stades précoces du développement.

1.2. Principaux inhibiteurs de cholinestérase d'origine anthropique

1.2.1. Inhibiteurs spécifiques

Les organophosphorés (OP) et les carbamates (Cb) sont couramment employés en tant que pesticides dans le traitement des zones agricoles et urbaines, ainsi que par les particuliers. Leur commercialisation ayant débuté dans les années 40, ces composés ont progressivement remplacé les organochlorés du fait de leur dégradation rapide et de leur faible rémanence dans l'environnement. Il existe plus de 100 OP et 50 Cb répertoriées. Des organophosphorés tels que le chlorpyrifos, le fénitrothion et le dichlorvos ; et des carbamates tels que le carbaryle, le carbofurane et le méthomyle figurent parmi les substances actives les plus employées dans la lutte contre les insectes ravageurs. Cependant, leur forte toxicité et leur relative manque de spécificité posent le problème de leurs effets sur les populations d'espèces non-cibles.

Le mode d'action des OP et Cb repose sur l'inhibition des ChE, spécialement de l'AChE. Ces molécules présentent certaines analogies avec le substrat naturel de l'enzyme. Leur fixation au niveau de la gorge catalytique (*i.e.* site actif) de l'enzyme bloque l'accès au substrat. La diminution de la quantité d'enzymes fonctionnelles provoque alors

l'accumulation de neurotransmetteurs dans les synapses, ce qui induit une sur-stimulation du système nerveux (central, périphérique et/ou neuromusculaire) pouvant conduire à la mort de l'organisme (*Fig. I-2*).



Figure I-2 : Représentation schématique d'une inhibition de l'AChE par des insecticides organophosphorés ou carbamates.

L'inhibition occasionnée par les Cb est réversible du fait d'une faible stabilité des enzymes carbamylées. Le retour à une activité normale suite à disparition du contaminant est généralement de courte durée. Par exemple, Ferrari *et al.* (2004) observent une inhibition de 70 % de l'activité AChE du cerveau chez le poisson *Carrassius auratus* exposé au carbaryle. Après 96 heures de maintien en milieu non contaminé, les auteurs constatent que ces animaux ont récupéré 75 % de leur activité de base. En revanche, les complexes formés avec les OP sont plus stables et le plus souvent irréversibles. Il est généralement admis, que le retour à une activité de base nécessite la synthèse de nouvelles molécules d'enzyme. Les temps de récupération sont donc beaucoup plus longs que ceux observés suite à une intoxication aux Cb, et sont fonction du degré d'inhibition. Une inhibition de 90 % de l'activité AChE du cerveau de *Carassius auratus*, induite par une exposition à l'azinphosméthyle, n'est récupérée qu'à 80 % après 35 jours en milieu non contaminé (Ferrari et al., 2004). De plus, les temps de récupération peuvent varier en fonction des organes considérés. Par exemple, Rao (2004) constate, chez le tilapia *Oreochromis mossambicus* exposé à des organophosphorés, des temps de récupération différents, entre les muscles, les branchies et le cerveau.

La sensibilité *in vitro* (*i.e.* constante d'inhibition) des ChE aux OP et Cb diffère en fonction des isoformes et/ou des phylums considérés (*Tab. I-2*). Les études menées chez le poisson, montrent que la BChE est beaucoup plus sensible que l'AChE (Sturm *et al.*, 1999). Bocquené *et al.* (1997) ont constaté, chez l'huître *Crassostrea gigas*, la présence de deux formes d'AChE (forme 'A' : soluble ; forme 'B' : trans-membranaire) avec des sensibilités

complètement différentes. Si l'on considère uniquement l'AChE, les données montrent une très forte sensibilité des arthropodes, suivi des vertébrés, et enfin une plus faible sensibilité des mollusques et des nématodes.

Si les Cb sont des inhibiteurs directs des cholinestérases, en revanche le pouvoir inhibiteur, *in vivo*, des OP est lié à leur métabolisation. En effet, parmi les OP, on peut différencier les molécules qui contiennent dans leur structure un groupement 'thion' (=S), de celles qui portent un groupement 'oxon' (=O). Les OP de type 'thion' qui sont les principaux utilisés, ne sont pas des inhibiteurs très puissants de ChE sous leur forme originelle. Ces composés doivent, après pénétration dans l'organisme, être activés en forme 'oxon' par les enzymes de bio-transformation (*e.g.* mono-oxygénases du cytochrome P450) leur procurant ainsi un fort pouvoir inhibiteur (Schoor et Brausch, 1980; Murray et Butler, 1994). Ainsi, les différences de sensibilité *in vivo* observées entre taxons peut dépendre des mécanismes de biotransformation préférentiellement employés par l'organisme (*e.g.* hydrolyse et conjugaison, déméthylation, ou oxydation et réduction). Par exemple, une étude comparative a montré que l'oxydation des OP en forme 'oxon' était trouvée de manière prédominante chez les crustacés en comparaison aux poissons et aux mollusques, ce qui pourrait expliquer la sensibilité accrue de ces organismes (Takimoto *et al.*, 1987).

1.2.2. Molécules pouvant moduler l'activité ChE

Certains contaminants tels que les métaux, les hydrocarbures, les surfactants, ou certains pesticides n'appartenant pas aux familles des OP et Cb, peuvent moduler (*i.e.* inhibition et induction) l'activité des ChE. Ces molécules sont pour la plupart des inhibiteurs nettement moins puissants que les OP et Cb, probablement dû à des mécanismes d'action non-spécifiques (*e.g.* modulation de la synthèse de l'enzyme ou interaction avec des sites non-catalytiques). La durée des effets induits par ces polluants reste le plus souvent à étudier.

Esnèces	Isoforn	aes de ChRs		Carha	mates		Oreal	nonhosnhorés			Références
	Natura	Drovianance	Fcárina	Carhofinan	Pronoviir	Carbary	Daraovon	Malaovon	Azametsuhos	Dichloruos	
Nématodes	Amur		CITING I	Caroonanan	myodori	Call Dat yr	1 40 40 41	INTERNATIO	sourcesting		
Caenorhabditis elegans	ACHE	Produite en culture cellulaire		6.30×10^2	6.00×10^{1}	9.10	2.70 x 10 ¹ (Et); 9.70 (Mt)	1.60×10^{1}	1.20×10^{2}	< 10 ¹	Villate et al., 1998
Arthropodes											
Drosophila melanogaster	ACHE	Produite en culture cellulaire		5.10×10^3	8.30×10^2	1.70×10^2	$1.40 \text{ x } 10^3 \text{ (Et)}; 4.20 \text{ x } 10^2 \text{ (Mt)}$	2.60 x 10 ³	3.30×10^4	5.00×10^{2}	Villate et al., 1998
Chasmagnathus granulata	AChE	Ganglions thoraciques	4.86×10^2								Monserrat et Bianchini, 1998
Palaemon serratus	AChE	Pédoncules oculaires	1.30×10^{3}	5.50×10^3	4.70×10^2	3.90 x 10 ²	$1.70 \times 10^2 (\text{Mt})$	7.20×10^{2}		1.20×10^{2}	Frasco et al., 2006
Lepeophtheirus salmonis	AChE	Corps entier	3.80×10^2				1.70×10^2				Walday et Fonnum, 1989
Tigriopus brevcornis	AChE	Corps entier	2.50×10^3	2.80×10^{2}			$2.70 \times 10^3 (Et)$			2.30×10^2	Forget et Bocquené, 1999
. Eurytemora ainis	AChE	Corps entier	1.70×10^{3}	2.00×10^2							Forget et al., 2002
Mollusques											
Crassostrea gigas	AChE 'A'	Branchies	4.70×10^2	2.20×10^{3}		6.70 x 10 ¹	3.00×10^2				Bocquené et al., 1997
	AChE 'B'	Branchies	2.70 x 10 ¹	1.35 x 10 ⁻¹		6.30 x 10 ⁻²	7.60×10^{-3}				Bocquené et al., 1997
Crassostrea rhizophora	AChE	Branchies	5.10×10^{1}								Monserrat et al., 2002
Mytilus edulis	AChE	Branchies					3.60 x 10 ¹ (Mt)	3.50	1.40		Mora et al., 1999a
Mytilus galloprovincialis	AChE	Branchies					2.30 x 10 ¹ (Mt)	2.70	0.72		Mora et al., 1999a
Corbicula fulminea	AChE	Corps entier					0.89	6.30	1.20		Mora et al., 1999a
Poissons											
Torpedo califonica	ACHE	Produite en culture celulaire		2.30×10^3	6.40×10^{1}	5.30 x 10 ¹	$5.80 \times 10^{1} (\text{Et})$; $2.10 \times 10^{2} (\text{Mt})$	3.00×10^2	3.5×10^2	1.90	Villate et al., 1998
Electrophorus electricus	ACHE	(Sigma)		2.90×10^3	1.50×10^2	6.60 x 10 ¹	2.9×10^2 (Et); 7.5 x 10^1 (Mt)	1.10 x 10 ²	2.9×10^2	$< 10^{1}$	Villate et al., 1998
Limanda limanda	AChE	Cerveau					7.40×10^{1}			1.10×10^{1}	Sturm et al., 1999
,	AChE	Muscle					2.30×10^{1}			8.90	Sturm et al., 1999
	BChE	Muscle					8.90 x 10 ⁴			2.60×10^4	Sturm et al., 1999
Platichthys flesus	AChE	Cerveau					8.30×10^{1}			1.10×10^{1}	Sturm et al., 1999
	AChE	Muscle					2.10 x 10 ¹			8.90	Sturm et al., 1999
1	BChE	Muscle					8.70 x 10 ⁴			2.40×10^4	Sturm et al., 1999
Serranus cabrilla	AChE	Cerveau					1.20×10^{1}			9.90	Sturm et al., 1999
	AChE	Muscle					9.90 x 10 ¹			7.30	Sturm et al., 1999
	BChE	Muscle					8.10 x 10 ⁴			8.10×10^{4}	Sturm et al., 1999
Mammifaires											
Bœuf	AChE	Erytrocytes (Sigma)		3.30 x 10 ²	5.90 x 10 ¹	3.80	$2.80 \text{ x} 10^2 \text{ (Et)}$; $2.20 \text{ x} 10^2 \text{ (Mt)}$	2.90 x 10 ³	2.2 x 10 ²	< 10 ¹	Villate et al., 1998

Tableau I-2 : Constantes d'inhibitions (Ki en mM⁻¹.min⁻¹) de ChE provenant d'espèces de divers phylums, pour différents organophosphorés et carbamates.

Dans le cas du paraoxon, 'Et' et 'Mt' caractérise la forme étyhlée ou méthylée du composé.

Les métaux et métalloïdes

De nombreuses études rapportent l'effet inhibiteur, *in vivo* et *in vitro*, des **ions métalliques**, tels que le cuivre, le cadmium, le zinc, le mercure ou l'arsenic, sur les ChE de poissons et d'invertébrés aquatiques (*Tab. I-3*). Certains auteurs ont également observé des inductions d'activité ChE lors d'exposition *in vivo* au cuivre et au cadmium (*e.g.* Brown et al., 2004; Cunha et al., 2007). Bien que des inhibitions aient pu être observées, les concentrations effectives sont généralement très éloignées des concentrations mesurées *in situ*.

 Tableau I-3 : Exemples d'études mettant en évidence le pouvoir inhibiteur, in vitro et in vivo, de quelques métaux sur les ChE d'organismes aquatiques.

Espèces			Cuivre			Cadmium			Zinc		Références
		CI ₅₀	LOEC	NOEC	CI ₅₀	LOEC	NOEC	CI ₅₀	LOEC	NOEC	
<u>In vitro</u>											
Daphnia magna					3,4	N.D.	N.D.				Guillermino et al., 1996
								N.D.	25	12,5	Diamantino et al., 2003
Palaemon serratus		3.3 (100%)	N.D.	N.D.	112.4 (11%)	N.D.	N.D.	6.3 (15%)	N.D.	N.D.	Bocquené et al., 1990
Mytilus edulis		3.3 (100%)	N.D.	N.D.	112.4 (17%)	N.D.	N.D.	6.3 (13%)	N.D.	N.D.	Bocquené et al., 1990
Monodonta lineata		12,7	6,3	3,1	N.D.	N.D.	100,0				Cunha et al., 2007
Nucella lapidus		5,87	3,1	N.D.	N.D.	N.D.	100,0				Cunha et al., 2007
Scomber scomber		3.3 (100%)	N.D.	N.D.	112.4 (11%)	N.D.	N.D.	6.3 (16%)	N.D.	N.D.	Bocquené et al., 1990
Pleuronectes platessa		3.3 (100%)	N.D.	N.D.	112.4 (12%)	N.D.	N.D.	6.3 (21%)	N.D.	N.D.	Bocquené et al., 1990
<u>In vivo</u>											
Carsinus maenas	(7j)	N.D.	6.8 x 10 ⁻²	3.9 x 10 ⁻²							Brown et al., 2004
	(4j)							14,7	7,39	14,8	Elumalai et al., 2007
Daphnia magna	(2j)							1,0	0,55	0,275	Diamantino et al., 2003
Mytilus édulis	(7j)	N.D.	N.D.	6.8 x10 ⁻³							Brown et al., 2004
Ruditapes decussatus	(5j)	7.5 x 10 ⁻² (60%)	N.D.	N.D.							Hamza-Chaffai et al., 1998
Monodonta lineata	(4j)	N.D.	N.D.	6.0 x 10 ⁻²							Cunha et al., 2007
Nucella lapidus	(4j)	N.D.	N.D.	4.4 x 10 ⁻²							Cunha et al., 2007
Perinereis aibuhitensis	(10j)	0.5 (34.%)	0,05	N.D.	3.0 (45%)	0,1	N.D.				Zhang et al., 2008

Les concentrations sont données en mg.l⁻¹. Les durées d'exposition *in vivo* sont indiquées entre parenthèses. LOEC = plus petite concentration testée pour laquelle un effet est observé ; NOEC : concentration sans effet observé ; CI_{50} = concentration de demi-inhibition, mis à part les concentrations pour lesquelles le niveau d'inhibition est indiqué entre parenthèses.

Le mécanisme *via* lequel les métaux agissent sur les activités ChE n'est pas clairement connu, mais il ne semble pas résulter d'une action spécifique de ces composés au niveau du site actif de l'enzyme. La perte d'activité pourrait s'expliquer par une modification conformationnelle de l'enzyme liée à l'interaction des métaux sur des sites périphériques (Frasco *et al.*, 2007).

Les pesticides pyréthrinoïdes et le paraquat

Les insecticides **pyréthrinoïdes** sont des composés neurotoxiques réputés pour être extrêmement toxiques pour les insectes mais peu toxiques pour les animaux à sang chaud. Bien que peu rémanentes dans l'environnement, ces molécules sont fortement

bioaccumulables et ont été montrées comme très toxiques pour les espèces aquatiques (poissons et invertébrés), avec des CL_{50} de l'ordre du µg.l⁻¹ (Bocquené, 1996).

L'action des pyréthrinoïdes réside principalement dans le blocage des canaux ioniques sodium/potassium au niveau des axones neuronaux. Ces composés ont été également associés à de nombreux autres effets, dont notamment des perturbations du système cholinergique. Par exemple, des inhibitions significatives d'AChE ont été observées chez des carpes exposées à 20 μ g.I⁻¹ de cyperméthrine et 2 μ g.I⁻¹ de deltaméthrine (Reddy et Philip, 1994; Szegletes *et al.*, 1995). En revanche, chez l'abeille exposée à 12.5 ng de deltaméthrine durant 24 h, Badiou et Belzunces (2008) observent une inhibition d'AChE de 20 % chez les individus morts, et une induction de 250 % chez les individus vivants. De même, Davies *et al.* (Davies *et al.*, 1994) mesurent une activation de l'ordre de 20 % chez les truites exposées à 0.9 μ g.I⁻¹ de cyperméthrine. Les mécanismes via lesquels les pyréthrinoïdes agissent sur l'activité des ChE restent à élucider. Les effets inducteurs ou inhibiteurs des pyréthrinoïdes s'accompagnent généralement d'altération dans la distribution des formes solubles ou transmembranaires des ChE. De ce fait, certains auteurs suggèrent que ces composés pourraient agir à différents niveaux de la biosynthèse de l'enzyme (Badiou et Belzunces, 2008).

Le paraquat est un composé organique avec un ammonium quaternaire utilisé comme herbicide. Il agit sur les mécanismes de respiration et de photosynthèse de nombreux végétaux. Nemcsok *et al.* (1984) sont parmi les premiers à observer des effets inhibiteurs sur l'AChE, chez la carpe (*Cyprinus carpio*), au cours d'exposition *in vitro* et *in vivo*. Ils rapportent des CI_{50} comprises entre 7 x 10^{-5} et 1 x 10^{-3} M (soit environ 20 à 300 mg.l⁻¹). Depuis, quelques études *in vitro* ont confirmé le pouvoir inhibiteur de cette molécule vis à vis des ChE. Par exemple, Alcaro *et al.* (2007) rapportent des CI_{50} de 8 x 10^{-6} M (soit environ 2 mg.l⁻¹) pour l'AChE de l'anguille électrique et de 10^{-3} M (soit environ 2 g.l⁻¹) pour la BChE plasmatique humaine. La faculté du paraquat à inhiber l'AChE peut s'expliquer par le fait que les ammoniums quaternaires présentent une certaine affinité pour le site actif des cholinestérases (vu dans Bocquené, 1996).

Les hydrocarbures et surfactants

Les **surfactants** sont largement utilisés, que ce soit dans la vie de tous les jours pour les soins corporels ou dans les produits ménagés, ou dans le cadre d'applications industrielles. De grandes quantités de surfactants ainsi que leurs produits de dégradations sont déversés dans le milieu naturel, directement ou par l'intermédiaire des stations d'épuration.

Quelques travaux récents montrent que ces composés peuvent causer des inhibitions (Guilhermino *et al.*, 2000; Li, 2008b, a) ou des inductions (Matozzo *et al.*, 2006; Li, 2008a) de l'activité ChE, *in vitro* et *in vivo*, chez des organismes aquatiques (poissons et invertébrés). Ces effets ont été généralement observés pour des quantités de produit supérieures à 0.1 mg.l⁻¹; des concentrations très importantes qui peuvent toutefois être observées en milieu naturel dans certaines conditions (*e.g.* rejet de station d'épuration) (Ying, 2006).

Les **hydrocarbures** figurent également parmi les contaminants pouvant induire une inhibition des ChE, mais ceci, à des concentrations élevées. Cependant très peu de données sont disponibles. Les effets *in vitro* de quelques d'hydrocarbures polycycliques sur l'AChE de l'anguille électrique et l'AChE humaine sont données dans le *Tableau I-4*.

	Anguille électrique	Humain
Anthracene	3.85 ± 0.42	2.28 ± 0.14
Benzo(a)pyrene	$2.67~\pm~0.34$	$2.07~\pm~0.25$
Chrysene	$2.40~\pm~0.04$	
Fluoranthene	$4.68~\pm~0.21$	$3.44~\pm~0.1$
Nitropyrene	$3.05~\pm~0.40$	
Pyrene	$5.22~\pm~0.38$	$2.31\ \pm\ 0.28$

Tableau I-4 : Concentrations de demi-inhibition (CI_{50} ; en $\mu g. \Gamma^1$) in vitro de quelques hydrocarbures aromatiques polycycliques vis à vis de l'AChE de l'anguille électrique (Kang et Fang, 1997) et de l'AChE humaine (Jett et al., 1999).

Les valeurs sont exprimées comme des moyennes \pm S.E.M.

Zhang *et al.* (2008) montrent des inhibitions de ChE chez le ver polychète *Perinerieis aibuhitensis* exposé *in vivo* à des concentrations comprises entre 50 μ l et 200 μ l d'hydrocarbures par litre d'eau. Des inhibitions significatives de l'AChE ont également été observées chez des moules et des oiseaux marins touchés par des marées noires (Moreira *et al.*, 2004; Oropesa *et al.*, 2007).

1.3. Applications des cholinestérases en tant que biomarqueurs dans le milieu naturel

L'inhibition des cholinestérases (ChE) a été, initialement, utilisée en toxicologie humaine comme un outil de diagnostic spécifique des intoxications accidentelles et/ou volontaires par les insecticides organophosphorés (OP) et carbamates (Cb). Dérivées de ces applications médicales, l'inhibition des ChE a, par la suite, largement été utilisée comme un biomarqueur d'exposition de la faune aquatique aux OP et Cb (*e.g.* Burgeot *et al.*, 1996; Escartin et Porte, 1996; Radenac *et al.*, 1998). Plus récemment, le caractère spécifique de l'AChE vis à vis des OP et Cb a été remis en question. En effet, plusieurs travaux montrent que d'autres types de contaminants tels que les métaux, surfactants, hydrocarbures (voir section I.1.2.2) ainsi que certains composés présents dans des mixtures complexes (*e.g.* effluents de stations d'épuration) (Payne *et al.*, 1996; Gagné et Blaise, 2004; Gagné *et al.*, 2007) sont capables d'inhiber les ChE. Cependant, le pouvoir inhibiteur de ces composés est nettement inférieur à celui des OP et Cb, ainsi des inhibitions non spécifiques dues à de tels composés ne pourraient être envisagées en milieu naturel que sur des sites fortement contaminés.

1.3.1. Les organismes utilisés en milieu aquatique

L'application *in situ* des ChE en tant que biomarqueur a essentiellement été réalisée chez les mollusques bivalves et les poissons, le milieu marin ayant reçu d'avantage d'attention que le milieu dulçaquicole. Malgré leur pertinence écologique et leur forte sensibilité vis à vis des composés anti-ChE, les crustacés ont largement été délaissés. Seules quelques études font référence à l'application *in situ* de la mesure d'activité ChE chez des crustacés marins, estuariens (Forget *et al.*, 2003; Key *et al.*, 2003; Quintaneiro *et al.*, 2006) et d'eau douce (Barata *et al.*, 2007; Vioque-Fernández *et al.*, 2007). D'autres taxons d'invertébrés marins, tels que les échinodermes (den Besten *et al.*, 2001a; den Besten *et al.*, 2001b; Cunha *et al.*, 2005), les polychètes (Maycock *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2004; Ait Alla *et al.*, 2006; Durou *et al.*, 2007) ont également fait l'objet d'investigations de terrain.

1.3.2. Les artéfacts d'interprétation de la mesure des cholinestérases

L'utilisation d'un biomarqueur dans le milieu naturel nécessite d'avoir une connaissance détaillée de son niveau de base, ainsi que des facteurs susceptibles de le faire varier en l'absence de toxique. Une bonne maîtrise de ces facteurs facilite la compréhension des données et réduit les risques d'interprétations erronées. Ces facteurs de confusion peuvent être classés en trois grandes catégories : les facteurs méthodologiques, les facteurs biotiques intrinsèques et les facteurs environnementaux.

Dans cette partie de la synthèse, nous allons faire un point sur les principaux facteurs susceptibles d'influencer le niveau de base de l'activité ChE, chez les organismes aquatiques.

• Les facteurs méthodologiques

Le **traitement des échantillons** se déroule en plusieurs étapes. Chacune de ces étapes nécessite une attention particulière, si l'on veut s'assurer de la précision et de la robustesse de la procédure.

Le traitement des échantillons commence par le **prélèvement** et le **transport** des organismes. Ces étapes sont une source de stress pour les organismes pouvant engendrer des modifications physiologiques. Cependant, les quelques travaux qui se sont penchés sur la question, ne rapportent aucune répercussion du mode de prélèvement ou du transport sur l'activité ChE (Phillips *et al.*, 2002; Menezes *et al.*, 2006; Quintaneiro *et al.*, 2006).

La **conservation** des échantillons est un point critique puisque la dégradation enzymatique est fonction de la température et de la durée du stockage des échantillons. Le conditionnement des échantillons est considéré comme optimal dans l'azote liquide (-196 °C). Toutefois, des températures inférieures à -20 °C sont suffisantes pour assurer la préservation de l'activité enzymatique durant plusieurs mois (Mora, 1998; Phillips *et al.*, 2002; Pathiratne *et al.*, 2008). En revanche, chez les organismes exposés aux carbamates, une conservation prolongée peut occasionner une réactivation des ChE, et masquer une éventuelle inhibition (Pathiratne *et al.*, 2008).

Les procédures d'**extraction** et de **dosage** comportent un certain nombre de paramètres qui peuvent influencer la mesure de l'activité enzymatique, tels que le poids de tissus homogénéisés, l'énergie et le temps d'homogénéisation, la vitesse et le temps de centrifugation, le pH et la force ionique des tampons utilisés, la concentration en substrat, le type de substrat et la température à laquelle est réalisé l'essai (Bocquene *et al.*, 1990; Mora, 1998). Il est donc essentiel de définir des protocoles détaillés et de les respecter scrupuleusement.

L'expression de l'activité peut également être considérée comme un point méthodologique important, à ne pas négliger.

En général, les activités enzymatiques sont normalisées par la quantité de protéines contenue dans le volume d'échantillon dosé. Basée sur l'hypothèse selon laquelle, dans un tissu, la fraction enzymatique est proportionnelle à la quantité totale de protéines, cette normalisation est conventionnellement utilisée pour corriger les éventuelles différences de rendement d'extraction.

Cependant, certains auteurs remettent en question l'intérêt de cette normalisation, et la présentent même comme une potentielle source d'erreur d'interprétation des marqueurs enzymatiques (Owen *et al.*, 2002; Jemec *et al.*, 2007). Plusieurs travaux réalisés chez des bivalves et le cladocère *Daphnia magna*, mettent en évidence une corrélation négative entre l'activité ChE et des variations de la teneur en protéines (liées à des changements physiologiques naturels ou induits par des contaminants) (Radenac *et al.*, 1998; Owen *et al.*, 2002; Printes et Callaghan, 2003; Lau *et al.*, 2004; Leinio et Lehtonen, 2005; Jemec *et al.*, 2007; Rank *et al.*, 2007).

Les facteurs biotiques intrinsèques

Parmi les variations du niveau de base d'une réponse biochimique telle que l'activité ChE, certaines ont pour origine l'hétérogénéité entre individus liée au statut physiologique tels que le sexe, l'âge ou la maturité sexuelle. On parle alors de facteurs biotiques intrinsèques.

L'âge et la taille sont des facteurs biotiques qui peuvent grandement influer sur l'activité ChE. Le *Tableau I-5* rapporte quelques données concernant l'impact de la taille ou de l'âge sur l'activité ChE chez des organismes aquatiques. Chez les poissons et les crustacés, des corrélations négatives entre la taille ou l'âge, et l'activité ChE sont observées dans la majorité des cas, excepté durant les stades larvaires pour lesquels la tendance est inversée.

Peu de données concernant l'impact du sexe sur l'activité ChE sont disponibles dans la littérature. Ce paramètre ne semble pas influencer le niveau de base de cette activité enzymatique, du moins chez les espèces de poissons et de crustacés étudiées (*Tab. I-6*). En effet, dans l'état actuel des connaissances, seuls Rodriguez-Fuentes *et al.* (2002) observent une activité ChE plus élevée chez les femelles en comparaison aux mâles, chez la sole *Pleuronichthys verticalis*.

	er monnsquesi				
Esp	bèces	Tissus	Corrélation	Normalisation	Références
<u>Mollus que s</u>					
Mytilus edulis	(Adultes)	Corps entier	Positive	Protéines	Radenac et al., 1998
<u>Crustacés</u>					
Tigriopus brevicornis	(Juvéniles et adultes)	Corps entier	Négative	Protéines	Forget et al., 1998
Daphnia magna	(Juvéniles et adultes)	Corps entier	Négative	Protéines	Printes et Callaghan, 2003
Nephrops norvegicus	(Adultes)	Muscle	Acune	Protéines	Solé et al., 2006
Palaemonetes pugio	(Stades larvaires)	Corps entier	Positive	Protéines	Hoguet et Key, 2007
	(Juvéniles et adultes)	Corps entier	Négative	Protéines	Hoguet et Key, 2007
Poissons					
Callionymus lyra	(Adultes)	Muscle	Négative	Protéines	Burgeot et al., 1996
Serranus cabrilla	(Adultes)	Muscle	Négative	Protéines	Burgeot et al., 1996
Mullus barbatus	(Adultes)	Muscle	Négative	Protéines	Burgeot et al., 1996
Leuciscus cephalus	(Adultes)	Muscle	Négative	Protéines	Flammarion et al., 2002
Stizostedion vitreum	(Stades larvaires)	Corps entier	Positive	Poids de tissus	Phillips et al., 2002
	(Juvéniles)	Cerveau	Négative	Poids de tissus	Phillips et al., 2002
Merluccius merluccius	(Adultes)	Muscle	Négative	Protéines	Solé et al., 2006
Oreochromis niloticus	(Juvéniles et adultes)	Muscle et cerveau	Négative	Protéines	Pathiratne et al., 2008
Pleuronectes vetulus	(Adultes)	Muscle	Négative	Protéines	Rodriguez-Fuentes et al., 2008
Pleuronichthys verticalis	(Adultes)	Muscle	Acune	Protéines	Rodriguez-Fuentes et al., 2008

 Tableau I-5 : Relations entre la taille ou l'âge, et l'activité ChE basale chez quelques espèces de poissons, crustacés et mollusques.

Quoi qu'il en soit, l'activité ChE est normalisée par la concentration en protéines dans la plupart des travaux cités. Il est, de ce fait, difficile de déterminer avec précision si des facteurs intrinsèques tels que la taille, l'âge ou le sexe ont un impact direct sur les niveaux de base d'activité ChE, ou si les différences observées sont un effet indirect dû aux variations de la fraction protéique totale dans les échantillons analysés. Par exemple, Radenac *et al.* (1998) observent, chez la moule *Mytilus edulis*, une corrélation positive entre l'activité AChE du corps entier et l'âge qu'ils attribuent à une diminution de la fraction protéique totale durant le développement et la croissance de l'organisme.

Espèces	Tissus	Effet du sexe	Normalisation	Références
Crustacés				
Tigriopus brevicornis	Corps entier	Aucun	Protéines	Forget, 1998
Nephrops norvegicus	Muscle	Aucun	Protéines	Solé et al., 2006
Poissons				
Salmo trutta	Cerveau	Aucun	Poids de tissus	Payne et al., 1994
Leuciscus cephalus	Muscle	Aucun	Protéines	Flammarion et al., 2002
Merluccius merluccius	Muscle	Aucun	Protéines	Solé et al., 2006
Oreochromis niloticus	Muscle et cerveau	Aucun	Protéines	Pathiratne et al., 2008
Pleuronectes vetulus	Muscle	Aucun	Protéines	Rodriguez-Fuentes et al., 2008
Pleuronichthys verticalis	Muscle	Femelles > Mâles	Protéines	Rodriguez-Fuentes et al., 2008

Tableau I-6 : Influence du sexe sur l'activité ChE basale, chez quelques organismes aquatiques.

• Les facteurs environnementaux

Les modifications spatio-temporelles des paramètres environnementaux (*e.g.* caractéristiques physico-chimiques du biotope) exercent des pressions sur les organismes qui peuvent entraîner des changements physiologiques importants.

La **température** du milieu est considérée par certains auteurs comme l'un des facteurs abiotiques le plus à même d'influer sur le niveau de base de l'activité ChE chez les organismes aquatiques (Bocquené et Galgani, 1998).

En ce qui concerne les poissons, Baslow et Nigrelli (1964) montrent que l'activité AChE du cerveau de *Fundulus heteroclitus* est inversement reliée à la température, alors que Hogan (1970) observe une corrélation positive entre l'activité AChE du cerveau de *Lepomis macrochirus* et la température. En revanche, aucun effet de la température sur l'activité AChE du cerveau de *Stizostedion vitreum* n'a été rapporté par Phillips *et al.* (2006).

L'effet de la température sur l'activité de base des ChE chez les invertébrés aquatiques a été étudié chez seulement quatre espèces. Chez *Nereis diversicolor*, Scaps et Borot (2000), observent une diminution de l'activité ChE quand la température augmente. Menezes *et al.* (2006) observent une activité AChE plus faible chez les crevettes *Crangon crangon* exposées à 9 °C comparativement aux organismes maintenus à 20 et 25 °C. Chez le copépode *Eurytemora affinis*, Cailleaud *et al.* (2007) rapportent une activité AChE maximum pour une température de 11 °C, en comparaison aux organismes exposés à 4, 18 et 21 °C. De la même manière, Riccardi *et al.* (2006) observent chez la moule *Dreissena polymorpha* une corrélation parabolique entre l'activité AChE et la température (*i.e.* 5-30 °C), avec une température optimum de l'ordre de 20 °C.

Ainsi, il semble n'y avoir aucune tendance généralisable. L'action de la température sur l'activité ChE diffère en fonction de l'espèce considérée.

D'autres paramètres physico-chimiques de l'eau tels que le pH ou la salinité, sont également susceptibles d'affecter l'activité ChE des invertébrés aquatiques (Scaps et Borot, 2000; Robillard *et al.*, 2003; Pfeifer *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2006; Cailleaud *et al.*, 2007). En revanche, aucune donnée relative à l'influence de la photopériode, des rythmes circadiens ou des facteurs nutritionnels sur l'activité ChE des organismes aquatiques n'a été publiée.

Les variations saisonnières peuvent être considérées comme la résultante des effets combinés de tous les facteurs environnementaux, tels que les facteurs abiotiques vus précédemment et certains autres facteurs comme la reproduction, la compétition, la prédation ou le régime alimentaire.

De nombreux auteurs rapportent des variations saisonnières de l'activité ChE chez les organismes aquatiques. Excepté les travaux de Forget *et al.* (2003) chez les copépodes *Tigriopus brevicornis*, de Cunha *et al.* (2005) chez l'oursin *Paracentrotus lividus* et d'Ait Alla *et al.* (2006) chez le polychète *Nereis diversicolor*, les données rapportées chez les invertébrés concernent exclusivement des espèces de mollusques bivalves (Owen *et al.*, 2002; Robillard *et al.*, 2003; Leinio et Lehtonen, 2005; Matozzo *et al.*, 2005; Moreira et Guilhermino, 2005; Pfeifer *et al.*, 2005; Bocchetti *et al.*, 2008). L'amplitude maximale de ces variations est généralement comprise entre 150 et 300 %, pouvant atteindre 900 % chez *Nereis diversicolor*. Les profils annuels de variation diffèrent en fonction des espèces étudiées, ainsi que de l'aire géographique considérée.

Toutefois, il est nécessaire de souligner, ici encore, que dans toutes ces études, les activités ChE sont normalisées par la quantité de protéines. Il est donc difficile de savoir si les variations saisonnières observées sont réellement dues à une fluctuation de la fraction enzymatique, ou si elles résultent d'un changement de la quantité totale des protéines contenue dans les tissus. Par exemple, chez les bivalves, les variations annuelles d'activité ChE peuvent s'expliquer par des changements de la concentration en protéines dans les tissus (*e.g.* branchies, muscles ou corps entier) durant les phases de croissance ou de reproduction (Radenac *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2004; Leinio et Lehtonen, 2005).

1.3.3. Méthode d'utilisation des cholinestérases comme biomarqueur dans le milieu

Dans l'absolu, la réponse d'un biomarqueur devrait être interprétée par rapport à une valeur de référence (*i.e.* ligne de base) prenant en compte sa variabilité naturelle. Cependant, la non-maitrise de l'impact des différents facteurs abiotiques et biotiques sur la variabilité naturelle de l'activité ChE a contraint son utilisation comme biomarqueur d'exposition dans le milieu naturel. De ce fait, son application *in situ* repose sur deux principales approches qui consistent à (*i*) comparer des niveaux d'activité entre un site de référence et les sites étudiés, ou (*ii*) examiner, chez des organismes prélevés sur les sites d'intérêt, la présence d'une récupération de l'activité enzymatique après traitement au laboratoire.

La comparaison de valeurs mesurées sur un site dit 'de référence' (faiblement ou non contaminé) et des sites contaminés contraints à (*i*) s'assurer du faible niveau de pollution des sites de référence, (*ii*) s'assurer que les sites de référence présentent des caractéristiques écologiques proches des sites contaminés, (*iii*) prélever les organismes dans un intervalle de temps le plus court possible, et (*iv*) utiliser des organismes les plus homogènes possible (sexe, taille...).

L'activité ChE peut être mesurée sur des organismes autochtones (*e.g.* Forget *et al.*, 2003 ; Key *et al.*, 2003 ; Quintaneiro *et al.*, 2006). Dans ce cas, malgré les précautions d'emploi citées précédemment, des divergences inter-populations peuvent subsister. La transplantation d'organismes peut alors être un moyen de remédier au problème d'hétérogénéité des populations (*e.g.* Barata *et al.*, 2007). Cette méthode consiste à répartir, dans des systèmes d'exposition *in situ* (*e.g.* des cages), des organismes provenant d'une seule et même population. Toutefois, la transplantation n'est pas adaptable à tous les organismes aquatiques, elle augmente sensiblement le coût des biomarqueurs et ne permet pas de s'affranchir totalement de l'influence des facteurs environnementaux.

Des approches alternatives basées sur l'étude de la récupération de l'activité enzymatique ont été proposées comme une possibilité alternative pour montrer une inhibition des ChE, notamment lorsqu' il est difficile de trouver un site de référence valable (*i.e.* non-contaminé, avec des caractéristiques écologiques proches des autres sites étudiés).

Par exemple, une activité ChE inhibée par un inhibiteur spécifique (*i.e.* organophosphoré ou carbamate) peut être entièrement restaurée, *in vitro*, par traitement avec

certains réactifs nucléophiliques, tels que la pyridine 2-aldoxime méthiodide (2-PAM) (Escartin et Porte, 1996). Cette procédure permet de discriminer clairement l'effet du contaminant de l'influence de facteurs non toxiques. Cependant, l'efficacité de ces réactifs de réactivation sur des ChE inhibées par des inhibiteurs non-spécifiques (*e.g.* métaux, surfactants, hydrocarbures) n'a pas été étudiée.

Une autre solution consiste à suivre la récupération spontanée de l'activité ChE, *in vivo*, en milieu non-contaminé, chez des organismes rapportés en laboratoire (Forget *et al.*, 2003). L'obtention d'un même niveau d'activité pour tous les sites, après récupération, indique que les différences préalablement observées n'étaient pas dues à des variations interpopulations. En revanche, cette approche ne permet pas de discerner distinctement la différence entre une récupération de l'activité ChE suite à la disparition du contaminant, et les fluctuations pouvant être occasionnées par le changement d'environnement (*i.e.* transfert du milieu naturel au laboratoire). De plus, la récupération spontanée peut nécessiter des durées relativement longues pour restaurer l'activité de base (*e.g.* de l'ordre d'un mois ou plus, dans le cas d'une inhibition par des organophosphorés ; voir section I.1.2.2).

1.4. Interprétation des variations de l'activité des cholinestérases en terme d'effets

Les cholinestérases (ChE) ne présentent pas seulement un intérêt en tant que marqueur d'exposition. De par leur rôle clé au sein du système nerveux, ces enzymes présentent également un intérêt en tant marqueur d'effets neurotoxiques (voir section I.1.1).

1.4.1. Relation entre inhibition des cholinestérases et mortalité

De nombreuses études ont examiné la relation entre l'inhibition d'AChE et la survie. Cependant, la majorité de ces travaux s'est focalisées sur des inhibitions induites par des insecticides organophosphorés.

Chez les poissons, bien que quelques rares espèces semblent présenter une certaine tolérance, une inhibition de 70-80 % de l'AChE cérébrale coïncide avec l'apparition de mortalité à brève échéance (revu par Fulton et Key, 2001). En revanche, cette revue met clairement en évidence que des différences peuvent exister dans la relation entre la mortalité

et l'inhibition de l'AChE dans le cerveau ou le muscle, en fonction de l'âge des organismes et/ou de l'espèce considérée.

Chez les invertébrés aquatiques, la relation entre l'inhibition de l'activité ChE et la mortalité est plus difficile à cerner. En effet, des niveaux d'inhibition supérieurs à 80 %, sans aucun effet sur la survie, ont été observés chez différents groupes tels que les crustacés (*e.g.* Varo *et al.*, 2002; Printes et Callaghan, 2004) et les mollusques (*e.g.* Cooper et Bidwell, 2006). De plus, Printes et Callaghan (2004) montrent que, chez *D. magna*, la relation entre l'inhibition d'AChE et la mortalité dépend du composé étudié. Ces auteurs rapportent, lorsque les animaux sont exposés durant 48 h aux OP, chlorpyrifos, malathion et parathion, ainsi qu'au carbamate propoxur, qu'une réduction de 50 % de l'activité AChE est associée à des effets délétères sur la survie, alors que l'OP acéphate induit des inhibitions supérieures à 70 % sans aucun effet pour l'organisme.

1.4.2. Relation entre inhibition des cholinestérases et effets sub-létaux

Les effets physiologiques et comportementaux résultant d'une inhibition des ChE méritent une attention particulière dans la mesure où ils peuvent affecter des paramètres en lien avec la *fitness* des organismes tels que la croissance ou la reproduction.

Les relations entre l'inhibition d'AChE et des effets sub-létaux, notamment des perturbations du comportement, ont largement été étudiées chez les poissons et, dans une bien moindre mesure, chez des invertébrés. D'une manière générale, les effets sub-létaux significatifs commencent à être observés pour des inhibitions atteignant 30-50 %. Signalons toutefois que, comme précédemment vu pour les relations entre AChE et mortalité, la majorité de ces travaux se sont focalisés sur des inhibitions induites par des insecticides organophosphorés.

Chez les poissons, l'inhibition d'AChE induit des modifications de la performance de nage (Van Dolah *et al.*, 1997; Kumar et Chapman, 1998; Beauvais *et al.*, 2000; Sismeiro-Vivas *et al.*, 2007), de la prise alimentaire (Kumar et Chapman, 1998; Castro *et al.*, 2004; Sismeiro-Vivas *et al.*, 2007), de la respiration (Klaverkamp *et al.*, 1977) et de la croissance (Kumar et Chapman, 1998).

Chez les invertébrés, la majorité des relations établies entre l'inhibition des ChE et des effets sub-létaux sont qualitatives. Ainsi, Cooper et Bidwell (2006) observent une forte

réduction de la capacité à s'enfouir dans le sédiment parallèlement à une inhibition de l'AChE chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea*. Différents degrés du trouble locomoteur reliés aux niveaux d'inhibition de l'AChE ont été rapportés chez l'oligochète dulçaquicole *Lumbricus variegatus* (Kristoff et al., 2006). Lundebye *et al.* (1997) observent une corrélation entre le pourcentage d'inhibition de l'activité AChE et le taux de réduction des battements cardiaques chez le crabe *Carcinus maenas*. Seules quelques relations quantitatives ont été établies entre l'inhibition de l'AChE et des altérations du comportement locomoteur chez le scarabée *Pterostichus cupreus* et le cloporte *Porcellio dilatatus* (Jensen *et al.*, 1997; Engenheiro *et al.*, 2005).

2. PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ LES INVERTEBRES

Le problème lié à la présence dans l'environnement de substances capables d'altérer le fonctionnement du système endocrinien, et par conséquent de perturber l'homéostasie, le développement, la reproduction et le comportement des organismes, a émergé au début des années 1990. Au cours de cette dernière décennie, cela est devenu une préoccupation scientifique majeure, non seulement en termes de santé publique, mais également vis à vis de l'impact de tels composés dans le milieu naturel, spécialement sur la faune des écosystèmes aquatiques. Depuis, de nombreux effets délétères ont été répertoriés, incluant, par exemple, l'intersexualité chez les poissons (Toppari *et al.*, 1996; Tyler *et al.*, 1998), des malformations de l'appareil reproducteur chez les reptiles (Guillette *et al.*, 1994; Guillette *et al.*, 1995), ou encore l'imposexe chez les mollusques gastéropodes (revu dans Oehlmann *et al.*, 2007).

Les substances à l'origine de ces perturbations biologiques sont communément désignées sous le terme de *perturbateurs endocriniens* (Colborn *et al.*, 1993) pour lesquelles l'Union Européenne (1999) a adopté la définition suivante : « *un perturbateur endocrinien* (*PE*) est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations ». Ces PE ont la capacité de moduler la régulation hormonale selon au moins 4 mécanismes d'action, en :

- inhibant ou stimulant la synthèse, la libération et/ou le transport des hormones,
- modulant le métabolisme des hormones afin d'augmenter ou diminuer leur élimination,
- interférant avec les récepteurs hormonaux *via* une action agoniste⁶ ou antagoniste⁷,
- modifiant la synthèse des récepteurs hormonaux.

De façon générale, les travaux concernant l'impact des PE sur la faune sauvage 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 disponibilité et de l'impact de ces composés sur les vertébrés aquatiques, en particulier le poisson, a fait l'objet de nombreux projets et publications (Matthiessen, 2003; Langston *et al.*,

⁶ Le composé mime l'action de l'hormone naturelle et déclenche une réponse physiologique similaire.

⁷ Le composé bloque l'accès au récepteur, empêchant le déclenchement de la réponse physiologique.

2005; Kidd *et al.*, 2007). Ces travaux ont conduit au développement d'outils de diagnostic (*i.e.* biomarqueurs) pouvant être utilisés *in situ*, tels que l'induction de la vitellogènine (Vtg) chez les mâles et les juvéniles, l'inhibition de la croissance testiculaire, le retard dans la maturité sexuelle, la présence d'individus intersexués, la féminisation ou la masculinisation des caractères sexuels secondaires et la concentration anormale en hormones stéroïdiennes circulantes (Matthiessen, 2003; Langston *et al.*, 2005).

En revanche, bien qu'ils représentent plus de 95 % des espèces animales et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, les invertébrés ont reçu une bien moindre attention, et par conséquent peu d'outils sont actuellement disponibles chez ces organismes pour diagnostiquer l'exposition ou les effets de PE (deFur et al., 1999; deFur, 2004; Oetken et al., 2004). Ce constat résulte en partie d'une mauvaise connaissance de leur système de régulation hormonale, ainsi que des processus liés à ces régulations (e.g. cycle de reproduction). En effet, les invertébrés sont répartis en plus de trente phylums différents. De cette richesse taxonomique résulte une énorme diversité de traits d'histoire de vie (croissance, développement, reproduction, stratégie de survie), marquée par une multiplicité des stratégies de régulation neuro-endocrine (LeBlanc et al., 1999). Ainsi, chez de nombreux invertébrés, la régulation de la reproduction repose sur des hormones très différentes de celles rencontrées chez les vertébrés (i.e. oestrogènes, androgènes) qui ne constituent qu'une partie du phylum des chordés. Par conséquent, dans un objectif d'évaluation des risques de composés et/ou de la qualité des milieux aquatiques, une classification ou priorisation de composés reconnus comme PE sur la base d'une évaluation portant sur les vertébrés semble peu extrapolable et protectrice pour de nombreuses espèces d'invertébrés aquatiques (LeBlanc, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007). Ceci montre et implique la nécessité de développer des outils de diagnostic (exposition et effet) spécifiques chez ces organismes.

Mes travaux de recherche bibliographique ont été principalement focalisés sur le groupe des crustacés auquel appartient mon sujet d'étude, *Gammarus fossarum*. Cette partie de la synthèse a pour objectif d'établir un bref bilan des connaissances relatives au contrôle hormonal de la reproduction, ainsi qu'à l'impact des perturbateurs endocriniens chez ces organismes.

2.1. Phylogénie et endocrinologie comparée des invertébrés

Le groupe des invertébrés est un groupe paraphylétique⁸ qui diverge très tôt au cours de l'évolution des métazoaires en 3 principaux clades. D'un côté, les **lophotrochozoaires** (*i.e.* mollusques, annélides et plathelminthes) et les **ecdysozoaires** (*i.e.* arthropodes et nématodes) forment la lignée des **protostomiens**. De l'autre, la lignée des **deutérostomiens** (*i.e.* chordés et échinodermes) inclut le groupe des vertébrés (*Fig. I-3*).



Figure I-3 : Représentation simplifiée du dernier modèle de l'arbre phylogénétique des métazoaires (d'après Markov et al., 2008).
 1R, 2R et 3R indiquent les évènements de duplication du génome survenus au cours de l'évolution des vertébrés.

Cette bifurcation évolutive se traduit par des divergences de stratégie de régulation endocrine. D'une manière générale, les deutérostomiens utilisent des hormones stéroïdes de « type-vertébré » (androgènes, œstrogènes, progestogènes) en terminaison de cascades neurohormonales afin de réguler la reproduction. Au sein des protostomiens, il semblerait que les lophotrochozoaires utilisent principalement des neuropeptides, alors que les ecdysozoaires se

⁸ qui ne regroupe qu'une partie des descendants d'un même ancêtre commun.

caractérisent par l'utilisation d'hormones ecdystéroïdes et terpénoïdes en terminaison de cascades neuro-hormonales.

Le clade des ecdysozoaires regroupe les organismes à squelette externe (*i.e.* cuticule), soit plus de 75 % des espèces animales connues, incluant les crustacés qui en sont les principaux représentants dans le milieu aquatique.

Le sous-phylum des crustacés est subdivisé en 5 grandes classes qui abritent une importante diversité de formes et de stratégies adaptatives (*Fig. I-4*). Ainsi, au sein même de ce groupe, des divergences de régulation endocrine entre taxons peuvent être suspectées.



Figure I-4 : Représentation simplifiée de la phylogénie et des principaux morphotypes des crustacés contemporains (adapté d'après LeBlanc, 2007).

2.2. Endocrinologie des crustacés

L'endocrinologie des crustacés a fait l'objet de plusieurs synthèses bibliographiques (*e.g.* Laufer et Downer, 1988; Fingerman, 1997; LeBlanc *et al.*, 1999; LeBlanc, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; Mazurová *et al.*, 2008). Cependant, la majeure partie de ces connaissances a été obtenue à partir d'expérimentations effectuées chez des espèces appartenant à la classe des malacostracés. Les décapodes (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.

Dans cette sous-partie, je me suis focalisé exclusivement sur la régulation des fonctions physiologiques qui présentent des liens directs avec la reproduction, à savoir : la **mue**, la **différenciation sexuelle** et la **gamétogénèse**. Je vous propose donc un bref état des lieux du rôle des principales hormones impliquées dans le contrôle de ces différentes fonctions physiologiques.

2.2.1. Fonctionnement et anatomie du système endocrinien

Classiquement, la régulation endocrine repose sur l'interaction entre le système nerveux et le système endocrine au travers de cascades hormonales impliquant des rétrocontrôles (positif ou négatif). Lorsqu'un stimulus physiologique ou environnemental est assimilé au niveau du système nerveux central, des neurotransmetteurs et neuromodulateurs régulent la sécrétion de neuro-hormones dans les voies circulatoires. Ces neuro-hormones régulent à leur tour la synthèse d'hormones au niveau de glandes endocrines, 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 ; c'est ce que l'on appelle communément la balance hormonale.

Chez les crustacés, au moins quatre classes d'hormones et neuro-hormones – stéroïdes, terpénoïdes, peptides et amines – sont impliquées dans la régulation de la différenciation sexuelle, du développement, de la croissance, de la mue et de la gamétogénèse,

au travers de mécanismes très complexes. Quatre principaux sites ont été identifiés comme étant impliqués dans la régulation hormonale chez ces organismes (*Figure I-5*).



Figure 1-5 : Schéma d'une vue latérale d'amphipode indiquant la position approximative des principaux centres de la régulation endocrinienne.
c. : cerveau ; c.d. : canal déférent ; md. : mandibule ; om. : ommatidies ; ts : testicule ; v.s. : vésicule séminale.

Le complexe 'organe X / glande du sinus' (OX/GS) est le centre de contrôle neuroendocrine. Il est localisé dans les pédoncules oculaires chez les décapodes. Chez les taxons de crustacés qui possèdent des yeux sessiles tels que les amphipodes, il semblerait que le complexe OX/GS soit positionné en périphérie du cerveau sur le pourtour des lobes optiques (Blanchet-Tournier, 1980 et littérature associée). Le complexe OX/GS est le site de synthèse et de diffusion dans le système circulatoire de **neurohormones** peptidiques telles que la famille des hormones hyperglycémiantes (CHH : **Crustacean Hyperglycemic Hormone**) (Cooke et Sullivan, 1982; Fingerman, 1992; Van Herp, 1998). L'OX est formé de groupes de cellules neuro-sécrétrices (corps cellulaires) dont les terminaisons axonales se regroupent au niveau d'un organe neurohémal adjacent à de grandes lacunes hémolymphatiques, la GS (Hanström, 1926). Le complexe OX/GS constitue l'équivalent fonctionnel du complexe 'cellules neurosécrétrices / corp cardiaque' des insectes ou encore de l'axe hypothalamo-neurohypophysaire des vertébrés.

L'organe Y (OY) est une paire de glandes localisées dans les segments maxillaires. Cet organe est l'équivalent des glandes de mue prothoraciques des insectes (revu par Lachaise *et al.*, 1993). Il synthétise des hormones stéroïdes, de type ecdystéroïdes. L'ecdysone (*Fig. I-6*), communément surnommée l'hormone de mue, est la principale forme d'ecdystéroïdes présente chez les arthropodes. Cette hormone régule les phénomènes relatifs à la mue chez les crustacés comme chez les insectes. L'OY des crustacés secrète également d'autres types d'ecdystéroïdes telles que la 3-dehydroecdysone et la 25-deoxyecdysone dont le rôle reste encore à déterminer (revu par Lachaise et al., 1993).



Figure I-6 : Structure chimique de la 20-hydroecdysone

L'organe mandibulaire (OM) est 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. La position de ces glandes chez les crustacés non-décapodes n'a pas été clairement établie. L'OM synthétise le méthyle farnésoate (MF) (Laufer *et al.*, 1987), une hormone sesqueterpénoïde similaire à l'hormone juvénile des insectes qui est impliquée dans le contrôle de la métamorphose durant les mues de développement (*Fig. I-7*). Le rôle du MF sera abordé plus en détail dans la suite de cette synthèse.



Figure I-7 : Structure chimique du méthyle farnésoate

Les glandes androgènes (GA), attachées à la région sub-terminale des canaux déférents des testicules, ne sont présentes que chez les organismes mâles. Elles sont à l'origine de la synthèse de l'hormone androgène (HA), une hormone peptidique qui est responsable de la différentiation sexuelle des individus génétiquement mâles chez les crustacés malacostracés (Charniaux-Cotton, 1954a, 1965; Laufer et al., 1987). Les femelles ne possèdent que des structures vestigiales de la GA (*i.e.* tissus mésenchimatiques

indifférenciés). A l'heure actuelle, la présence de ces glandes n'a pas été caractérisée chez les crustacés non-malacostracés.

2.2.2. Régulation hormonale de la mue

Les arthropodes possèdent un exosquelette rigide (*i.e.* la cuticule) dont ils doivent régulièrement se défaire afin de pouvoir croître et se reproduire. Ces organismes ont donc un développement et une croissance discontinus, rythmés 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 par Drach (1939), comme une série de transformations réalisées dans un intervalle de temps qui sépare deux mues. Trois grandes étapes peuvent être distinguées :

- La postmue est une période durant laquelle l'organisme qui a fraîchement mué croit, avant d'augmenter la rigidité de sa cuticule (*i.e.* calcification dans le cas des crustacés) qui n'est alors composée que d'une matrice de chitine flexible et transparente.
- L'intermue correspond à période de stabilité tégumentaire.
- La prémue débute par la séparation entre l'épiderme et l'ancienne cuticule ; c'est l'apolyse. L'organisme sécrète ensuite une nouvelle cuticule afin de remplacer l'ancienne.

Le cycle d'inter-mue occupe une place très importante dans la reproduction de la plupart des groupes de crustacés et particulièrement chez les Péracarides (*e.g.* amphipodes). Chez ces derniers, l'intégralité du développement embryo-larvaire (*i.e.* jusqu'au stade juvénile) se déroule dans une poche incubatrice, ce qui nécessite un synchronisme parfait entre le cycle d'inter-mue et le cycle de reproduction. En effet, il est impossible pour une femelle de mener l'incubation de ces œufs à terme si elle doit muer entre temps.

La *Figure I-8* propose un schéma récapitulatif des cascades hormonales mises en œuvre dans le cadre du contrôle endocrine de la mue.



Figure I-8 : Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule les processus de la mue chez les crustacés Malacostracés.

(+) indique un contrôle positif, (-) un contrôle négatif et (?) une action non déterminée. MIH : hormone inhibitrice de la mue ; MOIH : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire ; MF : méthyle farnésoate ; SNC : système nerveux central ; 20HE : 20-hydroxyecdysone.

Comme précédemment cité (voir section I.2.2.1), chez les arthropodes, le cycle d'inter-mue est sous le contrôle direct de l'ecdysone, une hormone ecdystéroïde sécrétée par OY (revu par Lachaise et al., 1993). Après sa libération dans l'hémolymphe, l'ecdysone est hydrolysée en **20-hydroxyecdysone** (20HE) qui est la forme active chez les crustacés comme chez les insectes (*Fig. I-6*). Le niveau de 20 HE hémolymphatique augmente durant les premières phases de la prémue, initiant les processus de préparation à la mue (*i.e.* **apolyse** et **sécrétion de la nouvelle cuticule**), puis diminue brusquement avant l'exuviation. Il a été montré chez les décapodes, amphipodes et isopodes que l'ablation ou la cautérisation de l'OY bloque les organismes en phase d'intermue. A l'inverse, l'injection 20HE chez des organismes en période de postmue ou d'intermue déclenche une exuviation précoce. En revanche, l'injection de 20HE, chez des organismes en fin de prémue, retarde 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 : **Moult-Inhibiting Hormone**) (revu par Lachaise et al., 1993). La concentration de MIH circulante reste constante au cours du cycle d'inter-mue, excepté un fort déclin durant les premières phases de la prémue (Nakatsuji et Sonobe, 2004) impliquant l'augmentation de 20HE. L'ablation des pédoncules oculaires chez les décapodes ou la cautérisation de la partie médiane du proptocérébron (*i.e.* équivalent de l'OX des décapodes) chez les isopodes, induit une augmentation du niveau d'ecdystéroïdes hémolymphatique entrainant 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).

Toutefois, des travaux, bien que controversés, suggèrent l'existence d'une neurohormone stimulatrice la YSH (*i.e.* **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 20HE. En effet, quelques auteurs ont constaté que la destruction de la partie médiane du proptocérébron se traduisait chez certaines espèces d'amphipodes et d'isopodes, par un allongement du cycle d'inter mue (Blanchet-Tournier, 1980 et littérature associée).

Plusieurs éléments tendent à prouver que le cycle d'inter-mue est également sous le contrôle positif de l'OM chez certains crustacés (revu par Homola et Chang, 1997; Nagaraju *et al.*, 2003). En effet, il a été montré, sur des cultures *in vitro* d'exmplants d'OY que l'administration de **méthyle farnésoate** (MF) induit la sécrétion d'ecdysone. A l'instar de l'ecdysone, les niveaux hémolymphatiques de MF fluctuent durant le cycle d'inter-mue. Les concentrations maximales sont généralement enregistrées durant les premières phases de la prémue, précédant le pic d'ecdystéroïde. Les niveaux les plus bas coïncident avec les derniers stades de prémue peu avant l'exuviation. L'administration de MF entraîne une accélération des phénomènes de mue chez un grand nombre d'espèces. 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 américanus*, l'ablation de l'organe mandibulaire semble ne pas avoir de répercutions sur le bon déroulement du cycle d'inter-mue (Byard, 1975).

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 : **Mandibular Organe-Inhibiting Hormon**) (revu par Homola et Chang, 1997; Nagaraju *et al.*, 2003). Cependant, les fluctuations des concentrations *in vivo* de MOIH circulante restent à étudier.

2.2.3. Régulation hormonale de la différenciation sexuelle et la gamétogénèse

La *Figure I-9* propose un schéma récapitulatif des cascades hormonales mises en œuvre dans le cadre du contrôle endocrine de la différenciation sexuelle et la gamétogénèse (détaillées ci-après).



Figure I-9 : Schéma simplifié de la cascade hormonale qui régule la différenciation et la gamétogénèse chez les crustacés malacostracés femelles (A) et mâles (B).

(+) indique un contrôle positif, (-) un contrôle négatif et (?) une action non déterminée. AGH : hormone androgène ; GIH : hormone gonado-inhibitrice ; GSH : hormone gonado-stimulatrice ; MF : méthyle farnésoate ; MIH : hormone inhibitrice de la mue ; MOIH : hormone inhibitrice de l'organe mandibulaire ; OH : hormone ovarienne ; SNC : système nerveux central ; VSOH : hormone ovarienne stimulatrice de la vitellogénèse ; 20HE : 20-hydroxyecdysone.

• La différenciation des caractères sexuels primaires et secondaires

Les crustacés malacostracés sont généralement gonochoriques. A l'issue du développement embryo-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 et Payen, 1988) a été étudié pour la première fois chez l'amphipode *Orchiestia gamarella* (Charniaux-Cotton, 1954b, a, 1955). A l'origine de la différenciation sexuelle se trouve un organe clef, la **glande androgène** (GA).

Chez les **femelles**, en l'absence de GA, les gonades se différencient spontanément en ovaire. 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 : **Ovarian Hormone**) 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'a pas été déterminée.

Chez les **organismes génétiquement mâles**, la GA se développe et se maintient sous l'action positive d'une neuro-hormone gonado-stimulatrice (GSH- \mathcal{J} : **Gonado-Stimulating Hormone**), également appelée **hormone "génitalotropique mâle**", sécrétée au niveau du proptocérébron. La GA libère une hormone peptidique, appelée l'hormone androgène (AGH : **Androgénique Glande Hormone**) qui induit la différentiation du testicule ainsi que des caractères sexuels secondaires mâles et réprime la synthèse de vitellogènine. L'ablation des GA chez les mâles adultes provoque l'arrêt de la spermatogenèse, stoppe la différentiation des caractères sexuels secondaires, et induit l'apparition d'ovocytes prévitellogéniques⁹. Certains auteurs rapportent même la synthèse de vitellogénine chez des mâles décapodes privés de GA (Abdu *et al.*, 2002; Sagi et Aflalo, 2005; Barki *et al.*, 2006). L'ablation de la région médiane du protocérébron chez des mâles adultes conduit, quant à elle, à la dégénérescence de la zone germinative du testicule, de l'épithélium du canal déférent et de la glande androgène. A

⁹ Ovocytes primaires, bloqués en prophase I de la méiose.

l'inverse, l'implantation de GA chez les femelles provoque leur masculinisation. Les femelles acquièrent alors un phénotype et dans certains cas un comportement de mâle (Charniaux-Cotton, 1965; Barki *et al.*, 2006). La vitellogénèse secondaire est interrompue et les ovaires se transforment en testicules fonctionnels. Lorsque la femelle est suffisamment jeune, la transplantation peut même conduire à la formation d'un canal déférent et d'une glande androgène fonctionnelle.

Certains éléments suggèrent que les **sesqueterpénoïdes** pourraient également être impliqués dans les mécanismes de différentiation sexuelle. Chez les crabes araignées (*Libinia emarginata*) l'organe mandibulaire est plus développé et synthétise d'avantage de **méthyle farnésoate** (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 pouvait induire le développement des testicules (Nagaraju *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2004). En outre, Férézou *et al.* (1978) ont rapporté que la GA du crabe *Carcinus maenas* est capable de synthétiser des sesqueterpénoïdes - le farnesylacétone et l'hexahydrofarnésylacétone - dont la structure est très proche de celle du MF. Enfin, plusieurs auteurs ont montré que, chez différentes espèces de daphnies (*i.e.* branchiopodes), l'exposition de femelles au MF ou des composés analogues, durant leur dernière phase de maturation ovarienne, entraine une production anormale de jeunes mâles et favorise l'apparition de gynandromorphisme, contrairement aux organismes non traités qui ne produisaient que des femelles (Olmstead et LeBlanc, 2001b; Olmstead et LeBlanc, 2002, 2003; Tatarazako *et al.*, 2003; Rider *et al.*, 2005; Olmstead et LeBlanc, 2007).

La gamétogénèse

Chez les **femelles** Malacostracés, l'ovogénèse se déroule en deux étapes : la **prévitellogénèse** et la **vitellogénèse secondaire** (Charniaux-Cotton, 1973). La prévitellogénèse, également appelée vitellogénèse 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 vitellogénèse 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 vitelline¹⁰, une caroténo-lipo-protéine, est la composante majeure du vitellus.

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

En fonction des conditions environnementales, la libération de **neuropeptides** stimulateurs ou inhibiteurs contrôle le démarrage de la vitellogénèse. Durant les périodes de repos sexuel, celle-ci est inhibée par une neuro-hormone gonado-inhibitrice, la GIH (*i.e.* Gonado-Inhibiting Hormone), également dénommée VIH (*i.e.* Vitellogenesis-Inhibiting Hormone). La GIH, synthétisée par le complexe OX / GS, inhibe la synthèse de vitellogénine (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 et Payen, 1988). A l'inverse, certaines études menées chez les décapodes suggèrent l'existence d'une neuro-hormone gonado-stimulatrice (*i.e.* GSH : Gonado-Stimuling Hormone) produite par le ganglion thoracique qui initierait la vitellogénèse.

Il n'a pas été encore bien établi si les neuro-hormones exerçaient un contrôle direct et/ou indirect sur les processus de vitellogénèse. Chez les amphipodes, tout porte à croire que ce contrôle s'effectue par le biais d'une **hormone ovarienne** stimulatrice de la vitellogénèse (*i.e.* la VSOH : **Vitellogenin-Stimulating Ovariane Hormone**) (Charniaux-Cotton, 1954b). En effet, chez *Orchestia gammarella* l'ablation des ovaires lors de la vitellogenèse secondaire provoque un arrêt de synthèse de vitellogénine après quelques jours. Chez ces mêmes femelles, la synthèse de vitellogénine est restaurée par la réimplantation d'un ovaire en vitellogénèse secondaire. Toutefois, la VSOH pourrait être une spécificité des amphipodes car le contrôle hormonal de la synthèse de vitellogènine par l'ovaire n'a pas été caractérisé chez les décapodes. En revanche, chez les décapodes, le méthyle farnésoate (MF) a clairement été caractérisé comme une hormone stimulatrice de la synthèse de vitellogènine et de la maturation ovarienne (revu par Nagaraju *et al.*, 2003). Ainsi, il a été montré (*i*) que l'organe mandibulaire est plus actif et sécrète plus MF durant le développement et la

¹⁰ Chez les amphipodes et les isopodes, le précurseur de la vitelline (*i.e.* la vitellogènine) est synthétisé au niveau des tissus adipeux sub-épidermiques, alors que chez les Décapodes sa synthèse pourrait avoir lieu au niveau de l'hépatopancréas et/ou de l'ovaire, en fonction des espèces.

maturation des ovaires, (*ii*) que l'implantation d'organe mandibulaire de femelles sexuellement actives, stimule la croissance ovarienne chez les femelles immatures, (*iii*) que l'administration de MF *in vivo* induit la synthèse de vitellogènine et stimule la maturation des ovocytes, et que (*iii*) 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 prémue et début de postmue sont un signal nécessaire au démarrage de la vitellogénèse, favorisant, ainsi sa synchronisation avec le cycle d'inter-mue. Par exemple, Blanchet-Tournier (1980), rapporte que, chez l'amphipode *Orchestia gammarella*, l'injection de 20-hydroecdysone chez des femelles venant juste de muer empêche la nouvelle génération d'ovocytes d'entrer en vitellogénèse, de même que la cautérisation de l'organe-Y inhibe la synthèse de vitellogènine, ainsi que son incorporation au sein des ovocytes.

Chez les **mâles** malacostracés, l'activité spermatogénétique est régulée par le niveau d'**hormone androgène** (AGH) sécrétée (Charniaux-Cotton et 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.

2.2.4. Autres molécules suceptibles d'être impliquées dans la régulation endocrinienne des crustacés

Les monoamines

Les monoamines telles que la sérotonine (5-hydroxytryptamine), la dopamine et l'octopamine, ont été détectées dans les cellules sécrétrices de l'organe péricardique des crustacés et ont été considérées pendant long-temps comme de simples neurotransmetteurs (Cooke et Sullivan, 1982). En fait, les amines sont connues pour agir comme des neurohormones en étant diffusées dans l'hémolymphe (Cooke et Sullivan, 1982). Plusieurs

études suggèrent que les amines sont impliquées dans la régulation de processus en lien avec la reproduction (revu dans Fingerman *et al.*, 1998; Mazurová *et al.*, 2008). Il apparaît que la 5-hydroxytryptamine stimule la maturation des ovaires chez les femelles et des testicules chez les mâles, alors que la dopamine les inhibe. Cependant, les modes d'action de ces médiateurs (*i.e.* directe et/ou indirecte) restent à établir.

• Les hormones stéroïdes de "type-vertébré" chez les crustacés

Depuis que Donahue (1940) a décrit la présence d'œstrogène dans l'ovaire du crabe *Panulirus argus*, de nombreux travaux ont rapporté la présence d'**hormones stéroïdes de** "**type-vertébré**" chez un grand nombre d'espèces de crustacés (revu par Fingerman *et al.*, 1993; Lafont et Mathieu, 2007). Des concentrations non négligeables d'hormones telles que la progestérone, la 17 α -hydroxyprogestérone, la testostérone, l'androsténédione et l'œstradiol, ont été retrouvées chez ces espèces, principalement dans les gonades et l'hépatopancréas suggérant que ces tissus puissent être des sites de synthèse ou la cible d'action de ces hormones.

Les premiers auteurs pensaient que la présence de stéroïdes de "type-vertébré" chez les invertébrés pouvaient être du à l'assimilation par la nourriture, principalement au travers des plantes qui représentent une source environnementale de molécules analogues aux stéroïdes de type-vertébré (Milanesi *et al.*, 2001). Cela ne semble pas être le cas des échinodermes et des mollusques, chez lesquels la plupart des étapes clés de la biosynthèse de stéroïdes - telles qu'elles ont été décrites chez les vertébrés - ont été caractérisées. En revanche, chez les crustacés, seules quelques étapes de la "stéroïdogénèse de vertébré" ont été identifiées (Janer et Porte, 2007).

En outre, plusieurs études ont montré que l'administration d'hormones stéroïdes de "type-vertébré" provoquait une réponse physiologique chez les crustacés. Par exemple, les **oestrogènes** (17 β -oestradiol, diethylstilbestrol, 17 α -éthynyloestradiol) ont été rapportés pour causer divers effets, incluant une altération du développement gonadique chez les amphipodes (Vandenbergh *et al.*, 2003), une diminution de la fécondité chez les cladocères (Baldwin *et al.*, 1995), ainsi qu'une réduction de la production de vitellogènine chez les mysidacés (Ghekiere *et al.*, 2006a). Les **progestogènes** (progestérone, 17 α -hydroxyprogesterone, 17 β -hydroxyprogesterone) pourraient stimuler la maturation ovarienne chez les décapodes (Yano, 1985, 1987). Enfin, Nagabushanam et Kulkarni (1981) ont montré que, chez *Parapenaeopsis* *hardwickii*, l'injection de **testostérone** provoquait une hypertrophie et une hyperplasie de la glande androgène, ainsi qu'une induction de la spermatogenèse.

Le fait que la présence d'hormones stéroïdes de "type-vertébré" chez les crustacés soit avérée et que leurs effets sur la reproduction aient été montrés, indique que ces hormones peuvent avoir un rôle dans la régulation hormonale chez ces organismes. En revanche, rien n'implique qu'elles aient chez les crustacés, les mêmes mécanismes d'action et de régulation que chez les vertébrés.

2.3. Perturbations du système hormonal chez les crustacés

Tenant compte de la particularité de la régulation hormonale des crustacés, l'évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens (PE) dans les milieux aquatiques ne peut pas se contenter des informations obtenues à partir des études réalisées chez les vertébrés.

Ainsi, l'étude des perturbations endocriniennes chez les crustacés a fait l'objet, ces dernières années, d'une attention toute particulière, se traduisant par une augmentation du nombre de travaux et de revues (Wollenberger, 2005; LeBlanc, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; Mazurová *et al.*, 2008). Plusieurs observations de terrain et de laboratoire permettent de soupçonner l'occurrence de perturbations hormonales chez ces organismes.

Toutefois, ces résultats prêtent parfois à controverse et permettent rarement d'identifier les mécanismes de perturbation mis en cause ; ce constat résultant notamment d'un manque d'outils spécifiques (*i.e.* biomarqueurs).

2.3.1. Observations en milieu naturel

La fréquence de l'intersexualité et du sex-ratio a été proposée comme un marqueur populationnel simple et robuste pour évaluer les effets de PE sur la différentiation sexuelle, au sein de populations naturelles de crustacés (Matthiessen *et al.*, 1999; LeBlanc, 2007). L'altération de ces paramètres met principalement en cause des perturbations de l'action de l'hormone androgène chez les malacostracés et des sesqueterpénoïdes (*i.e.* méthyle farnésoate) chez les crustacés inférieurs (*e.g.* branchiopodes) (voire section I.2.2.3).

L'intersexualité est un phénomène commun chez les crustacés gonochoriques, mais généralement peu présent en conditions normales (Ford et Fernandes, 2005; Olmstead et LeBlanc, 2007). L'intersexualité se caractérise par la possession de caractères sexuels mâles et femelles. Par exemple, chez les amphipodes, les mâles et les femelles se distinguent, respectivement, par la présence de papilles génitales et d'oostégites, alors que les individus intersexués possèdent les deux caractères. Bien que des phénomènes de masculinisation aient été observés chez des femelles décapodes hétérogamétiques (*i.e.* chromosomes sexuels différents), l'intersexualité, chez les malacostracés, est plus généralement liée à une démasculinisation des individus mâles (Ford, 2008).

Plusieurs travaux ont clairement mis en évidence des corrélations entre les niveaux de pollution, l'occurrence de l'intersexualité et des déviations du sex-ratio. Par exemple, des proportions d'intersexués significativement élevées, ainsi que des sex-ratios anormalement faibles (*i.e.* biaisés en faveur des femelles) ont été observés chez des copépodes (Moore et Stevenson, 1991, 1994), chez l'amphipode *Echinogammarus marinus* (Ford *et al.*, 2004b; Yang *et al.*, 2008), ainsi que chez le crabe *Geothelusa dehaani* (Takahashi *et al.*, 2000; Ayaki *et al.*, 2005), en présence de diverses contaminations industrielles et urbaines. Ces résultats vont dans le sens des travaux expérimentaux de Watts *et al.* (2002) qui rapportent une augmentation du nombre de femelles au sein d'une population de *Gammarus pulex* exposée au 17α -éthinyloestradiol.

Cependant, les travaux de Gross *et al.* (2001) chez *Gammarus pulex*, de même que ceux de Jungmann *et al.* (2004) chez *Gammarus fossarum* ne montrent aucune relation directe entre le pourcentage d'organismes inter-sexués (pouvant varier de 0.2 à 24 %) et les niveaux de contamination des milieux, notamment en termes de rejets de stations d'épuration, connus pour être les principales sources de composés PE avérés chez les vertébrés.

En effet, il doit être pris en compte que l'inter-sexualité peut être l'effet d'une contamination mais peut également résulter du parasitisme (*e.g.* les microsporidies chez les amphipodes ou les bactéries du genre *Wolbachia* chez les isopodes) dont l'impact sur les populations varie en fonction de facteurs environnementaux spatiotemporels tels que la température et la photopériode (Ford et Fernandes, 2005). Selon Ford et Fernandes (2005), l'hypothèse selon laquelle une contamination pourrait indirectement altérer la différenciation sexuelle en favorisant la prolifération et la transmission de parasites (*e.g.* à cause d'une dépression du système immunitaire de l'hôte) devrait être systématiquement vérifiée avant de conclure en l'existence d'une perturbation hormonale.

2.3.2. Approche expérimentale

L'étude en laboratoire des perturbations endocriniennes chez les crustacés s'articule autour de deux principales approches.

La première approche se focalise sur des composés spécifiquement conçus pour moduler la régulation des hormones juvéniles et de mue présentes chez les insectes (*i.e.* **insecticides régulateurs de croissance**), ceci dans le but (*i*) d'évaluer leurs effets sur des espèces non-cibles présentant des similitudes du système endocrine (*i.e.* les crustacés), (*ii*) et améliorer les connaissances sur leur régulation endocrine.

La seconde approche consiste à évaluer le risque environnemental que représentent les composés reconnus comme **PE chez les vertébrés** (*i.e.* principalement des hormones naturelles ou de synthèse, et des mimétiques œstrogènes).

• Les insecticides régulateurs de croissance

Les insecticides juvénoïdes

Parmi les pesticides conçus pour réguler la croissance et la reproduction des insectes, les insecticides analogues à l'hormone juvénile (*i.e.* **insecticides juvénoïdes**) sont les plus répandus. Les principaux effets de ces composés agonistes à l'hormone juvénile des insectes sont de perturber l'embryogenèse et d'interférer avec les mécanismes de métamorphose durant les mues larvaires ou lors de la mue imaginale (LeBlanc *et al.*, 1999).

Considérant que le méthyle farnésoate chez les crustacés est l'analogue de l'hormone juvénile des insectes, les insecticides juvénoïdes ont été considérés comme des agonistes du méthyle farnésoate (*Fig. I-10*). De nombreuses études *in vivo* de laboratoire rapportent les effets des insecticides juvénoïdes tels que le **méthoprène**, le **pyriproxyfène**, le **précocène** ou le **fénoxicarbe**, chez les crustacés, notamment chez les décapodes et cladocères.

Les insecticides juvénoïdes altérent le développement embryo-larvaire et/ou la mue chez de nombreuses espèces (*Daphnia magna* : Olmstead et LeBlanc, 2001 ; *Mysidopsis bahia* : McKenney et Matthews, 1990 ; McKenney et Celestial, 1993 ; *Neomysis integer* : Ghekiere *et al.*, 2006a ; *Rhitropanopeneus harrisii* : Cellestial et McKenney, 1994 ; Tuberty *et al.*, 2005 ; Cripe *et al.*, 2003 ; *Palaemonetes pugio* : McKenney *et al.*, 2004 ; Tuberty *et al.*, 2005). L'importante sensibilité des derniers stades de vie larvaire pourrait être la résultante d'une diminution de la quantité de méthyle farnésoate endogène au travers des différents

stades larvaires tel que cela a été décrit pour l'hormone juvénile chez les insectes (LeBlanc *et al.*, 1999).



Figure I-10 : Structure chimique de l'hormone juvénile des insectes, du méthyle farnésoate et de 3 exemples d'insecticides juvénoïdes : le méthoprène, le fénoxicarbe et le pyriproxifène (McKenney, 2005).

Il a également été rapporté que les insecticides juvénoïdes pouvaient perturber la reproduction chez les femelles. Ces composés ont été montrés capables de causer des perturbations de l'oogenèse (*Libinia emarginata* : Hinsch, 1981), des inhibitions de la vitellogénèse (*Daphia magna* : Tokishita *et al.*, 2006 ; *Neomysis Integer* : Ghekiere *et al.*, 2006b ; *Callinectes sapidus* : Lee et Noone, 1995 ; *Rhitropanopeneus harrisii* : Payen et Costlow, 1997), des retards dans l'âge de première ponte et des diminutions de la production de jeunes (*Daphnia carinata* : Trayler et Davis, 1996 ; *Daphnia magna* : Olmstead et LeBlanc, 2001 ; *Americamysis bahia* : McKenney et Celestial, 1996 ; McKenney, 2005). Payen et Costlow (1977) ont observé une stimulation de la spermatogenèse chez des crabes mâles *Rhitropanopeneus harrisii* exposés au méthoprène. Enfin, au même titre que le méthyle farnésoate (voir section I.2.2.3), les insecticides juvénoïdes sont connus pour induire la production de mâles selon une relation dose-réponse chez les daphnies (Olmstead et 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 endocrine des crustacés dits inférieurs, et mettent en évidence la nécessité d'évaluer le risque de ce type de composés sur les crustacés (*i.e.* espèces non cibles).

Les insecticides mimétiques de l'ecdystéroïde

Les insecticides mimétiques de l'ecdystéroïde ont reçu moins d'attention que les juvénoïdes. Quelques travaux rapportent néanmoins des effets de ces composés chez les crustacés. Par exemple, le RH5849 est un pesticide bisacylhydrazine conçu pour agir comme un agoniste de la 20-hydroecdysone et par conséquent pour perturber les mues métamorphiques des insectes. Le RH5849 accélère le cycle d'inter-mue chez les larves zoés du crabe *Rhithropanopeus harrisii*, 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

Perturbateurs endocriniens avérés chez les vertébrés

De nombreuses travaux ont été consacrés à l'étude de l'impact de perturbateurs avérés chez les vertébrés - notamment des hormones naturelles ou de synthèse (*e.g.* (anti)-œstrogènes, progestogènes et (anti)-androgènes), des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des surfactants, des pesticides, ou des métaux - chez les crustacés (quelques exemples vous sont présentés en *ANNEXE 1*).

La grande majorité de ces études s'est focalisée sur l'évaluation des réponses au niveau individuel. De nombreux composés ont ainsi été montrés capable d'altérer le développement embryonnaire et la croissance des juvéniles (*e.g.* Copépodes : Brown *et al.*, 2003 ; Wollenberger *et al.*, 2003 ; Chandler *et al.*, 2004 ; Forget *et al.* 2005 ; Wollenberger, 2005a ; Cladocères : LeBlanc et McLachan, 1999 ; LeBlanc *et al.*, 2000 ; Mu et LeBlanc, 2002a,b ; Zhang et al., 2003 ; Mu et LeBlanc, 2004 ; Cyrripèdes : Billinhurst *et al.*, 1998, 2001 ; Amphipodes : Blockwell *et al.*, 1996a, 1999 ; Brown et al., 1999), la fécondité des femelles et la production de jeunes (*e.g.* Copépodes : Bejarano et Chandler, 2003 ; Brown *et al.*, 2003 ; Chandler *et al.*, 2004 ; Wollenberger, 2005 ; Cladocères : LeBlanc et al., 2000 ; Parks et Leblanc, 1996 ; Wu et al., 2001 ; Tatarazako et al., 2002 ; Amphipodes : Blockwell *et al.*, 2000), et dans une moindre mesure sur la durée des périodes d'inter-mue et la fréquence d'exuviation (*e.g.* Cladocères : Baldwin et al., 1995 ; Zou et Fingermen, 1997a,b ; Baer et Owens, 1999 ; LeBlanc et McLachan, 1999 ; Mu et LeBlanc,

2002a,b ; Décapodes : Reddy *et al.*, 1982 ; Reddy et Rao, 1987 ; Greco *et al.*, 2001 ; Snyder et Mulder, 2001).

2.3.3. Manque d'outils spécifiques d'une perturbation endocrinienne

Comme nous avons pu le constater au cours de la partie précédente, la majeure partie des travaux visant à évaluer l'impact de PE chez les crustacés se focalise principalement sur des réponses au niveau individuel. Ces études soulignent l'intérêt de considérer les effets de ces molécules PE chez les crustacés dans une démarche d'évaluation des risques. Néanmoins, elles permettent rarement de statuer sur la capacité qu'une molécule peut avoir à perturber le système endocrinien chez ces organismes, excepté peut-être pour les composés spécifiquement concus à cet effet (e.g. insecticides régulateurs de croissance). En effet, des réponses telles que la réduction de la fécondité, la perturbation du développement embryonnaire et de la mue, peuvent être indicatifs d'une grande variété de stress (LeBlanc, 2007). Ces réponses peuvent être induites par une perturbation de la régulation hormonale, mais peuvent également résulter d'autres mécanismes de toxicité tels que la modulation de l'allocation énergétique (e.g. réduction de l'acquisition de nourriture et/ou une augmentation des dépenses énergétiques), la perturbation du système nerveux et/ou le transfert d'anomalies génétiques suite à une exposition à des composés génotoxiques. Il 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.

Il est surprenant de constater, comme le soulignent les dernières synthèses bibliographiques concernant les PE chez les crustacés (LeBlanc, 2007; Rodríguez *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 sesqueterpénoïdes) 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

(*i.e.* de grande taille) (*e.g.* Lye *et al.*, 2005; Lye *et al.*, 2008). En ce qui concerne les espèces d'intérêt en écotoxicologie aquatique (*i.e.* amphipodes, mysidacés, copépodes, cladocères), le dosage hormonal se confronte encore à plusieurs limites (*i*) analytiques, avec des quantités d'échantillon 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 (*e.g.* mue et reproduction) chez ces espèces.

De même, il pourrait être intéressant de développer des tests ligant-récepteur permettant l'évaluation *in vitro* du potentiel PE d'une molécule ou d'un échantillon naturel (*i.e.* eau ou extrait de sédiment) à l'encontre des crustacés, tel que cela est fait chez les vertébrés (*e.g.* Tests YES (yeast oestrogen screen) et YAS (yeast androgen screen)). Par exemple, un bioessai *in vitro* utilisant le **récepteur de la 20-hydroecdysone** (EcR) de *Drosophila melanogaster* (*i.e.* le **bioessai B**_{II}) a été développé afin de tester la possible interaction (ant)agoniste de composés chimiques sur ce récepteur (Clément *et al.*, 1993). Dinan *et al.* (2001) ont testé plus de 80 contaminants environnementaux, incluant des composés d'origine industrielle, des pesticides, des pharmaceutiques, des phyto-oestrogènes, ainsi que des stéroïdes de vertébrés. Les résultats montrent qu'il existe très peu de composés à caractère agoniste. En revanche, les composés caractérisés comme oestrogéniques chez les vertébrés. Selon la récente revue de LeBlanc (2007) le degré d'interaction avec le récepteur aux œstrogènes des vertébrés (ER) peut être indicatif d'une potentielle interaction avec le récepteur EcR et vice-versa.

Enfin, par analogie aux travaux réalisés chez les poissons, la synthèse de vitellogénine a été proposée comme potentiel biomarqueur d'une perturbation endocrinienne chez les crustacés (LeBlanc, 2007; Rodríguez *et al.*, 2007; Mazurová *et al.*, 2008). Je vous propose, dans la suite de cette synthèse, un bref état de l'art concernant l'utilisation de la Vtg en tant que biomarqueur chez les crustacés.

2.4. Biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne : le dosage de la vitellogénine

La vitellogènine (Vtg) ou les vitellogènine-like (Vtg-like) sont des protéines précurseurs du vitellus (réserve énergétique nécessaire aux organismes au cours de leur développement embryonnaire) et par conséquent fortement impliquées dans la reproduction. L'induction de Vtg chez les mâles et les juvéniles de poissons est un effet bien connu des contaminants oestrogéniques et fait partie des outils validés et disponibles pour mettre en évidence la présence de ces contaminants dans les milieux aquatiques (Sumpter et Jobling, 1995; Matthiessen, 2003; Langston *et al.*, 2005).

Chez les crustacés malacostracés, une induction de la synthèse de Vtg chez les mâles pourrait directement indiquer une perturbation de l'action de l'hormone androgène (voir section I.2.2.3). Chez les femelles, une modulation de la synthèse de Vtg pourrait être induite par la perturbation de l'action de différentes hormones telles que l'ecdystéroïde, le méthyle farnésoate, des neuropeptides (voir section I.2.2.3).

2.4.1. Méthodes de dosages

La synthèse de Vtg est communément évaluée au moyen de techniques de dosage protéique de la vitelline (*i.e.* Western blot ou l'ELISA), basées sur l'utilisation d'anti-corps spécifiques (*Tab. I-7*). Cependant, l'application de ces techniques, chez les crustacés, reste limitée. En raison des niveaux de conservation modérés de la structure génétique et protéique de la Vtg chez ces organismes, il est difficile d'avoir une utilisation inter-spécifique d'un anti-corps anti-Vtg. Cela implique de purifier et de caractériser la vitelline 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 marins et, dans une bien moindre mesure, chez d'autres groupes de crustacés (*Tab. I-7*).

Une méthode alternative de mesure indirecte de la vitelline, reposant sur le dosage des phosphates alkali-labiles (PAL; marqueurs indirects de la vitelline), a été proposée par Campbell et Idler (1980). Cette méthode confère une plus grande souplesse d'application car elle ne nécessite pas une caractérisation complète de la protéine ou du gène codant pour celleci. Elle a été largement utilisée aussi bien en laboratoire que sur le terrain. Cependant, certaines précautions doivent être prises lors de son utilisation, particulièrement chez les crustacés, chez qui il existe d'autres sources importantes de phosphore pouvant affecter les mesures (Volz *et al.*, 2002).

Espèces	Références
<u>Décapodes</u>	
Cherax quadricarinatus	Sagi et al., 1999
Eriocheir sinensis	Chen et al., 2004
Fenneropenaeus merguiensis	Auttarat et al., 2006
Macrobrachium roserbergii	Lee et al., 1997
Marsupenaeus japonicus	Tahara et al., 2005
Palaemon elegans	Sanders et al., 2005
Palaemonetes pugio	Oberdörster et al., 2000
Penaeus monodon	Vincent et al., 2001
Sicyonia ingentis	Tsukimura et al., 2000
<u>Mycides</u>	
Neomysis integer	Ghekiere et al., 2004
<u>Amphipodes</u>	
Leptocheirus plumulosus	Volz et al., 2002
<u>Copépodes</u>	
Amphiascus tenuiremis	Volz et Chandler, 2004
<u>Cirripèdes</u>	
Balanus amphitrite	Billinghurst et al., 2000

 Tableau I-7 : Espèces de crustacés chez lesquelles des techniques de dosage de la vitelline par immuno-essais ont été validées.

Enfin, les méthodes basées sur la quantification des transcrits (i.e, expression du gène en ARN messagers) au moyen de techniques de génomiques (e.g. la RT-PCR en temps réel, la RT-PCR semi quantitative ou les "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. Ces techniques permettent également à partir d'un seul échantillon d'étudier l'expression d'une multitude de gènes. 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 Vtg a essentiellement été caractérisée chez des espèces marines de décapodes, mais également chez des copépodes, chez l'amphipode Gammarus pulex, l'isopode Armandillidium vulgare, ainsi que chez Daphnia magna (Tab. I-8). De plus, chez les crustacés et d'une manière générale chez les invertébrés, les séquences de certains gènes dont ceux codant pour la ou les Vtg, n'ont été que partiellement conservées tout au long de l'évolution, permettant difficilement le passage d'une espèce à une autre. Cette faible conservation au cours de l'évolution implique également une diversité fonctionnelle des protéines. Par exemple, il a été montré que certaines isoformes de Vtg peuvent avoir des fonctions différentes, pouvant notamment être impliquées dans le métabolisme du fer, du calcium et dans les systèmes de défense (Mazurová *et al.*, 2008).

Espèces	Références GenBank	Références
<u>Décapodes</u>		
Charybdis feriatus	AY724676	Mak et al., non publiés
Cherax quadricarinatus	AF306784	Abdu et al., 2002
Fenneropenaeus merguiensis	AY499620	Auttarat et al., 2006
Litopenaeus vannamei	AY321153	Parnes et al., 2004
Macrobrachium roserbergii	AB056458	Yang et al., 2000
Marsupenaeus japonicus	AB176641	Tsutsui et al., 2005
Metapenaeus ensis	AF548364	Tsang <i>et al.</i> , 2003
Pandalus hypsinotus	AB117524	Tsutsui et al., 2004
Penaeus monodon	DQ288843	Tiu et al., 2006
Penaeus semisulcatus	AY051318	Avarre et al., 2003
Portunus trituberculatus	DQ000638	Yang et al., non publiés
Uca princeps	DQ449891	Garcia-Gasca et Hernandez-Cornejo, non publiés
Amphipodes		
Gammarus pulex		Samble, communication personnelle
Isopodes		
Armandillidium vulgare	AB037247	Okuno et al., 2000
<u>Copépodes</u>		
Lepeophtheirus salmonis	EF490954 (Vtg 1)	Eichner <i>et al.</i> , non publiés
	EF490955 (Vtg 2)	Eichner et al., non publiés
Tigriopus japonicus	EU416312	Lee et al., sous presse
<u>Cladoceres</u>		
Daphnia magna	AB114859 (Vtg 1)	Kato et al., 2004
	AB252738 (Vtg 2)	Tokishita et al., 2006

 Tableau I-8 : Espèces de crustacés chez lesquelles la séquence codante du gène de la vitellogénine a été partiellement ou complètement caratérisée.

2.4.2. Application de la mesure de la Vtg en tant que biomarqueur chez les crustacés

Des études de laboratoire ont permis de montrer que la synthèse de Vtg chez les crustacés pouvait être modulée par l'exposition à divers types de contaminants environnementaux tels que les hormones œstrogènes, les xéno-œstrogènes, les dérivés d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, les pesticides ou les métaux (*Tab. I-9*). Les applications de cet outil dans le cadre d'études de terrain sont plus rares. Toutefois, des variations (inductions ou inhibitions) de la synthèse de Vtg en fonction de la nature et du degré de pollution ont été observées chez des femelles amphipodes et décapodes (Gagné *et al.*, 2005; Zapata-Perez *et al.*, 2005).

En revanche, de façon surprenante, parmi toutes ces études, une seule rapporte une induction du gène de la Vtg chez des individus mâles (Huang et Chen, 2004), le reste des travaux étant focalisé sur la modulation de la synthèse de Vtg chez les femelles et dans une moindre mesure chez les juvéniles. Or, des fluctuations de la production et de la teneur de Vtg sont naturellement présentes chez les femelles au cours du cycle de reproduction (Blanchet-Tournier, 1980; Lee et Chang, 1997; Jasmani *et al.*, 2000; Okumura et Aida, 2000a; Tahara *et al.*, 2005) et peuvent être indicatives d'une grande variété de stress, comme la malnutrition par exemple (Blanchet-Tournier, 1980; Wouters *et al.*, 2001) ou les stress osmotiques (Martin-Diaz *et al.*, 2004).

Espèces	Composés	Concentrations effectives	Méthodes employées	Effets	Références
Femelles					
Neomysis integer	Methoprène	0.01, 1 et 100 µg.l ⁻¹	ELISA	Inhibition	Ghekiere <i>et al.</i> , 2006
	4-nonylphénol	0.01 µg.l ⁻¹	ELISA	Induction	Ghekiere <i>et al.</i> , 2006
	Oestrone	1 µg.l ⁻¹	ELISA	Inhibition	Ghekiere <i>et al.</i> , 2006
Neocaridina denticulata	Chlordane	1 et 10 ng.l ⁻¹	PAL	Induction	Huang <i>et al.</i> , 2006
	Lindane	0.1 et 1 ng.l ⁻¹	PAL	Induction	Huang <i>et al.</i> , 2006
	17B-oestradiol	10 et 100 μg.l ⁻¹	PAL	Induction	Huang <i>et al.</i> , 2006
Procambarus clarkii	Cadmium	30 μg.Γ ¹	ELISA	Induction	Martin-Diaz <i>et al.</i> , 2006
	Zink	3000 μg.Γ ¹	ELISA	Induction	Martin-Diaz <i>et al.</i> , 2006
Palemonetes pugio	Pyrene	63 μg.Γ ¹	Dot blot	Induction	Oberdörster et al., 2000
Gammarus sp.	Zone portuaire	-	PAL	Induction	Gagné et al. , 2005
Tigriopus japonicus	Cadmium	12.5 mg.l ⁻¹	RT-PCR temps réel	Induction	Lee <i>et al.</i> , 2008
Amnhiascus tonuiromis	Finomril	۵ ۴ ۱۰۵ ۲ ⁻¹	F1 ISA		Volz et Chandler 2003
Artemia franciscana	Extraits d'effluents		PAL	Induction	Gagné et Blaise, 2004
Daphnia magna	Cadmium	1/10 de la CL50	Microarrays	Inhibition	Poynton et al., 2007
<mark>Mâles</mark>	Chlordane	10 ng.l ⁻¹	PAL	Induction	Huang <i>et al.</i> , 2004
Neocaridina denticulata	17B-oestradiol	10 et 100 μg.l ⁻¹	PAL	Induction	Huang <i>et al.</i> , 2004
<u>Juvéniles</u>					
Palaemon elegans (larves zoés)	4-nonylphénol	0.2, 2 et 20 μg.Γ ¹	ELISA	Induction	Sanders <i>et al.</i> , 2005
	17B-oestradiol	0.2 et 20 μg.Γ ¹	ELISA	Inhibition	Sanders <i>et al.</i> , 2005
Balanus amphitrite (laves cyprides)	4-nonylphénol	0.01-1μg.l ⁻¹	Western blot	Induction	Billinghurst <i>et al.</i> , 2000
	17B-oestradiol	1 μg.l ⁻¹	Western blot	Induction	Billinghurst <i>et al.</i> , 2000
Daphnia magna (néonates)	Cadmium	10, 50 et 100 μg.Γ ¹	Microarrays	Inhibition	Soetaert et al., 2007
	Pyriproxyfène	15.6 nM	RT-PCR temps réel	Inhibition	Tokishita <i>et al.</i> , 2006
	Métoprène	15.6 nM	RT-PCR temps réel	Inhibition	Tokishita <i>et al.</i> , 2006
	fénoxicarbe	15.6 nM	RT-PCR temps réel	Inhibition	Tokishita <i>et al.</i> , 2006

 Tableau I-9 : Etudes ayant rapporté des modulations de la synthèse de vitellogènine chez des crustacés suite à une exposition à différents types de contaminants.

3. ORGANISME SENTINELLE : GAMMARUS FOSSARUM

3.1. Systématique

Gammarus fossarum (Fig. I-11) occupe la classification systématique suivante (Martin et Davis, 2001) : embranchement : Arthropodes ; super-classe : Crustacés ; classe : Malacostracés ; sous-classe : Eumalacostracés ; super-ordre : Péracarides ; ordre : Amphipodes ; sous-ordre : Gammaridea ; genre : Gammarus ; espèce : fossarum (Koch, 1835).



Figure I-11 : Représentation de Gammarus fossarum (selon Goedmarkers, 1972, vu dans Eggers et Martens)

3.2. Répartition géographique et écologie

Le genre *Gammarus* est un constituant commun des communautés de macroinvertébrés 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 et Barnard, 1983; Tachet *et al.*, 2000).

Les espèces du genre *Gammarus (e.g. G. fossarum* et *G. pulex)* occupent une place importante au sein de leur écosystème. Généralement présents en forte densité, les gammares représentent une importante source de nourriture pour différentes espèces de macroinvertébrés, 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 ou « shredders » qui se nourrissent préférentiellement de matériel détritique tel que les feuilles (Felten, 2003). Selon Malby *et al.* (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 itéropare¹¹ et sa durée de vie semble 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'organisme au m² (Felten, 2003). L'aire de répartition géographique de *G. fossarum* s'étend des Pyrénées au milieu des Balkans, en incluant l'Europe centrale (Barnard et Barnard, 1983) (*Fig. I-12*).



Figure I-12 : Répartition de Gammarus fossarum (selon Barnard et Barnard, 1983).

¹¹ Organisme qui se reproduit à plusieurs reprises durant l'année.

3.3. Morphologie et clefs de détermination

Le corps des amphipodes est divisé en 4 régions distinctes comprenant de l'avant vers l'arrière, le *prosoma (i.e.* tête), le *mésosoma (i.e.* thorax), ainsi que le *métasoma* et l'*urosoma* qui forment l'abdomen (revu par Chevreux et Fage, 1970; Roux, 1970) (*Fig. I-13*).



Figure I-13 : Vue latérale d'un Gammaridae (adaptée d'après Chevreux et Fage, 1970; Roux, 1970). pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uropomères 1-3.

Le **prosoma** est constitué d'une seule pièce, ou céphalon, 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 (*i.e.* ocelles), une paire d'antennules (*i.e.* antennes 1) et une paire d'antennes (*i.e.* antennes 2) qui se prolongent vers l'avant, ainsi que 4 paires d'appendices masticateurs situées sur la face inférieure (*i.e.* le labre, les mandibules, le labium, les maxillules et les maxilles).

Le mésosoma (encore appelé péréion) compte 7 articles libres, chacun muni d'une paire d'appendices uniramés constituant les péréipodes. Les deux premiers péréiopodes sont préhensibles et fixateurs. Ils constituent les gnatopodes 1 et 2. Les péréiopodes 3 à 7 sont locomoteurs. Chaque péréipode 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 gnatopodes et des trois paires de périopodes suivants porte une extension lobiforme, appelée oostégite. Les oostégites forment le planché d'une chambre incubatrice (*i.e.* marsupium) au sein de laquelle les œufs fécondés pourront se développer jusqu'à éclosion (*Fig. I-14*). La cavité ventrale qui abrite également les branchies est délimitée latéralement par des plaques coxales.



Figure I-14 : Schéma d'une coupe transversale au niveau du mésosoma d'une femelle de Gammaridae (adapté d'après Chevreux et Fage, 1970).
ba : basipodite ; br : branchie ; c : cœur ; ca : carpopodite ; ci : chambre incubatrice ; cn : chaine nerveuse ; co : coxopodite ; d : dactylopodite ; h : caecum hépathique ; i : ischiopodite ; m : méropodite ; oe : œufs ; oo : oostégite ; pr : propodite ; P : péréiopode ; td : tube digestif.

Le métasoma (ou pléon) est constitué de 3 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.

L'**urosoma**, terminé par un court telson, est constitué de 3 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 court que l'externe (*i.e.* exopodite).

Le genre *Gammarus* est une forme d'amphipode aquatique. Il se distingue par son corps essentiellement lisse avec quelques épines et soies n'existant que sur le dos de l'urosoma. L'endopodite de l'uropode 3 est toujours présent et bien développé (toujours supérieur à 1/3 de l'exopodite) (Roux, 1970; Karaman et Pinkster, 1977; Eggers et Martens, 2001).

L'espèce *fossarum* (*Fig. I-11*), quant à elle, se caractérise principalement par (*i*) une cuticule non carénée, (*ii*) l'absence de rayures sur le corps, (*iii*) de petites ocelles de formes ovales, (*iv*) un rapport endopodite/exopodite (de l'uropode 3) compris entre 0.40 et 0.60 (*Fig. I-15a*), et (*v*) des antennes portant un article 4 plus court que l'article 5, munies de longues soies insérées en 6 ou 7 points, voir 8 exceptionnellement (*Fig. I-15b*) (Roux, 1970; Karaman et Pinkster, 1977; Eggers et Martens, 2001).



Figure I-15 : Détail de l'uropode (a) et de l'antenne (b) de Gammarus fossarum. art.4 : article 4 ; art. 5 : article 5.

3.4. Reproduction des gammares

Les gammares sont des organismes gonochoriques. Leur période de reproduction s'étend sur la quasi-totalité, voire la totalité de l'année, bien que des pics de reproduction soient généralement observés au printemps et à la fin de l'été (Le Roux, 1933; Felten, 2003).

3.4.1. Anatomie de l'appareil reproducteur.

L'**appareil génital** est composé de deux organes fusiformes indépendants, situés sous le cœur, au-dessus du tube digestif et des caeca hépatiques. Ils s'étendent du 2^{ième} au 7^{ième} segment du mésosoma (voir section I-3.3) 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).

Chez le mâle (*Fig. I-16*), les organes présentent, au niveau du 5^{ième} segment, un étranglement séparant la région antérieure ou testicule, d'une vésicule séminale qui s'étend

jusqu'au 7^{ième} segment et se prolonge par un canal déférent. Les deux vas déférents aboutissent séparément à des papilles génitales situées en position ventrale du 7^{ième} segment, de part et d'autre de la ligne médiane ventrale. Attachée au niveau de la région sub-terminal des vas déférents, se situe la glande androgène¹². La spermatogénèse¹³ s'effectue de l'extrémité antérieure vers la région postérieure du testicule (Charniaux-Cotton, 1965).



Figure I-16 : Appareil génital des amphipodes (adapté d'après Charniaux-Cotton, 1965).

 \circ : jeune mâle (la vésicule séminale n'est pas encore différenciée); \circ : femelle en vitellogénèse; c mu : cellules à mucus; GA : glande androgène; gp : papille génitale; mt : tissu mésenchimatique indifférencié; oc I : ovocyte en vitellogénèse primaire; oc II : ovocyte en vitellogénèse secondaire; og : ovogonie; ovd : oviducte; ovd vst : oviducte vestigial; spc : spermatocyte; spg : spermatogonie; spz : spermatozoïde; vd : vas déférent; vts vd : vestige du vas déférent.

Chez la **femelle** (*Fig. I-16*), les ovaires sont de forme à peu près régulièrement cylindrique. Un oviducte se détache du tiers inférieur de chaque ovaire, au niveau du 5^{ième} segment et se dirige obliquement 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. 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.

¹² Glande endocrine responsable de la différenciation sexuelle des mâles chez les Crustacés malacostracés (voir section I-2.2.3)

¹³ Evolution des cellules sexuelles mâles, depuis les spermatogonies jusqu'aux spermatozoïdes.

La première rangée formée essentiellement d'ovogonies constitue la zone germinative. Puis, viennent les ovocytes primaires¹⁴, et les ovocytes secondaires¹⁵.

3.4.2. Cycle de reproduction et cycle d'inter-mue

Chez les crustacés péracarides, tels que les amphipodes ou les mysidacés, le cycle de reproduction des femelles est rythmé par le cycle d'inter-mue (*Fig. I-17*) (Charniaux-Cotton, 1965; Blanchet-Tournier, 1980). En effet, chez les femelles sexuellement actives, la maturation des gonades (*i.e.* vitellogénèse) et le développement des embryons dans le marsupium se déroulent de manière parfaitement synchrone, à chaque cycle d'inter-mue. Les juvéniles fraichement 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 une nouvelle portée d'ovocytes matures qui seront aussitôt fécondés par un mâle. Parallèlement, dans la gonade, un nouveau lot d'ovocytes primaires entre en vitellogénèse. L'exuviation peut ainsi être considérée comme le point de départ et d'aboutissement de la maturation gonadique ainsi que du développement embryo-larvaire dans le marsupium. De ce fait, chez les femelles sexuellement actives, le cycle d'inter-mue s'effectue dans un lapse de temps précisément défini, contrairement aux mâles ou aux femelles en repos sexuel qui présentent des durées d'inter-mue beaucoup plus variables.

3.4.3. 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 (*Fig. I-18*). Cette étape dure quelques jours, jusqu'à la mue puis la ponte de la femelle, facilitée par la présence du mâle qui l'aide à sortir de l'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 œufs fraîchement pondus. Cette opération est renouvelée 2 ou 3 fois. Les spermatozoïdes restent dans la poche incubatrice sans pénétrer dans les oviductes.

¹⁴ Ovocytes bloqués en métaphase I de la méiose.

¹⁵ Ovocytes ayant achevés la méiose et qui sont en phase de croissance (*i.e.* vitellogénèse).



Figure I-17 : Relation entre le cycle d'inter-mue, le cycle de reproduction (i.e. maturation des gonades, accouplement et développement embryonnaire) chez les femelles amphipodes sexuellement *actives (adapté d'après Blanchet-Tournier, 1980).* A, B, C, D : différents stades de mue ; E. : exuviation ; Vit. I^{aire} : vitellogénèse primaire ; Vit. II^{aire} : vitellogénèse

secondaire.



Figure I-18 : Mâle et femelle Gammarus fossarum en précopulat (source personnelle).

3.5. Utilisation des gammares en écotoxicologie

Les crustacés amphipodes sont fréquemment utilisés dans le cadre d'étude d'évaluation de risques et de la qualité des écosystèmes aquatiques (Rinderhagen *et al.*, 2000). Cet engouement s'explique notamment par leur pertinence écologique, mais également par le fait qu'ils présentent de nombreux avantages logistiques. En effet, ces organismes :

- se retrouvent dans une multitude d'habitats marins, d'eaux saumâtres et d'eaux douces, aussi bien que dans les écosystèmes terrestres à fort taux d'humidité (*e.g.* zones tidales, litières forestières),
- présentent généralement des aires de répartition géographique larges, où ils sont fortement représentés en termes de densité et de biomasse,
- remplissent, pour nombre d'entre eux, un rôle trophique important au sein de leur écosystème,
- et sont sensibles à une large gamme de contaminants.
- Leur identification spécifique, ainsi que leur manipulation et maintien en laboratoire sont relativement aisés.
- Il est possible de les échantillonner tout au long de l'année,
- et leur transplantation sur le terrain, dans le cadre de bioessais *in situ*, est facilement réalisable.

Ainsi, le genre *Gammarus* est utilisé en tant que bioindicateur¹⁶ de la qualité du milieu. C'est dans cette optique qu'ont été mis en place certains indices biotiques comme le système des saprobies et le ratio *Gammarus/Asellus* (revu par Rinderhagen et al., 2000).

Les gammares sont également reconnus comme étant de bons bioaccumulateurs¹⁷ de polluants métalliques (Amyot *et al.*, 1994; Plenet, 1995; Fialkowski *et al.*, 2003), mais également de micropolluants organiques tels que les insecticides (Ashauer *et al.*, 2006).

Enfin, durant ces dernières décennies, les impacts de stress toxiques, chez ces organismes, ont été étudiés à différentes échelles d'organisation biologique, que se soit au niveau :

¹⁶ La densité de(s) espèce(s) considérée(s) donne une information sur l'état environnemental.

¹⁷ L'accumulation de polluants dans le corps ou des tissus spécifiques permet de caractériser la fraction de contaminants biodisponibles pour l'organisme.

- 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.*, 2004a; Yang *et al.*, 2008),
- de l'individu, via le suivi de la croissance (Blockwell et al., 1996a; Roman et al., 2007), des taux de reproduction (Cold et 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 et Maltby, 2000; Maltby et al., 2002; Bloor et Banks, 2006), l'endurance natatoire, la locomotion et la ventilation (Borlakoglu et Kickuth, 1990; Gerhardt, 1995, 1996; Gerhardt et al., 1998; Felten et Guerold, 2001; De Lange et al., 2006; Felten et al., 2008), ou le comportement pré-copulatoire (Borlakoglu et Kickuth, 1990; Pascoe et al., 1994; Malbouisson et al., 1995; Watts et al., 2001),
- physiologique, via l'étude de paramètres tels que l'allocation énergétique¹⁸ (Naylor *et al.*, 1989; Maltby *et al.*, 1990b, a; Maltby, 1992), la respiration (Kedwards *et al.*, 1996) ou le maintien de l'homéostasie (*i.e.* ionorégulation) (Handy et Depledge, 2000; Felten et Guerold, 2001; Brooks et Mills, 2003; Felten et Guerold, 2006; Felten *et al.*, 2008),
- tissulaire et cellulaire, comme avec l'étude histologique des anomalies gonadiques (Gross *et al.*, 2001; Vandenbergh *et al.*, 2003; Schirling *et al.*, 2005; Schirling *et al.*, 2006) ou des *caeca* hepatopancréatiques (Blockwell *et al.*, 1996b; Kutlu *et al.*, 2002),
- ainsi qu'au niveau moléculaire, avec entre autre, l'application de biomarqueurs neurotoxiques (*i.e.* activité enzymatique des cholinestérases) (Kuhn et Streit, 1994; Streit et Kuhn, 1994; Crane *et al.*, 1995; Crane *et al.*, 1999; McLoughlin *et al.*, 2000), et reprotoxiques (*e.g.* titration de vitellogénine) (Gagné *et al.*, 2005).

¹⁸ Scope for growth : différence entre l'énergie absorbée par la nourriture et l'énergie métabolisée

4. BUT DES TRAVAUX

Les travaux de cette thèse ont pour but de développer, chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*, des outils de diagnostic facilement applicables et interprétables dans le cadre de programmes de surveillance biologique de la qualité des systèmes d'eaux courantes.

Dans une première partie, l'objectif était de développer la mesure des activités ChE chez *G. fossarum* afin de la proposer comme un marqueur d'exposition et/ou d'effet de contaminants neurotoxiques. L'analyse bibliographique précedemment exposée souligne que bien qu'il s'agisse d'un "vieux biomarqueur", son application et son interprétation en milieu naturel, notamment chez les invertébrés, se confrontent encore à plusieurs problèmes auxquels nous avons tentés de répondre.

Une première étape de caractérisation basée sur l'étude des propriétés biochimiques et pharmacologiques a été menée afin d'identifier les activités enzymatiques mesurées (*i.e.* les différentes isoformes de ChE) chez *G. fossarum* au moyen de la méthode de dosage conventionnelement employée.

Puis, dans le but de définir des valeurs de référence qui permettraient une interprétation fiable et robuste de cet outil, l'impact de facteurs méthodologiques (*i.e.* temps et type concervation ; normalisation par les protéines) et biotiques (*i.e.* sexe, statut reproducteur et masse des organismes), ainsi que la gamme de variabilité spatio-temporelle du niveau de base de l'activité ChE de *G. fossarum* ont été évalués au cours d'une double approche laboratoire/terrain.

La possibilité d'interpréter ce biomarqueur d'exposition en termes d'effets sur l'organisme a été évaluée au travers de l'étude, en laboratoire, des relations entre l'inhibition des ChE et les altérations du comportement et de la survie.

Enfin, la pertinence de la méthodologie développée a été appréciée lors d'applications en milieu naturel chez des organismes transplantés sur des sites soumis à des pressions chimiques d'origines diverses (*i.e.* urbaines, agricoles et/ou minières).

La seconde partie de ces travaux avait pour but de développer des outils capables de diagnostiquer l'impact d'une perturbation endocrinienne sur la reproduction de *G. fossarum*.

La première démarche a été de définir une approche pragmatique basée sur la mise au point d'un biotest de reprotoxicité permettant de suivre simultanément différents processus physiologiques en lien avec la reproduction (*i.e.* le cycle de mue ; la maturation ovarienne ; le développement embryonnaire ; le taux d'alimentation) afin de préciser le mode d'action du contaminant. Dans un premier temps, le cycle de reproduction des femelles a été décrit de manière détaillée et un biotest a été développé sur la base de ces résultats. La fiabilité et la robustesse de l'outil développé ont été évaluées dans le cadre d'expositions à différents stress, en laboratoire.

La seconde démarche, par analogie aux travaux effectués chez les poissons, reposait sur le développement de la mesure l'expression du gène de la vitellogènine comme un biomarqueur spécifique d'une perturbation de la voie d'action de l'hormone androgène chez les organismes mâles. Afin de valider la fonctionnalité du gène et déterminer le niveau d'expression de base des mesures ont été réalisées chez des organismes sains des deux sexes. Enfin, la pertinence de cette mesure en tant que biomarqueur a été évaluée chez des mâles exposés en laboratoire à des molécules modèles ainsi que chez des mâles transplantés dans le milieu naturel à proximité de rejets de stations d'épuration.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

Ce chapitre est dédié à la présentation générale des procédures de prélèvement, de maintien et d'exposition des organismes, ainsi que des méthodologies utilisées pour mesurer les différents marqueurs biologiques étudiés.

Les expérimentations effectuées dans le cadre de ces travaux seront plus spécifiquement détaillées au travers des articles et des notes qui reprennent les principaux résultats.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

1.1. Prélèvement

Les gammares utilisés en routine dans le cadre de nos expérimentations ont été collectés en amont du bassin de la Bourbre [45°34'09.6'' N - 5°27'33.0'' E] au niveau de la commune de La Tour du Pin (département de l'Isère, France) (*Figure II-1*). Ce site a été retenu car (*i*) les données diffusées par le Réseau National des Bassins (*i.e.* niveaux de contaminations dans l'eau et le sédiment, et indice biologique global normalisé) le qualifient de bon état, et (*ii*) d'importantes densités de gammares (> 1000 individus.m⁻²) y sont présentes.



Figure II-1 : Localisation du site de prélèvement de la Tour du Pin, sur le bassin versant de la Bourbre.

Les organismes sont prélevés à l'aide d'un troubleau (base rectangulaire 25 x 18 cm ; maille 630 μ m) selon la méthode du 'kick sampling'¹⁹ (*Fig. II-2A*). Après échantillonnage, les différentes classes de tailles sont séparées au travers d'une colonne de tamis, puis immédiatement stockées dans des bidons en polyéthylène contenant de l'eau du site (*Figure*)

¹⁹ Spécifiquement adaptée au cours d'eau de faible profondeur, cette méthode consiste à remuer le substrat (généralement avec le pied) afin de provoquer la fuite des organismes epibentiques. Une fraction majeure de ces organismes se retrouve ainsi portés par le courant, dérive et se retrouve piégée dans le filet du troubleau disposé juste en aval de la zone perturbée.

II-2B). Durant le transfert des organismes au laboratoire, les bidons sont placés dans des glacières afin de limiter les variations de température.



Figure II-2 : Prélèvement des gammares (A) et séparation des différentes classes de taille par tamisage (B). f. : filet ; c.t. : colonne de tamis.

1.2. Maintien en laboratoire

De retour au laboratoire, les échantillons sont triés afin de ne conserver que l'espèce recherchée et éliminer un maximum de débris organiques. Avant toute utilisation, les gammares sont acclimatés aux conditions de stabulation (décrites ci-dessous) durant une période de 10 à 30 jours.

Les gammares sont répartis dans des aquariums de 30 litres maintenus à une température de 12 ± 1 °C dans un bain-marie thermorégulé au moyen d'un cryostat (*Fig. II-3*). Le milieu de stabulation, continuellement renouvelé (à débit fixe de 4 l.h⁻¹), est constitué d'un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée (pH : 7.4-7.8) tel que la conductivité est maintenue à $600 \pm 50 \ \mu\text{S.cm}^{-1}$ (*i.e.* 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 16 h/8 h jour/nuit, l'intensité lumineuse étant comprise entre 500 et 1000 lux.

Les organismes sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*). Ces feuilles ont été préalablement conditionnées dans du milieu de stabulation (renouvelé quotidiennement), durant 6 ± 1 jours, à température ambiante, afin d'augmenter leur appétence. Enfin, 500 mg de vers tubifex lyophilisés sont délivrés 3 fois par semaine dans chaque aquarium en tant que complément alimentaire.



Figure II-3 : Dispositif de stabulation des gammares en laboratoire. A : vue générale. B : aquarium de stabulation.

a.a. : alimentation d'air ; a.e. : alimentation d'eau ; a.s. : aquarium de stabulation ; b.m. : bain-marie thermorégulé ; b.t. : billes thermo-isolantes ; i.p. : identification des prélèvements ; n. : néon ; s. : surverse.

2. EXPERIMENTATIONS

2.1. Expérimentations sous conditions contrôlées, en laboratoire

Dans le cadre de cette thèse, différentes expérimentations *in vivo* ont été réalisées sur des gammares exposés, ou non, à des stress de natures diverses (*i.e.* thermique, alimentaire et toxiques), dans des conditions contrôlées. Ces expérimentations en laboratoire avaient pour objectifs (*i*) de caractériser certains traits d'histoire de vie de ces organismes (*e.g.* description du cycle d'inter-mue), (*ii*) de tester indépendamment l'impact de différents facteurs environnementaux (*e.g.* température et privation alimentaire) sur la réponse de paramètres biologiques d'intérêt, et (*ii*) d'évaluer la pertinence de ces réponses en présence de

contaminants modèles (*e.g.* métaux, insecticides, surfactants et pharmaceutiques). Le *Tableau II-1* présente un descriptif des différentes expérimentations réalisées en conditions contrôlées.

L'ensemble de ces expérimentations ont été menées dans du milieu de stabulation (défini en section II.1.2). Les gammares étaient exposés dans des béchers d'une contenance de 500 ml en polypropylène ou en verre, selon la molécule testée. Une pièce de toile à bluter en polyamide (porosité : 500 μ m ; longueur x largeur : 6 x 5 cm) était disposée dans chaque bécher de sorte à fournir une surface d'accroche, permettant ainsi de minimiser les agressions entre organismes.

Tous nos tests ont été effectués à 12 °C, excepté celui visant à évaluer les effets de la température. Pour cela, les béchers étaient répartis dans des bains-marie thermorégulés au moyen d'un cryostat (Teco) et homogénéisés à l'aide de pompes, permettent de maintenir la température désirée \pm 1°C. Pour les expérimentations nécessitant un contrôle plus pointu de la température (*e.g.* suivi de la reproduction des femelles sur un période de 21 j) les bains-marie étaient à la fois refroidis par un cryostat et réchauffés par un thermostat (Huber) de sorte à obtenir des écarts de température \leq 0.2 °C (*Fig. II-4*).

Les caractéristiques physico-chimiques du milieu d'exposition (*i.e.* pH, conductivité, O₂ dissous et température) ainsi que la survie des organismes étaient suivis quotidiennement.



Figure II-4 : Photo d'un dispositif expérimental ; exemple d'un test d'exposition en semi-statique de 21 j. au méthomyl.

b. : Becher d'exposition ; b.m. : bain-marie thermorégulé ; cr. : cryostat ; f.a. : feuille d'aulne ; id. : identifiant de l'expérimentation ; plan expérimental ; t.b. : toile à bluter ; th. : thermostat.

	Effèt de composés organiques sur la reproduction chez les femelles	4 j d'attente pour que 100 % des femelles muent + 21 j	12 ± 0.2 °C	$650 \pm 50 \mu S.\mathrm{cm}^{-1}$ 7.8-8.3	10 h / 14 h	toutes les 48 h	continue	ad libitum (D.F.; $n = 15$)	NP: T, TS, 0.05, et 5 μg.Γ ¹ MT: T, 5, 20, 40 et 80 μg.Γ ¹	7 pré-copulas avec PD2 (7.5-9.8 mm)	3	Survie (quotidienne); Alimentation (hebdomadiare); Mue, fertilité, fécondité, croissance ovocytaire, développement embryonnaire (21 j)
ns expérimentales détaillées.	Effèt de composés organiques sur l'expression de la vitellogénine chez les mâles	16 j	12 ± 0.2 °C	650 ± 50 μS.cm ⁻¹ 7.8-8.3	8 h / 16 h	toutes les 48 h	aucune	ad libitum (M.F.)	NP: T, TS, 0.05, 0.5, 5 et 50 μg. l ¹ CP: T, TS, 1, 10, 100 et 1000 μg. l ¹	$4 \circ 3$ adultes (15-20 mg)	8	Survie (quotidienne); Expression du gène de la vitellogénine (2, 4, 8 et 16 j)
conditions contrôlées avec les conditio.	Effèt des pesticides sur l'activité ChE	96 h	12 ± 1 °C	$650 \pm 50 \mu \text{S.cm}^{-1}$ 7.8-8.3	8 h / 16 h	toutes les 24 h	aucune	ad libitum (D.F.; $n = 10$)	CPE: T, TS 0.125, 0.25, 0.5 et 1 µg. Γ^1 MT: T, 10, 20, 40, 80, 160 µg. Γ^1	$20\ { m of}$ adultes (15-20 mg)	5	Survie (quotidienne); Activité ChE (24, 48 et 96 h); Taux d'alimentation (48 et 96 h); Locomotion (96 h)
lifférents tests réalisés en .	Effèt de la température sur l'activité ChE	15 j	6, 12, 18, 24 \pm 1 °C	$650 \pm 50 \mu\text{S.cm}^{-1}$ 7.8-8.3	8 h / 16 h	toutes les 24 h	aucune	ad libitum (M.F.)	aucune	20 $%$ adultes (15-20 mg)	5	Survie (quotidienne); Activité ChE (2 et 15 j)
Tableau II-I : Enumération des d	Description de l'expé- Conditions rimentation d'exposition	Durée	Température(s)	Conductivité pH	Rythme jour / nuit	Renovellement du milieu	Aération	Nourrissage	Contaminants et concentrations	Nombre d'organismes / réplicats	Nombre de réplicats / condition	Paramètres mesurés (Temps ou fréquence)

. : 1:4: 100.1 . F

PD2 : Femelles en fin de cycle de reproduction prêtes à muer : (1) Les œufs issus de la dernière ponte ont éclos et les juvéniles nouvellement éclos sortent du marsupium, et (2) les ovocytes secondaires contenus dans les gonades sont matures et prêts à être pondus.

T: Condition témoin ne contenant que du milieu de stabulation ; TS : Condition témoin contenant du solvant en quantité égale à celles des milieux contaminés (toujours \leq 0.1 %0).

79

CP : cyprotérone acétate ; CPE : chlorpyrifos ; MT : méthomyle ; NP : nonylphénol ; Cd : cadmium. M.F. : Morceau grossiers de feuille d'aulne ; D.F. disques de feuille d'aulne (n = nombre dans chaque réplicat).

I ableau 11-1 (suite)			
Description de l'expé- Conditions rimentation d'exposition	Caractérisation du cycle d'inter-mue	Effet de la privation alimentaire sur la reproduction chez les femelles	Effet du cadmium sur la reproduction chez les femelles
Durée	entre 0 et 32 jours après exuviation des femelles (période de deux jours)	4 j d'attente pour que 100 % des femelles muent + 21 j	4 j d'attente pour que 100 % des femelles muent + 21 j
Température(s)	12 ± 0.2 °C	12 ± 0.2 °C	12 ± 0.2 °C
Conductivité	$650 \pm 50 \mu \text{S.cm}^{-1}$	$650 \pm 50 \mu \text{S.cm}^{-1}$	$650 \pm 50 \mu \mathrm{S.cm^{-1}}$
pH	7.8-8.3	7.8-8.3	7.8-8.3
Rythme jour / nuit	10 h / 14 h	10 h / 14 h	10 h / 14 h
Renovellement du milieu	continu	continu	continu
Aération	continue	continue	aucune
Nourrissage	ad libitum (M.F.)	100 %, 50 % et 25 % du temps (M.F.)	ad libitum (D.F.; $n = 15$)
Contaminants et concentrations	aucune	aucune	$Cd:T$, 0.3, 1 et 3 µg. Γ^1
)
Organismes / réplicats	1 pré-copulat avec $ otin D2 (7.5-9.8) $	1 pré-copulat avec $ arrow D2$ (7.5-9.8 mm)	7 pré-copulats avec $2D2$ (7.5-9.8 mm)
Nombre de réplicats / condition	4	36	m
Paramètres mesurés (Temps ou fréquence)	Mue et développement embryonnaire	Survie (quotidienne); Alimentation (hebdomadiare); Mue, fertilité, fécondité, croissance ovocytaire, développement embryonnaire (21 j)	Survie (quotidienne); A limentation (hebdomadiare); Mue, fertilité, fécondíté, croissance ovocytaire, développement embryonnaire (21 j)
 ♀D2: Femelles en fin de cycle de repro (2) les ovocytes secondaires contenus da T : Condition témoin ne contenant que 	duction prêtes à muer : (1) Les œufs issu ns les gonades sont matures et prêts à êt du milieu de stabulation ; TS : Conditi	is de la dernière ponte ont éclos et les j re pondus. on témoin contenant du solvant en qua	uvéniles nouvellement éclos sortent du marsupium, e ntité égale à celles des milieux contaminés (toujour
CP: cyprotérone acétate ; CPE : chlorpy M.F. : Morceau grossiers de feuille d'aul	rifos ; MT : méthomyle ; NP : nonylphé ne ; D.F. disques de feuille d'aulne (n =	nol ; Cd : cadmium. nombre dans chaque réplicat).	
Les tests d'exposition aux contaminants organiques (*i.e.* insecticides, surfactants et pharmaceutiques) ont été réalisés dans des conditions semi-statiques. Cette méthodologie n'est pas la plus efficace pour palier à la diminution d'oxygène dissous ou l'augmentation d'excrétions azotées dus au métabolisme des organismes. En revanche, elle nous est apparue être la plus appropriée pour l'utilisation de molécules peu solubles et rapidement dégradables. Les organismes étaient exposés dans de la vaisselle en verre afin de limiter l'absorption du contaminant sur les parois et les milieux d'exposition étaient entièrement renouvelés au minimum tous les deux jours.



Figure II-5 : Représentation schématique du dispositif expérimental d'exposition en continu (adapté d'après Felten et al., 2008).

b. : bulleur ; f.d. : facteur de dilution ; rb. robinet ; P.p. : pompe péristaltique ; s.m. : solution mère ; t. : tuyau.

Les expositions aux métaux (*i.e.* cadmium) ainsi que les expérimentations ne nécessitant aucune contamination chimique ont été effectuées avec un renouvellement continu des milieux (*i.e.* 4 renouvellements par jour) (*Fig. II-5*). L'apport en milieu non-contaminé était assuré au moyen d'un réseau d'alimentation en gravitaire, le débit étant manuellement réglé au moyen de rampe de robinets. La procédure de renouvellement des milieux contaminés était identique à celle décrite par Felten *et al.* (2008). Cette méthode qui repose sur l'utilisation de pompes péristaltiques, permet une automatisation des dilutions en cascade, n'obligeant ainsi à renouveler manuellement le stock de solution mère que tous les 2 à 3 jours. Les organismes étaient exposés dans de la vaisselle en polypropylène équipée d'une surverse afin d'évacuer le trop-plein de milieu. L'ouverture des surverses était obstruée par de la toile à bluter (porosité : $300 \ \mu$ m) pour empêcher les éventuelles pertes d'organismes (adultes et néonates).

2.2. Bioessais in situ

Différentes campagnes de bioessais *in situ* ont été menées afin de détecter d'éventuelles perturbations environnementales, en particulier l'incidence des rejets de stations d'épuration.

Ces tests *in situ* sont réalisés sur la base de la procédure décrite par Maltby *et al.* (1990b) (*Fig. II-6*). Les chambres d'expositions sont composées d'un manchon en polychlorure de vinyle (diamètre x longueur : $5 \times 10 \text{ cm}$) recouvert à chaque extrémité par une pièce de toile à bluter en polyamide (porosité : 1 mm). La fixation de la toile sur le manchon est assurée par des colliers de serrage en polyamide.



Figure II-6 : Dispositif expérimental d'exposition in situ.

b.r : block rocheux ; c.e. : chambre d'exposition ; c.p. : cagette de protection ; c.s. : collier de serrage ; m. PVC : manchon en PVC ; t.b. : toile à bluter.

Vingt-quatre heures avant le lancement de l'expérimentation, des gammares adultes de taille homogène sont repartis dans les différentes chambres d'exposition et maintenus dans les conditions de stabulation précédemment décrites (voir section II.1.2).

Les chambres d'exposition sont acheminées sur les sites d'observation dans des bidons de polypropylène remplis de milieu de stabulation ; eux-mêmes conditionnés dans des glacières afin de limiter les variations de température. Sur le terrain, les chambres d'exposition sont fixées dans des cagettes de protection en polyéthylène (longueur x largeur x hauteur : 60 x 40 x 20 cm) fermées par un couvercle, et positionnées parallèlement à la direction du courant. Les cagettes de protection sont maintenues sur le fond par des blocs rocheux trouvés sur site.

Les tests *in situ* durent 21 jours au total. Durant cette période, les organismes sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes conditionnées (voir section II.1.2). Les chambres d'exposition sont nettoyées une fois par semaine ; à cette occasion, la survie des gammares est mesurée, les individus morts étant retirés, et de la nourriture est rajoutée si nécessaire.

A l'issue de la période d'essai, les chambres d'exposition sont placées dans des bidons en polypropylène contenant de l'eau du site et conditionnées en glacières le temps du transport au laboratoire. Les bidons sont alors disposés dans des bains-marie thermorégulés et placés sous aération constante, le temps de traiter les différents échantillons.

3. MARQUEURS BIOLOGIQUES

3.1. La mesure de l'activité des cholinestérases

3.1.1. Conditionnement des échantillons

La mesure de l'activité ChE a été réalisée à partir d'extraits de pools de gammares entiers. Un effort particulier a été fourni pour sélectionner des organismes homogènes en poids et en taille. Il peut être noté que le nombre d'organismes par pools différait en fonction des classes de taille étudiées de sorte que la masse de tissus à homogénéiser reste relativement identique. Les organismes, une fois prélevés, sont rapidement séchés sur une feuille de papier absorbant afin d'éliminer l'excédent d'eau. Les organismes sont ensuite poolés, pesés, puis congelés dans de l'azote liquide, avant d'être stockés à -80 °C jusqu'au dosage enzymatique. Le mode de conservation des échantillons (*i.e.* humides ou lyophilisés) a fait l'objet d'une étude de mise au point (voir Note n°1, section IV.2).

3.1.2. Obtention des extraits enzymatiques

Les pools de gammares sont broyés le jour même du dosage, au moyen d'un Ultra-Turrax[®] T25 basic à une vitesse de 24 000 rpm, durant 35 s, à 4 °C. Le broyage est effectué dans du tampon phosphate (0.1 M, pH 7.8) contenant 0.1 % de triton X100²⁰, selon un rapport poids/volume de 1/10. Les homogénats ainsi obtenus sont centrifugés à 9 000 x g durant 15 min, à 4 °C. Le surnageant récupéré à l'issue de cette étape de centrifugation (*i.e.* fraction S9) est conservé dans de la glace afin d'être utilisé comme source enzymatique.

3.1.3. Dosage enzymatique

Le dosage de l'activité ChE a été réalisé selon la méthode colorimétrique élaborée par Ellman *et al.* (1961) (*Fig. II-7*). Cette méthode utilise la réaction entre la thiocholine, formée au cours de l'hydrolyse des esters de thiocholine (*i.e.* substrat de synthèse) par les ChE, et un substrat secondaire, l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB). Les esters de thiocholine sont des analogues structuraux aux substrats naturels des ChE. Ils sont hydrolysés pratiquement avec la même efficacité mais leur hydrolyse libère un groupement thiol (-SH) qui réagit avec le DTNB. Un des produits finaux de cette cascade de réactions, le 2-nitro-5-thionobenzoate (TNB), colore progressivement le milieu réactionnel en jaune.

L'apparition du TNB est suivie par des lectures de densité optique (DO) d'absorbance à 405 nm, effectuées à intervalles de temps réguliers au moyen d'un spectrophotomètre. Le rapport stœchiométrique de ces réactions étant égale à 1, le nombre de moles de TNB formées est équivalent au nombre de moles d'ester de thiocholine hydrolysées. Ainsi, la cinétique d'absorption est convertie en nanomoles de substrat hydrolysées par minute d'après le

²⁰ Le triton X100 est un détergent non dénaturant qui favorise l'extraction des protéines transmenbranaires sans les dénaturer.

coefficient d'absorption molaire du TNB ($\epsilon = 1.36 \times 10^{-2} \text{ ml.nmol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), selon la formule suivante :

Vitesse d'hydrolyse (nmol.min⁻¹) = $\frac{\Delta absorbance.min^{-1}}{\varepsilon} \times volume réactionnel (ml)$



Figure II-7 : Principe de la méthode colorimétrique d'Ellman et al. (1961). (A) Réaction 1 : Exemple de l'hydrolyse de l'acéthylthiocholine par l'acétylcholinestérase et formation de la thiocholine. (B) Réaction 2 : Réaction de thiocholine avec le DTNB et formation du TNB absorbant à 405 nm.

Les mesures d'activité ont été réalisées dans des microplaques en polystyrène de 96 puits à fond plat (Greiner). Le milieu réactionnel est composé de 330 μ l de tampon phosphate (0.1 M, pH 7.8), 20 μ l de DTNB (0.0076 M) et 20 μ l de fraction S9. La réaction enzymatique est initiée par l'ajout de 10 μ l d'ester de thiocholine. Trois différents esters de thiocholine (*Tab. II-2*) ont été testés dans une gamme de concentrations comprises entre 0.0625 et 4 mM (voir Article n°1, section IV.1). L'acétylthiocholine a finalement été retenu comme le substrat préférentiel pour nos essais enzymatiques de routine. La concentration optimale a été fixée à 2 mM.

Des triplicats de mesures ont été effectués pour chaque échantillon testé. Lorsque le coefficient de variation entre triplicats était > 5 %, l'échantillon était analysé de nouveau. Durant chaque session de dosage, l'hydrolyse spontanée des substrats a été estimée par la

réalisation d'un blanc sans S9. La présence, dans la fraction S9, de composés possédant des groupements thiols a été systématiquement évaluée au moyen de blancs sans ester de thiocholine. L'activité enregistrée dans les blancs était toujours < 0.03 nmol.min⁻¹. La limite de détection des activités ChE chez *Gammarus*, selon la méthode décrite, a donc été estimée à 0.1 nmol.min⁻¹.

L'absorption du TNB formé au cours de la réaction a été enregistrée toutes les 60 s durant 10 min à 25 °C à l'aide d'un spectrophotomètre *Safire*[®] (TECAM). Seules les valeurs situées dans la phase d'augmentation linéaire de DO²¹ (comprise entre 4 et 8 min en fonction des classes de taille considérées) ont été utilisées pour calculer la cinétique d'absorption (*i.e.* Δ absorbance).

Esters de thiocholine testés	Produits de la réaction d'hydrolyse
Acetylthiocholine H_3C H	Thiocholine + Acide acétique H_3C H_3C H_3C N^+ $-CH_2$ $-CH_3$ H_3C
Propionylthiocholine H_3C	Thiocholine + Acide propionique H_3C H_3C H_3C H_3C H_3C H_3C H_3C $H_2CH_2-CH_2-SH$ H_3C
Butyrylthiocholine H_3C H_3C H_3C H_3C H_3C H_2CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - CH_3 H_3C	Thiocholine + Acide butyrique H_3C H_3C H_3C H_3C $H_2CH_2-CH_2-SH$ H_3C $H_$

 Tableau II-2 : Représentation des différents substrats testés pour le dosage des activités cholinestérases et leurs métabolites.

3.1.4. Dosages protéiques

Par convention, l'activité ChE est normalisée par la quantité de protéines présentes dans le volume d'extrait étudié. Basée sur le postulat selon lequel la fraction enzymatique extraite est proportionnelle à la fraction protéique totale, cette normalisation est appliquée

²¹ Densité d'absorbance.

dans le but de corriger les éventuelles différences de rendement d'extraction (dues par exemple à l'efficacité du broyage ou des erreurs de pesées).

Les concentrations en protéines des fractions S9 ont été systématiquement dosées en triplicats de mesure selon la méthode de Lowry et *al.* (1951) adaptée à l'utilisation de microplaques 96 puits.

Une courbe d'étalonnage est obtenue par dosage d'une gamme de dilution d'albumine de sérum bovin (BSA ; Sigma) : 0, 0.01875, 0.0375, 0.075, 0.15 et 0.3 g.l⁻¹. Les fractions S9 sont diluées à $1/100^{e}$ (volume/volume) dans de l'eau ultra-pure de sorte que leur concentration en protéines soit comprise dans la gamme d'étalonnage. Brièvement, 100 µl d'extrait S9 dilué ou de solutions de BSA sont mis à incuber 20 min, sous agitation, à température ambiante, en présence de 150 µl de réactif de Lowry (Sigma). Puis 50 µl de Folin & Ciocalteu's phenol reagent sont additionnés. La DO d'absorbance à 690 nm est lue au bout de 10 min d'incubation des milieux réactionnels à température ambiante à l'aide d'un spectrophotomètre *Safire*[®] (TECAM).

3.2. Marqueurs comportementaux

3.2.1. Mesure du taux d'alimentation

Afin de mesurer le taux d'alimentation des gammares au cours de nos différentes expérimentations, les organismes sont nourris avec des disques de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*). Le nombre de réplicats, le nombre de gammares par réplicats, ainsi que le nombre de disques de feuille délivrés diffèrent en fonction des expérimentations (voir section II.2.1).

Les feuilles sont préalablement conditionnées dans du milieu de stabulation (renouvelé quotidiennement), durant 6 ± 1 jours, à température ambiante, afin d'augmenter leur appétence. Le limbe des feuilles est découpé en disques de 20 mm de diamètres au moyen d'un emporte-pièce, tout en évitant les nervures principales de la feuille.

Chaque lot de disques est scanné avant lancement du test puis à intervalles de temps prédéfinis en réponse aux besoins et/ou aux contraintes de l'expérimentation, au moyen d'un scanner Espon perfection 3490 PHOTO[®] (*Fig. II-8*). La surface des disques (en pixels) est

87

ensuite mesurée au moyen du logiciel d'analyse d'image SigmaScan[®] Pro v5.0 (Systat Software).

Les taux d'alimentation sont calculés comme une surface de feuille consommée par gammares et par jour (mm².jour⁻¹.gammare⁻¹), selon la formule suivante :

Taux d' alimentation
$$_{t} = \frac{\sum_{t=1}^{D} (S_{i,t} - S_{i,t-1}) / ((l_{i,t} + l_{i,t-1}) / 2)}{D} \times M$$

où t est le $t^{i\text{ème}}$ temps de mesure et D est la période sur laquelle le taux d'alimentation est analysée ; S est la surface totale des disques d'un même lot ; l est le nombre de gammares vivants ; M est le facteur de conversion des pixels en millimètres².



Figure II-8 : Représentation simplifiée de la procédure utilisée pour évaluer le taux d'alimentation via la mesure de surface de feuille consommée, dans une unité expérimentale (i.e. réplicat).

La méthodologie employée ici, présente un certain nombre d'avantage en comparaison des techniques classiquement employées qui reposent sur la mesure du poids sec de feuille consommée par poids sec de gammares. En effet, contrairement au poids sec, la mesure de surface (*i*) offre la possibilité de réaliser une cinétique de mesure à partir d'un même lot de disques de feuilles, et (*ii*) d'écarter les biais induits par la formation de biofilm et/ou l'accumulation de matière organique (notamment dans le cadre de test *in situ*) sur les disques qui peuvent fausser la mesure de poids sec.

3.2.2. Mesure de l'activité locomotrice

L'analyse du comportement locomoteur repose sur des techniques de capture des mouvements du gammare par une caméra. Ce procédé qualifié de « vidéo tracking » permet, à l'aide d'un algorithme qui analyse les images de la vidéo, de transformer ces images en repère mathématique bidimensionnel et d'associer à chaque pixel des coordonnées géométriques. L'analyse numérique de ces coordonnées permet de suivre les déplacements du gammare et de calculer une distance moyenne parcourue par unité de temps.

Le protocole expérimental que nous avons mis au point permet d'enregistrer simultanément les déplacements de 9 gammares (*Fig. II-9*). Pour cela les organismes sont individuellement distribués dans des boites de Pétri (\emptyset 100 mm) contenant 50 ml de milieu dans lesquels les gammares sont exposés. Les boites de Pétri sont disposées côte-à-cote, dans le champ de capture d'une caméra numérique (Sony), sur un support de couleur blanc-mat afin d'accentuer le contraste. Après une période d'acclimatation de 2 min au nouvel environnement, l'activité locomotrice des 9 gammares est filmée simultanément durant 5 min \pm 15 s. Le milieu des boites de Pétri est renouvelé entre chaque film pour maintenir une température constante. Toutes les mesures d'activité locomotrice sont réalisées dans une plage horaire bien définie (*i.e.* entre 14 et 16 heures), afin de minimiser les changements comportementaux liés au rythme circadien.

Les films sont transférés sur un ordinateur afin d'être fractionnés en une série d'images au format JPEG, à raison d'une image par seconde, au moyen du logiciel ImageGrab[®] v3 (par P. Glagla). Les différentes séries d'images sont ensuite traitées avec le logiciel XnView[®] (par P.-E. Gougelet), afin d'isoler chacune des boites de Pétri. L'analyse au moyen du logiciel Visilog[®] v6.4 (NOESIS) permet de convertir le positionnement du gammare à chaque seconde en coordonnées bidimensionnelles (*x*, *y*) et de calculer ainsi la distance totale parcourue par l'organisme (*Fig. II-10*).



Figure II-9 : Représentation schématisée du montage expérimental utilisé pour réaliser les vidéos de locomotions.

Finalement, l'activité locomotrice est exprimée comme une distance moyenne parcourue par seconde (mm.s⁻¹), selon la formule suivante :

Activité locomotrice (mm.s⁻¹) =
$$\frac{\sum_{i=1}^{I} \sqrt{|X_{(i+1)} - X_i|^2 + |Y_{(i+1)} - Y_i|^2}}{I} \times Z$$

où Xi et Yi sont les coordonnées de la $i^{ième}$ position du gammare, I est la durée totale en seconde (*i.e.* le nombre total d'images) et Z est le facteur de conversion des pixels en millimètres.



Figure II-10 : Schéma du déplacement d'un gammare dans sur un plan bidimensionnel.

b.p. : boite de Pétri ; c.n. : caméra numérique ; s.b.-m. : support de couleur blancmâte ; o. : ordinateur

3.3. Marqueurs de perturbation de la reproduction chez la femelle

Comme vu précédemment (voir section I.3.4.2) les processus de vitellogénèse et de développement embryonnaire sont étroitement associés au cycle d'inter-mue chez les femelles amphipodes sexuellement actives. De ce fait, les différents marqueurs de reprotoxicité développés dans le cadre de ces travaux ont été interprétés en fonction du temps, au regard du stade d'avancement du cycle d'inter-mue.

3.3.1. Détermination des stades d'inter-mue

La détermination des différents stades de mue a été effectuée sur la base des critères développés par Blanchet-Tournier (1980) chez l'amphipode marin *Orchestia gammarelus* (voir section V.1 ; Publication n°6). Cette méthode est basée sur l'observation microscopique des tissus de l'extrémité des périopodes. En effet, les amphipodes présentent un phénomène assez exceptionnel chez les crustacés (Charniaux-Cotton, 1957). Dès l'achèvement de l'exosquelette, au début de la phase d'intermue, l'épiderme se décolle au niveau de la griffe dactylienne des périopodes. La matrice tégumentaire s'invagine progressivement, puis se recouvre précocement (en comparaison au reste du corps) d'un étui cuticulaire.

Le diagnostic est effectué sur des tissus vivants (*Fig. II-11*). Les extrémités des périopodes des $3^{ièmes}$ et $4^{ièmes}$ paires, sont sectionnées au niveau du carpopodite avec des ciseaux de Wecker et montés entre lame et lamelle dans du milieu de stabulation. L'évolution des tissus du carpopodite et du protopodite est appréciée au moyen d'un microscope DM 2500[®] (Leïca) aux grossissements x 400 et x 630.



Figure II-11 : Représentation schématique de la procédure utilisée pour déterminer le stade d'inter-mue des organismes. c.w. : ciseaux de Wecker ; d. : dactilopodite ; L. : lame ; l. : lamelle ; m. : microscope ; m.s. : milieu de

stabulation ; p. : protopodite ; s. : soie.

3.3.2. Marqueurs de perturbation de la reproduction

• Histologie des gonades

Le gammare entier est fixé dans une solution de Bouin (75 % de solution saturée d'acide picrique, 20 % de formaldéhyde, 5 % d'acide picrique) durant 48 h. Les échantillons sont ensuite rincés durant plusieurs jours avec de l'éthanol 70° régulièrement renouvelé. Après déshydratation par passage dans des bains successifs d'éthanol 90° (3 x 90 min) et 100° (3 x 45 min), les organismes sont placés dans un bain de butanol (24 h), puis d'HistoChoice[®] clearing agent (Sigma) (3-4 h) afin d'assurer la transition entre l'éthanol et le milieu d'inclusion. Les échantillons sont alors inclus dans du Paraplast X-tra[®] (Sigma-Aldrich) liquide par différents bains successifs à 55 °C (3 x 2 h et 1 x 12 h) - garantissant ainsi la pureté du milieu d'inclusion - et mis en bloc à l'aide de barres de Leuckart.

Des coupes sériées transversales et longitudinales de 5 µm d'épaisseur sont obtenues au moyen d'un microtome RM 2245 (Leïca). Les coupes sont étalées et collées à chaud sur des

lames de verre préalablement traitées avec de la poly-L-lysine. Après séchage à l'étuve (24 h à 37 °C), déparaffinage (bains successifs d'HistoChoice[®] clearing agent, 2 x 10 min, et de butanol, 1 x 5 min) et réhydratation (bains successifs de 5 min d'éthanol 100°, 95° et 75°), les lames sont colorées à l'hémalum éosine (Martoja et Martoja-Pierson, 1967), puis recouvertes d'une lamelle enduite du liquide de montage HistoChoice[®] mounting medium (MicromFrance). Les observations histologiques et les photographies étaient réalisées au moyen d'un microscope DM 2500[®] (Leïca) et d'une caméra numérique Infinity2-1C[®] (Lumenera) associée au logiciel d'acquisition et de traitement d'image Visilog[®] v6.4 (NOESIS).

"Marqueurs macroscopiques"

La *Figure II-12* illustre la démarche adoptée dans le cadre de la mesure des différents "marqueurs macroscopiques" : fertilité (*i.e.* nombre d'embryons produits par femelles), stade d'avancement du développement des embryons contenus dans la poche marsupiale, fécondité (*i.e.* nombre d'ovocytes secondaires produits par femelles) et surfaces ovocytaires.



Figure II-12 : Représentation schématisée de la démarche utilisée pour mesurer les "marqueurs macroscopiques".

b. : loupe binoculaire ; e. : embryons contenus dans la poche incubatrice ; L. : lame ; m. : microscope ; o. : ovocytes secondaires visibles au travers de la cuticule.

Dans un premier temps les femelles sont photographiées au moyen d'une loupe binoculaire (x 7) associée à un appareil photo numérique, pour être mesurées secondairement à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan[®] Pro v5.0 (Systat Software).

Afin d'estimer la fécondité des femelles, le nombre d'ovocytes secondaires de chaque gonade était décompté *in vivo*, par observation trans-cuticulaire au moyen d'une loupe binoculaire (x 30). Le nombre d'ovocytes est normalisé par la taille des femelles.

La fertilité et le développement embryonnaire sont alors évalués. Pour cela, les embryons sont retirés manuellement du marsupium, puis placés dans une goutte de milieu de stabulation sur une lame de verre afin d'être dénombrés à l'aide d'une loupe binoculaire (x 30). Le nombre d'embryons est normalisé par la taille des femelles. Le stade embryonnaire est déterminé sur la base des critères définis chez *G. pulex* (McCahon et Pascoe, 1988).

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 goute de milieu de stabulation. Chacune des gonades est photographiée au grossissement x 50 au moyen d'un microscope DM $2500^{\text{®}}$ (Leïca) associé à une caméra numérique Infinity2-1C (Lumenera). La surface des ovocytes est ensuite déterminée (en μ m²) à l'aide du logiciel d'analyse d'image SigmaScan[®] Pro v5.0 (Systat Software).

3.4. La mesure de l'expression du gène de la vitellogénine (Vtg) par RT calibrée – PCR en temps réel

3.4.1. Conditionnement des échantillons

La mesure d'expression du gène de la Vtg est réalisée sur organisme entier. Toutes nos expérimentations ont été effectuées avec des gammares adultes, mâles ou femelles, de taille homogène (*i.e.* 9 ± 1 mm).

Les organismes sélectionnés sont rapidement rincés dans des bains successifs d'eau de stabulation et d'eau ultra pure, et séchés sur une feuille de papier absorbant afin d'éliminer l'excédant d'eau. Immédiatement après, les organismes sont conditionnés dans des

microtubes stériles contenant 600 µl d'une solution de RNA*later²²* (Sigma), congelés dans de l'azote liquide, puis stockés à -80 °C en attendant l'étape d'extraction des ARN.

3.4.2. Extraction des ARN totaux

Après décongélation, les échantillons sont transférés dans des microtubes stériles afin d'être broyés à froid au moyen de micopilons (Eppendorf) autoclavés, durant 3 cycles de congélation/décongélation dans l'azote liquide. Les broyats ainsi obtenus sont homogénéisés dans 250 µl d'eau ultra pure (Sigma).

L'extraction des ARN totaux est réalisée par l'addition de 750 μ l de Tri-Reagent LS (Euromedex) et 200 μ l de chloroforme (Sigma-Aldrich). Après 10 min d'incubation à température ambiante, puis 15 min de centrifugation à 12000 x g, à 4 °C, les acides nucléiques isolés dans la phase aqueuse (~ 500 μ l) sont délicatement récupérés. Ceux-ci sont ensuite précipités par l'ajout de 500 μ l d'isopropanol (Sigma) suivi d'une centrifugation (10 minutes à 4 °C; 12 000 x g). Le surnageant est éliminé et le culot d'acides nucléiques est lavé dans 1,5 ml d'éthanol à 75%. Après centrifugation (10 minutes à 4 °C; 12 000 x g) et élimination de l'éthanol, les culots sont rapidement séchés à 37 °C puis repris dans 50 μ l d'eau ultra pure. Les échantillons sont laissés une dizaine de minutes à température ambiante puis mélangés à vitesse lente au moyen d'un Vortex[®], pour permettre la dissolution complète du culot.

Afin d'éliminer toute trace éventuelle d'ADN génomique, les extraits d'ARN totaux sont digérés avec de la Turbo DNA*-free*[®] (Ambion) pendant 30 min à 37°C, puis purifiés selon les instructions du fournisseur. A l'issue de la purification, la concentration en ARN est déterminée par mesure de la densité optique (DO) d'absorbance à 260 nm²³, au moyen d'un Biophotomètre[®] (Eppendorf), dans une UVette[®] exempte d'ARNase (Eppendorf). Les échantillons sont ensuite stockés à -80 °C jusqu'à utilisation.

Des tests préliminaires d'extractions ont été réalisés sur des broyats obtenus à partir de 1, 2, 3 et 5 gammares mâles ou femelles (*Fig. II-13*). Chez les femelles, la quantité d'ARN totaux extraite augmente linéairement en fonction du nombre d'organismes utilisés, ceci jusqu'à 3 individus, seuil au-dessus duquel le rendement d'extraction chute brutalement.

²² Le RNA*later* est un réactif aqueux qui limite l'action des ARNases. Pénétrant rapidement dans les tissus, il assure le maintien de la qualité et la quantité des ARNs totaux durant le stockage des échantillons.

²³ Une unité de DO d'absorbance 260 nm équivaut à 40 µg.ml⁻¹ d'ARN.

Chez les mâles, ce seuil est atteint au-delà d'un organisme par broyat. Par conséquent, pour la suite de nos travaux, les extractions ont été réalisées sur un seul individu quelque soit le sexe.



Figure II-13 : Comparaison des quantités d'ARN totaux extraites en fonction du nombre d'organismes, mâles ou femelles, broyés par échantillon.
 Les valeurs sont exprimées comme une moyenne ± écart type (n = 3).

Enfin, il est important de souligner que la pureté et l'intégrité des ARN sont analysées pour quelques échantillons, au moyen d'un RNA-Bioanalyser[®] 2100 (Agilent).

3.4.3. Transcription inverse (i.e. reverse transcription ou RT) calibrée

• La calibration de la RT

La méthode de calibration de la réaction de transcription inverse (RT) utilisée dans ces travaux a fait l'objet d'un dépôt de brevet international (Brevet International n°WO2004.092414 enregistré le 17 avril 2004 déposé aux noms du CNRS et de l'UCB Lyon 1 par les co-inventeurs Laurent BEZIN et Anne MORALES).

Cet étalonnage est fondé sur l'ajout d'une quantité connue d'un ARN de synthèse possédant une queue polyA (SmRNA) dans le volume réactionnel final de chaque échantillon où s'opère la RT. Cet ARN de synthèse joue le rôle d'étalon externe hétérologue non-compétitif car (*i*) il possède une séquence nucléotidique distincte de toutes celles référencées

dans les banques de données, tout génome confondu, et (*ii*) la RT de cet ARN de synthèse n'interfère pas avec celle des ARN messagers (ARNm) endogènes aussi bien chez l'homme, la souris, le rat, *C. elegans*, et la drosophile. Les tests de compatibilité que nous avons préalablement effectués ont montré que l'utilisation du SmRNA n'interférait pas non plus avec les ARNm endogènes de *G. fossarum*.

Cette méthode d'étalonnage nous donne accès de façon fiable au rendement de la RT par le SmRNA dans chacun des tubes. Ce rendement sera par la suite utilisé pour normaliser l'ensemble des réactions de RT réalisées dans chacun des tubes. Cette procédure apparait comme une alternative aux méthodes de normalisation reposant sur la quantification de l'expression de gènes de ménage (*i.e.* "housekeeping gene") supposés invariants.

La réaction de RT

Afin de cibler exclusivement les ARNm contenus dans la solution d'ARN totaux, une amorce $polydT_{20}$ est utilisée pendant la réaction de RT.

Cette réaction est effectuée dans un volume de 40 μ l, contenant 24 μ l de solution d'ARN totaux purifiés ramenés à 41,7 ng. μ l⁻¹ (soit 1 μ g d'ARN totaux), et 16 μ l d'un prémélange réactionnel comprenant: 100 U de M-MLV Reverse Transcriptase RNAse H minus[®] (Promega), le tampon de l'enzyme, 0.8 mM de chacun des dNTP (Promega), 1 μ g d'amorces polydT₂₀, 80 U de RNAsin[®] (Promega) et 80 pg de SmRNA. Les microtubes utilisés sont des tubes à faible pouvoir de rétention (Axygen). Après une incubation de 90 min à 42 °C, la transcriptase inverse est inactivée par la chaleur (15 min à 70 °C). Les solutions d'ADN complémentaires (ADNc) obtenues pour chaque échantillon sont diluées dans 60 μ l d'eau ultra pure (Sigma) et conservées en fractions aliquotées de 5 μ l dans des tubes à faible pouvoir de rétention (Axygen) à -25 °C.

Il important de souligner que les RT de tous les échantillons correspondant à une même expérimentation ont été effectuées extemporanément à partir d'un pré-mélange réactionnel identique.

- 3.4.4. Amplification quantitative des ADNc de la Vtg par réaction de polymérisation en chaîne quantifiée en temps réel (PCR temps réel)
 - Principe de la réaction de PCR temps réel

Un cycle de PCR est constitué d'une étape de dénaturation à 95 °C des ADN double brin en ADN monobrin, d'une étape d'hybridation à 60 °C des amorces spécifiques de la séquence cible à amplifier et d'une étape d'élongation à 72 °C de l'ADN grâce à la Taq polymérase résistante aux hautes températures et aux désoxyribonucléotides libres dans le volume réactionnel.

La PCR quantitative est similaire à une PCR conventionnelle, excepté le fait que l'amplification des produits est visualisée en temps réel. En effet, l'accumulation de l'ADNc amplifié est suivi cycle par cycle au moyen d'un agent intercalant, le SYBR[®] Green I ($\lambda_{\text{excitation}} = 494 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{émission}} = 521 \text{ nm}$) introduit dans le milieu réactionnel. Cette molécule présente la propriété de n'émettre une fluorescence qu'une fois intercalée dans le petit sillon de la double hélice d'ADN. La fluorescence est lue à la fin de chaque étape d'élongation ce qui permet de la corréler à la quantité d'ADN double brin accumulée dans le milieu réactionnel (*Fig. II-14*).



Figure II-14 : Principe de l'utilisation du SYBR Green en PCR quantitative : (A) le mélange réactionnel initial contient de l'ADN dénaturé, les amorces et le SYBR Green non-lié ; (B) après hybridation des amorces, le SYBR Green se lie au double brin d'ADN et émet un signal fluorescent ; (C) pendant l'élongation, le nombre de molécules de SYBR Green liées augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence.

Le « point de sortie » (PS), exprimé en nombre de cycles de PCR, correspond à l'instant à partir duquel le signal fluorescent sort du bruit de fond. C'est à cet instant que l'amplification de l'échantillon entre dans sa phase exponentielle. La valeur de PS est inversement proportionnelle à la concentration initiale d'ADNc de l'échantillon. Le PS permet ainsi de comparer la quantité d'ADNc contenue dans le milieu réactionnel de chacun des échantillons à l'issue de la RT.

Pour cela, une gamme d'étalonnage doit être établie pour chaque fragment ADNc d'intérêt, dans des conditions d'amplification bien définies (*Fig. II-15*). La gamme étalon est réalisée à partir d'une solution d'ADNc purifiée de concentration connue, appelée aussi « standard pur ». Après dosage du standard pur, la concentration en $ng.\mu l^{-1}$ est convertie en nombre de copies. μl^{-1} grâce à la valeur de la masse molaire et du nombre d'Avogadro. Le standard pur subit une série de dilutions en cascade au 10^{eme} , dans de l'eau ultra pure, de sorte que la gamme (comprise entre 10 et 10^8 copies) encadre l'ensemble des PS des échantillons à doser. L'équation de la droite étalon permet ainsi (*i*) de mettre en relation le PS d'un échantillon donné avec le nombre de copies d'ADNc du gène d'intérêt présentes dans celui-ci avant la réaction de PCR et (*ii*) de calculer le coefficient d'efficacité de la réaction de PCR (compris communément entre 1,6 et 2) à partir de son coefficient directeur. L'équation de la droite :

Point de sortie = coefficient directeur x nombre de copies + ordonnée à l'origine



Figure II-15 : (A) PCR quantitative réalisée sur une série de dilutions d'un standard pur. (B) Relation correspondante entre les points de sortie (PS) et les log₁₀ des concentrations en ADNc (en nombre de copies) présentes dans chaque point de la gamme.

Choix des couples d'amorces

Les séquences de couples d'amorces sens et anti-sens ont été construites sur la base d'une séquence partielle de l'ARNm de la Vtg de *Gammarus pulex* (Sambles *et al.*, communication personnelle) à l'aide du logiciel de la «Universel Probe Library» (Roche Diagnostics). Les couples d'amorces ont été synthétisés par Invitrogen, puis leur validité a été testée dans les conditions de PCR en temps réel (décrite ci-après). L'identité des fragments d'ADNc amplifiés a été confirmée par séquençage sur 3100-Avant Genetic Analyser[®] (Applied Biosystems HITACHI).

Au final, le couple d'amorces retenu - $Vtg_{Gf-Forward}$: 5' TTT CGA TGG CGT GTC TTT TA 3' et $Vtg_{Gf-Reverse}$: 5' TCC TGT TGG TGC TGA ACT TG 3' – amplifie un fragment de 75 paire de bases.

• Obtention de la gamme étalon

La préparation du « standard pur » de la Vtg a été réalisée sur un thermocycleur conventionnel (PCR Express ; Hybaid) au moyen du même couple d'amorces utilisé sur LightcyclerTM (*i.e. VtgGf*) et de deux types d'ADN polymérase : la HotStar Taq polymérase (HST) (Qiagen) qui amplifie l'ADNc cible et la Proof Star DNA polymérase (Qiagen) qui corrige, grâce à son activité 3'-exonucléase, les erreurs de réplication produites par la HST²⁴. Le milieu réactionnel contenait 300 µM de dNTP, 0,5 µM de chacune des amorces spécifiques du produit de RT d'intérêt, 2 µl d'ADNc obtenus après RT d'ARNm extraits à partir de corps entier de G. fossarum et enfin 5 U de HST. Après une incubation de 13 min à 95 °C, la Proof Star DNA polymérase (0,05 U) est ajoutée, suivi d'une nouvelle incubation à 95 °C durant 2 min. L'ADNc cible est alors amplifié pendant 30 cycles comprenant une étape de dénaturation à 94 °C durant 10 s, une étape d'hybridation à 60 °C durant 60 s et enfin, une étape d'élongation à 68 °C durant 25 s. Après l'étape d'élongation finale (68 °C ; 5 min), le produit de la PCR est purifié à l'aide de la trousse de purification PCR MiniElute[®] (Qiagen). Le produit d'amplification est dosé par spectrophotométrie d'absorbance à 260 nm²⁵, au moyen d'un biophotomètre (Eppendorf) dans une UVette stérile, et sa taille est vérifiée par migration électrophorétique dans un gel d'agarose à 1,5%.

La gamme de dilution du standard pur de la Vtg est amplifiée en PCR temps réel selon les conditions décrites ci-après. Le coefficient d'efficacité de la réaction est de 1.945. La droite d'étalonnage est présentée en *Figure II-16*. Le standard dilué 10^{-4} X est stocké à -25 °C en fractions aliquotées de 5 µl dans des tubes à faible pouvoir de rétention (Axygen). Seul ce

²⁴ L'utilisation conjointe de ces deux polymérases permet d'obtenir un « standard pur » pour lequel les erreurs de réplication sont minimisées.

²⁵ Une unité de DO d'absorbance 260 nm équivaut à 50 µg.ml⁻¹ d'ADN.

point de la gamme étalon est ensuite amplifié durant les essais de routine dans le but de corriger les éventuels décalages de l'ordonnée à l'origine.



Figure II-16 : Droite d'étalonnage de la quantification des ADNc de la Vtg par PCR temps réel au moyen du couple d'amorces VtgGf, dans les conditions d'amplification décrites précédemment.

• Amplification des ADNc d'intérêt en PCR temps réel

Les ADNc d'intérêt (*i.e.* Vtg et SmRNA) sont quantifiés par la technique de PCR en « temps réel » à l'aide du thermocycleur LightCyclerTM (Roche). Ce thermocycleur fonctionne selon la méthode de l'air pulsé, permettant une réaction de PCR rapide, sensible et hautement reproductible. L'utilisation de fins capillaires en verre de borosilicate résistants aux hautes températures permet une bonne homogénéité des variations de température sur l'ensemble du volume réactionnel. Le logiciel de traitement des données associé au LightCyclerTM permet une analyse de la réaction de PCR dans sa phase exponentielle par la méthode du « maximum de la dérivée seconde ». Cette méthode, qui consiste à calculer le cycle au cours duquel l'efficacité de la PCR est la plus importante, permet de définir les PS de chaque échantillon de manière totalement indépendante du manipulateur.

Les séquences des amorces et les conditions d'amplification du ScDNA sont protégées par le brevet WO2004.092414.

L'amplification par PCR en "temps réel" des ADNc de la Vtg a été effectuée au moyen de la trousse QuantiTect SYBR Green I[®] (Qiagen). Le milieu réactionnel, d'un volume de

20 µl contenu dans le tube capillaire, est composé de 5 µl d'ADNc de l'échantillon, 4 µl d'eau ultra pure, 1 µl d'un mélange d'amorces VtgGf-_{Froward} et VtgGf-_{Reverse} à la concentration de 10 µM chacune et 10 µl du QuantiTect Master Mix 2X[®]. Un échantillon standard (*i.e.* un point de la gamme étalon ; voir paragraphe précédent) ainsi qu'un blanc sans ADNc sont systématiquement analysés pour chaque run de PCR temps réel.

Après une préincubation de 15 min à 95 °C permettant d'activer l'ADN polymérase, l'amplification se déroule sur 45 cycles composés d'une étape de dénaturation de 15 s à 94 °C, une étape d'hybridation de 30 s à 58 °C et une étape d'élongation de 6 s à 72 °C. Pour finir, la courbe de fusion est déterminée au cours d'une dernière étape qui débute par la dénaturation de tous les ADNc présents dans le milieu réactionnel grâce à une montée de température rapide (20 °C/s) jusqu'à 95 °C. Puis, la température est descendue à la même vitesse jusqu'à une température de 10 °C supérieure à la température d'hybridation (68 °C) pendant 20 s pour permettre l'hybridation de tous les ADNc présents. Enfin, la température est très lentement élevée à la vitesse de 0,1 °C/s, accompagnée d'une lecture de fluorescence en continue. La décroissance de la fluorescence associée à la dénaturation lente des ADNc permet d'obtenir la température de fusion²⁶. Chaque produit de PCR possède une température de fusion qui lui est propre. Quand la PCR n'engendre qu'un seul produit d'amplification, la dérivée de la courbe de fusion ne présente qu'un seul pic.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

²⁶ Température pour laquelle 50 % des ADNs bicaténaires ont été dénaturés.

CHAPITRE III : SYNTHESE DES TRAVAUX

Ce chapitre est une synthèse des principaux résultats obtenus au cours de cette thèse. Ces résultats sont plus amplement détaillés dans les publications et les notes présentées dans les chapitres IV et V.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

1. MESURE ET INTERPRETATION DE L'ACTIVITE DES CHOLINESTERASES

1.1. Caractérisation et sensibilité des activités cholinestérasiques

Le nombre d'isoforme de l'enzyme cholinestérase (ChE), ainsi que leur sensibilité visà-vis des composés anti-ChE peuvent varier en fonction du taxon considéré. Ainsi, la caractérisation biochimique et pharmacologique de ces activités doit être conduite comme une première étape avant leur proposition et leur utilisation comme biomarqueur chez toute nouvelle espèce test (Garcia-de la Parra *et al.*, 2006). Très peu de travaux de caractérisation ont été menés chez les invertébrés d'eau douce et, à notre connaissance, aucune étude n'a été conduite chez les amphipodes.

Dans le cadre de ces travaux, nous avons (*i*) caractérisé les activités ChE présentes chez différentes espèces d'invertébrés dulçaquicoles et (*ii*) comparé leur différence de sensibilité à l'aide d'un insecticide organophosphoré couramment utilisé, le chlorpyrifos. Dans un premier temps, ces travaux ont été réalisés chez notre espèce d'intérêt, *Gammarus fossarum* (Publication n°1), puis transféré chez deux autres espèces modèles utilisées au laboratoire d'écotoxicologue du Cemagref, les gastéropodes *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis* (Publication n°2).

Caractérisation

D'un point de vue méthodologique, la caractérisation a consisté (*i*) à évaluer la préférence de(s) l'enzyme cholinestérase(s) vis à vis de divers substrats spécifiques : l'acétylthiocholine (ATCh), la butyrylthiocholine (BTCh) et la propionylthiocholine (PTCh), puis (*ii*) à déterminer la sensibilité, *in vitro*, de ces activités vis-à-vis de 3 inhibiteurs sélectifs : l'ésérine (spécifiques de ChE en générale), le BW284c51 (spécifique de l'acétylcholinestérase de vertébré) et l'iso-OMPA (spécifique de la butyrylcholinestérase de vertébré).

G. fossarum et *V. piscinalis* possèdent une seule isoforme de ChE présentant les propriétés d'une acétylcholinestérase (AChE) de vertébré, avec (*i*) une forte préférence pour le substrat ATCh et (*ii*) une forte sensibilité à l'ésérine et au BW284c51, mais pas vis-à-vis de

l'iso-OMPA. Des résultats similaires ont été rapportés chez différentes espèces de crustacés marins et estuariens (*e.g.* Forget et Bocquene, 1999; Forget *et al.*, 2002; Frasco *et al.*, 2006; Garcia-de la Parra *et al.*, 2006), ainsi que chez des bivalves et des gastéropodes (*e.g.* Mora *et al.*, 1999; Kristoff *et al.*, 2006; Bonacci *et al.*, 2008). En revanche, des isoformes semblent coexister cher *P. antipodarum*. Une isoforme prédominante avec des propriétés proches d'une AChE de vertébré mais avec une affinité équivalente pour l'ATCh et le PTCh. Bocquené *et al.* (1997) ont observé des résultats similaires chez l'huître *Crassostrea gigas*. L'autre isoforme, mineure, présente les propriétés d'une butyrylcholinestérase (BChE) puisque l'activité mesurée avec le substrat BTCh, bien que faible, est sensible à l'ésérine et à l'iso-OMPA, mais pas au BW284c51.

• Sensibilité in vivo

Les essais d'exposition à des concentrations de chlorpyrifos (CPE) environnementalement réalistes ont souligné une différence de sensibilité *in vivo* entre les 3 organismes étudiés. *G. fossarum* s'est montré le plus sensible, tant en terme d'inhibition de l'activité AChE (CI₅₀-96 h = $0.35 \ \mu g.1^{-1}$) qu'en terme de survie (CL₅₀-96 h = $0.62 \ \mu g.1^{-1}$). De fortes inhibitions de l'activité AChE ont également été observées chez *P. antipodarum* mais pour des concentrations en CPE plus élevées (CI₅₀-96 h = $3.4 \ \mu g.1^{-1}$ et CI₅₀-168 h = $1 \ \mu g.1^{-1}$), En revanche, aucun effet sur la survie n'a été observé chez cette espèce. Enfin, *V. piscinalis* s'est montré complètement insensible au CPE.

Ces résultats confirment la forte sensibilité des crustacés vis-à-vis des insecticides organophosphorés (Kuhn et Streit, 1994; Forget *et al.*, 2002), et soulignent l'intérêt d'utiliser *G. fossarum* comme organisme test.

1.2. Impact de facteurs confondants

L'utilisation appropriée d'une activité enzymatique comme biomarqueur requiert une bonne connaissance de l'impact des facteurs biologiques et environnementaux, autre que les polluants, qui peuvent moduler son niveau et ainsi biaiser l'interprétation de sa mesure comme indicateur d'une contamination (Sheehan et Power, 1999; Menezes *et al.*, 2006). Dans ce contexte, nous avons cherché à évaluer l'influence de facteurs de différentes natures (*i.e.* méthodologiques, biotiques et environnementaux) sur le niveau d'activité basal de l'activité AChE chez *Gammarus fossarum* (Note n°1 et Publication n°3).

Impact de la méthode et de la durée de conservation des échantillons sur l'activité AChE

Le stockage et la conservation des échantillons est une étape critique dans la préparation des échantillons dans les études de biomonitoring. Des mesures d'activité AChE ont été pratiquées sur des échantillons de *G. fossarum* soumis à différentes durées de conservation à -80 °C sous forme congelée ou lyophilisée (Note n°1). Nos résultats ont montré que la congélation comme la lyophilisation assurent une activité enzymatique constante, même après plusieurs mois de stockage. Ces résultats sont en accord avec les observations de Phillips *et al.* (2002) et Pathiratne *et al.* (2008) chez le poisson et celles de Mora (1998) chez des mollusques bivalves. La congélation a toutefois été retenue pour la suite de nos travaux car cette méthode de conservation assure une meilleure reproductibilité des mesures.

Normalisation de l'activité AChE

L'activité AChE est communément normalisée par la quantité de protéines contenue dans les extraits d'échantillons (*e.g.* fraction S9 ; voir section II.3.1.2), ceci dans le but de corriger les éventuelles différences d'efficacité d'extraction lors du broyage. Cependant, nos résultats ont montré que chez *G. fossarum*, la quantité totale de protéines peut varier de façon indépendante de la fraction enzymatique, ceci en fonction de changements physiologiques tels que la reproduction (*Figure III-1* ; Publication n°4). Des observations similaires ont été rapportées chez différentes espèces de mollusque (Radenac *et al.*, 1998; Owen *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2004; Leinio et Lehtonen, 2005) ainsi que chez *Daphnia magna* (Printes et Callaghan, 2004). Ces résultats soulignent les limites de la normalisation par la quantité de protéine puisque celle-ci constitue une source de variabilité pouvant conduire à la sur- ou sous-estimation du niveau du base de l'activité AChE. En accord avec les conclusions d'Owen *et al.* (2002), les activités AChE mesurées chez *G. fossarum* seront exprimées en nmol.min⁻¹.



Figure III-1 : Relations entre la concentration en protéine (g.l⁻¹) et l'activité AChE non-normalisée (nmol.min⁻¹) ou l'activité AChE normalisée (nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) mesurées dans des extraits de femelle à différents stades de la reproduction (A et B) et de mâles analysés dans les cadre d'une étude de terrain (C et D).

 (\bullet) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées et des œufs fraichement pondus dans le marsupium; (\circ) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées chez lesquelles les œufs ont été manuellement retirés du marsupium; (\blacktriangle) : femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades et des juvéniles fraichement éclos dans le marsupium; (Δ) : femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades chez lesquelles les juvéniles ont été manuellement retirés du marsupium; (\bigstar) : mâles.

Effets de facteurs biotiques et choix d'un organisme standard

Dans une perspective d'application de l'activité AChE comme outil robuste et fiable pour des études de biomonitoring, nous avons souhaité définir une classe "d'organisme standard" permettant de minimiser la variabilité inter-individuelle. Pour cela, les effets des principaux facteurs biotiques – le sexe, le statut reproducteur (uniquement chez les femelles) et la taille (*i.e.* poids) - sur le niveau de base de l'activité AChE de *G. fossarum* ont été évalués (Publication n°4).

En accord avec la majorité des résultats rapportés chez le poisson (Payne *et al.*, 1994; Flammarion *et al.*, 2002a; Solé *et al.*, 2006; Pathiratne *et al.*, 2008) et les crustacés (Forget *et al.*, 2003; Solé *et al.*, 2006), aucun effet du sexe sur cette activité enzymatique n'a été observé (*Fig. III-2*). En revanche des différences d'activité ont été observées chez les femelles en fonction de leur statut reproducteur. (*Fig. III-2*). Ces différences s'expliquent en partie par la présence/absence d'ovocytes matures dans les gonades qui peuvent représenter jusqu'à 15 % de la masse corporelle de la femelle et ainsi entraîner une dilution biologique de la fraction enzymatique au cours de la procédure d'extraction. (*i.e.* augmentation du volume de tampon de broyage).



Figure III-2 : Activité AChE (nmol.min⁻¹) mesurée sur des pools de Gammarus fossarum mâles et femelles (4 stades de reproduction différents).

Les données sont rapportées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). L'absence de différence significative est indiquée par une lettre identique (p > 0.05). (\bigcirc) : mâles; (\bigcirc 1) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées et des œufs fraichement pondus dans le marsupium; (\bigcirc 2) : femelles en début de cycle de reproduction avec des gonades peu développées chez lesquelles les œufs ont été manuellement retirés du marsupium; (\bigcirc 3): femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades et des juvéniles fraichement éclos dans le marsupium; (\bigcirc 4): femelles en fin de cycle de reproduction portant des ovocytes matures dans leurs gonades chez lesquelles les juvéniles ont été manuellement retirés du marsupium

Parmi les facteurs biotiques testés, la taille (*i.e.* le poids) s'est révélée être le plus influent. Nos résultats ont montré que le niveau d'activité AChE est inversement proportionnel au poids et à la taille des gammares (*Fig. III-3*). La forte activité observée chez les juvéniles diminue de manière exponentielle durant les premiers stades de vie, puis tend à se stabiliser chez les adultes. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés chez les poissons (Burgeot *et al.*, 1996; Flammarion *et al.*, 2002b) et quelques espèces de crustacé tels que *Daphnia magna* (Printes et Callaghan, 2003), le copépode *Tigriopus brevicornis* (Forget et Bocquene, 1999) et la crevette *Palaemonetes pugio* (Hoguet et Key, 2007).

Les gammares juvéniles présentent d'importants niveaux d'activité enzymatique, ce qui représente un atout méthodologique de dosage pour détecter une inhibition. De plus, les juvéniles sont probablement plus sensibles vis-à-vis d'une contamination aux insecticides (Buchwalter *et al.*, 2004). Cependant, ils sont difficilement échantillonnables durant certaines périodes de l'année, et de faibles écarts de poids, chez ces individus, induisent une importante variabilité d'activité AChE. Contrairement aux juvéniles, les adultes peuvent être échantillonnés facilement durant toute l'année. De plus, chez cette catégorie d'organismes, la relation taille / AChE est faible. Par conséquent, les gammares de phénotype mâle d'un poids de 15-20 mg ont été retenus comme organisme test pour la suite de nos travaux afin de proposer une méthodologie de prélèvement simple et rapide et surtout proposer une méthodologie de trobuste pour la mesure de cette activité.



Figure III-3 : Relation entre l'activité AChE (nmol.min⁻¹) et le poids individuel moyen (mg) obtenue pour six classes de taille différentes. Les données sont reportées comme des valeurs individuelles. (\blacklozenge): classe 1; (\diamondsuit):classe 2; (\blacktriangle):classe 3; (\bigtriangleup):classe 4; (\Box): class 5; (\blacksquare): class 6

• Suivi de la variabilité naturelle et définition d'une valeur de référence et des valeurs seuils

Cette étude avait comme objectif de déterminer la variabilité naturelle de l'activité AChE chez des "organismes standard" (précédemment définis) prélevés au sein de populations soumises à des conditions environnementales typiques des rivières françaises (Publication n°2).

L'activité AChE a été mesurée au cours d'un suivi de terrain de 13 mois (janvier 2007- janvier 2008), sur des gammares échantillonnés sur des stations en amont de 4 rivières différentes : la Bourbre, l'Agny (*i.e.* affluent de la bourbre), l'Ardière et la Morcille (*i.e.* affluent de l'Ardière) (*Fig. III-4*). Les bassins versant de la Bourbre et de l'Ardière présentent

d'importantes variations de température au cours de l'année (*i.e.* 2-17 °C) et se distinguent l'un de l'autre par une importante différence de conductivité (*i.e.* respectivement 500 et $100 \ \mu\text{S.cm}^{-1}$ en moyenne). Selon les données enregistrées par le Réseau National des Bassins (mesures d'Indice Biologique Global Normalisé), toutes les stations présentent une eau de bonne qualité. Toutefois, seule la station de la Morcille peut être considérée comme non soumise ou exempte de pressions anthropiques. Les autres stations de prélèvement, bien qu'en tête de bassin, sont localisées à proximité de zones agricoles.

Aucune relation n'a été trouvée entre le niveau d'activité AChE et la valeur des principaux paramètres physicochimiques de l'eau (*i.e.* température, pH, conductivité et débit) pour les 4 stations étudiées. Ces résultats sont en accord avec ceux que nous avons obtenus en conditions contrôlées de laboratoire et qui ne montraient aucun effet de la température sur cette activité après 2 et 15 jours d'exposition à 6, 12, 18 et 24 °C, ceci constituant un atout fort pour des études de biomonitoring. En revanche, ces observations vont à l'encontre de précédents travaux, mettant en évidence que le pH et la température peuvent moduler l'activité AChE chez plusieurs espèces d'invertébrés (Scaps et Borot, 2000 ; Robillard *et al.*, 2003 ; Pfeifer *et al.*, 2005 ; Menezes *et al.*, 2006 ; Cailleau *et al.*, 2007).

L'activité AChE mesurée sur les gammares de la Morcille s'est montrée constante tout au long de l'année, avec une moyenne annuelle de 8.4 ± 0.5 nmol.min⁻¹ et un coefficient de variation de 6.2 % (Fig. III-4A), montrant qu'il n'existe aucune modulation saisonnière de cette activité enzymatique chez cette espèce. Ces résultats vont à l'encontre des observations rapportées chez le copépode T. brevicornis (Forget et al., 2003), ainsi que chez diverses espèces de bivalves (Robillard et al., 2003 ; Lau et al., 2004 ; Leinio et Lehtonen, 2005), qui montrent que les niveaux d'AChE varient de manière saisonnière. Toutefois, rappelons que dans ces dernières études les niveaux d'activité AChE sont normalisés par la teneur en protéines qui peut être en grande partie responsable de ces variations (Radenac et al., 1998). Pour les autres rivières (Bourbre, Agny et Ardière), des activités moyennes annuelles similaires ont été obtenues. Toutefois, la variabilité de l'activité AChE des gammares prélevés sur ces 3 stations était plus importante que celle observée sur la Morcille, avec des coefficients de variation respectifs de 8.4, 11.2 et 12.4 % pour la Bourbre, l'Ardière et l'Agny. Cette augmentation de variabilité résulte notamment de diminutions d'activité observées en avril sur l'Ardière et la Bourbre, en mai sur la Bourbre et l'Agny, ainsi que d'octobre à janvier sur l'Agny (Fig. III-4B et C et D). Ces résultats montrent d'une part qu'il n'existe effectivement pas de variation de l'AChE et d'autre part que ces inhibitions sont certainement liées à une exposition à des composés anticholinestérasiques.



Figure III-4: Variations annuelles de l'activité AChE (nmol.min⁻¹) mesurée chez des Gammarus fossarum collectés de Janvier 2007 à Janvier 2008 en amont de la Morcille (A), de l'Ardière (B), de la Bourbre (C) et de l'Agny (D).

Les données sont reportées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). La ligne continue représente la moyenne annuelle ($8.4 \pm 0.5 \text{ nmol.min}^{-1}$), et les lignes en pointillés l'intervale de confiance à 95% (7.4–9.5 nmol.min⁻¹), des valeurs d'activité AChE obtenues pour la Morcille.

Sur la base des résultats obtenus sur la Morcille, nous avons pu définir une valeur de référence (*i.e.* moyenne annuelle) et des valeurs seuils (*i.e.* intervalle de confiance à 95 %) au-delà desquelles l'activité AChE mesurée peut être interprétée comme significativement différente d'un niveau normal. Les valeurs obtenues sont de 8.4 nmol.min⁻¹ pour la valeur de référence et de 7.4 et 9.5 nmol.min⁻¹ pour la valeur seuil inférieure et supérieure. Il est généralement admis qu'une inhibition d'activité AChE doit excéder 20-30 % des valeurs observées sur le site de référence pour refléter une exposition à un composé anti-ChE (Escartin et Porte, 1996 ; Owen *et al.*, 2002). Dans le cas de *G. fossarum*, une inhibition supérieure à 12 % (qui correspond à la différence entre la valeur de base, 8.4 nmol.min⁻¹ et la valeur seuil inférieure 7.4 nmol.min⁻¹) peut être interprétée comme une modulation résultante de l'exposition à un contaminant. Ainsi, il est possible de conclure qu'aucune contamination et/ou exposition significative n'a été observée sur la Bourbre au cours de notre suivi. En

revanche, les inhibitions de 20 % observées en avril sur l'Ardière, ainsi qu'en mai et de d'octobre à janvier sur l'Agny suggèrent la présence de composés anti-cholinestérasiques à ces stations (*Fig. III-4B et D*).

1.3. Interprétation de l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase en terme d'effet au niveau de l'individu

Actuellement, un des enjeux majeurs en écotoxicologie est d'établir les liens entre la mesure de biomarqueurs au niveau sub-individuel et des réponses individuelles en lien avec la *fitness* de l'organisme (Mc Carthy et Shugart, 1990; Jensen *et al.*, 1997; Baird *et al.*, 2007). Bien que l'AChE remplisse une fonction physiologique essentielle (*i.e.* neurotransmission), peu d'études se sont focalisées sur les répercutions d'une inhibition de cette activité enzymatique au niveau de réponses individuelles considérées comme écologiquement pertinentes. Le comportement est une de ces réponses car il conditionne directement l'habilité d'un organisme à évoluer dans son milieu, donc à terme à survivre et à se reproduire (Engenheiro *et al.*, 2005).

L'objectif de cette étude était d'établir les liens entre l'inhibition de l'activité AChE et des altérations du comportement chez *Gammarus fossarum*. Pour cela, l'activité AChE, le taux alimentaire ainsi que l'activité locomotrice ont été mesurés chez des gammares exposés durant 96 h à deux types d'insecticide anti-ChE : un insecticide carbamate, le méthomyle (MT), et un insecticide organophosphoré, le chlorpyrifos (CPE) (Publication n°4).

Les résultats de cette étude ont permis de mettre en évidence qu'une inhibition d'activité AChE ≥ 50 % a des effets directs sur le comportement alimentaire et locomoteur du gammare (*Fig. III-5*). Cette hypothèse est notamment renforcée par le fait que les relations quantitatives établies entre l'activité AChE et les différents paramètres comportementaux sont proches, bien que les composés testés appartiennent à deux différentes familles d'anti-ChE (organophosphoré et carbamate). En effet, pour des inhibitions d'AChE comprises entre 50 et 100 %, la déviation moyenne des valeurs d'inhibition prédites au moyen de la fonction polynomiale obtenue était de 13 ± 3 % pour la locomotion et 20 ± 7 % pour le taux d'alimentation. Par exemple, notre modèle prédit qu'une inhibition de l'activité AChE de 60 % induit une inhibition comprise entre 23 et 38 % pour la locomotion, et 72 et 94 % pour le

taux d'alimentation. Ceci souligne clairement que le taux d'alimentation est un paramètre comportemental beaucoup plus sensible vis-à-vis d'une inhibition d'AChE que ne l'est la locomotion. Une récente étude de modélisation, supportée par des observations de terrain, a démontré que la viabilité des populations de *Gammarus sp.* est menacée au-delà du seuil critique de 50 % d'inhibition du taux d'alimentation (vu dans Baird *et al.*, 2007). Ces dernières données soulignent l'importance d'établir des bases pour interpréter l'activité AChE chez *Gammarus fossarum* comme un biomarqueur d'effets sur des réponses écologiquement pertinentes telles que la prise alimentaire.



Figure III-5 : Relation entre l'activitié AChE (% du control) et le taux d'alimentation (% of control ; A) ou la locomotion (% of control ; B) chez G. fossarum après 96 h d'exposition à cinq concentrations de chlorpyrifos (♦ CPE) et six concentration de méthomyle (△ MT) témoins inclus.

Les données sont reportées comme des moyennes \pm écart type (n = 5 pour l'activité AChE et le taux d'alimentation, et n = 18 pour la locomotion). La courbe en rouge (\blacklozenge ; indiquée par des flèches sur le graphe A) correspond à la relation obtenue entre le taux d'alimentation et l'activité AChE mesurés durant les 48 dernières heures d'exposition au chlorpyrifos (voir les résultats et la discussion de la publication n°4).

Des relations qualitatives ont été rapportées précédemment chez d'autres espèces d'invertébrés d'eau douce comme chez le mollusque *Corbicula fulminea* (Cooper et Bidwell,

2006) et l'oligochaete *Lumbriculus variegatus* (Kristoff *et al.*, 2006) exposés à des organophosphorés. Cependant, à notre connaissance, notre étude est la première à établir des relations quantitatives entre l'activité AChE et des altérations du comportement chez un invertébré aquatique.

L'utilisation de composés appartenant à deux familles d'inhibiteur (i.e. CPE et MT), a également permis de démontrer que la mortalité n'est pas directement liée à l'inhibition de l'AChE chez G. fossarum. En effet, aucun impact sur la survie n'a été observé chez les gammares traités avec le MT, bien qu'une inhibition de l'activité AChE de 65 % ait été mesurée après seulement 24 h d'exposition à la plus forte concentration. En revanche, chez les organismes exposés au CPE, des effets sur la survie ont été observés pour des inhibitions de 50 % après seulement 24-48 h d'exposition. Il est clair que l'inhibition d'AChE chez les organismes à respiration pulmonée (e.g. oiseaux et mammifères) conduit rapidement à leur mort par asphyxie. En revanche, l'impact d'une telle inhibition sur la survie des organismes aquatiques à respiration branchiale (i.e. poissons et invertébrés) n'a pas été entièrement élucidé, puisque l'eau qui traverse passivement les organes respiratoires permet le transfert d'oxygène (Barata et al., 2004). Nos résultats viennent renforcer l'hypothèse selon laquelle la toxicité, à court terme, des composés anti-ChE n'est pas basée sur l'inhibition d'activité AChE (Schoor et Brausch, 1980; Printes et Callaghan, 2004). Par exemple, comme pour tous les organophosphorés (OP) de type thion, le CPE doit être transformé en forme oxon pour devenir un inhibiteur efficace (Schoor et Brausch, 1980). Cependant, cette forme oxon est également reconnue pour induire un stress oxydant marqué, ce qui explique que les mortalités apparaissent parallèlement à l'inhibition d'AChE. Ainsi, les différences interspécifiques de sensibilité face à une inhibition d'AChE induite par les OP, comme celle observée entre G. fossarum et P. antipodarum (Publication n° 1 et 2), sont certainement liées aux mécanismes de biotransformation mis en place par les organismes (Takimoto et al., 1987).

1.4. Application in situ

La mise en place et l'interprétation *in situ* de la mesure de biomarqueurs chez les invertébrés d'eau douce est encore rare et se confrontent à plusieurs verrous scientifiques tels que l'impact de facteurs confondants ou les liens existant entre la réponse d'un biomarqueur et les effets pour l'organisme.

Dans ce contexte, après avoir défini une méthodologie fiable et robuste pour mesurer et interpréter l'activité AChE chez *G. fossarum* (Publication n°1, 3 et 4 et Note n° 1), nous avons appliqué ce biomarqueur à l'occasion de plusieurs campagnes de terrain. Le but des ces applications était d'évaluer la présence et l'impact de molécules anti-ChE dans des effluents de stations d'épurations ainsi que d'un rejet minier sur des cours d'eau présentant des pressions anthropiques très contrastées (Note n°2).

Les données accumulées durant ces travaux (*Figure III-6*) confirment la pertinence des valeurs de références et seuils précédemment définies (Publication n°3), ainsi que la robustesse et la fiabilité de la méthodologie mise en place pour mesurer l'AChE chez *G. fossarum*. Aucun impact délétère sur l'activité AChE n'a été observé pour les différents rejets urbains (station d'épuration) et miniers, confirmant que les composés associés à ces rejets n'ont pas ou peu de potentiel anti-ChE. En revanche, des inhibitions de l'ordre de 20 % ont été observées sur des stations prises comme référence car en amont de la station d'épuration, mais situées dans des zones agricoles. Nos précédents travaux sur les relations entre la modulation de cette activité et les effets au niveau individuel (Publication n°4) nous permettent de conclure que les niveaux de contamination observés, en lien avec les inhibitions d'AChE observées, n'ont pas d'impact direct ni sur la locomotion, ni sur l'alimentation de cette espèce.

Ces travaux sont une illustration de l'intérêt et du pouvoir de disposer de valeurs seuils définies à partir de l'étude de la variabilité naturelle du biomarqueur choisi et ainsi de pouvoir conclure sur la pertinence des stations choisies comme référence. L'objectif ultime étant de se détacher de la nécessité d'avoir une station de référence pour évaluer la qualité biologique d'un milieu.


Figure III-6 : Activité AChE (moyennes ± écart type, n = 5) mesurée chez Gammarus fossarum exposé sur les différentes stations étudiées et situées en amont et aval de stations d'épuration (i.e. Saône, Ardière, et Bourbre) ou d'un rejet minier (i.e. Amous).

A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. Ligne bleu : valeur de référence et lignes en pointillée rouge : limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité AChE est significativement différente de son niveau de base naturel (Publication 3). Les points rouges représentent les stations définies a priori comme référence (Amont des rejets).

2. DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS DE PERTURBATION ENDOCRINIENNE EN LIEN AVEC LA REPRODUCTION

2.1. Caractérisation du cycle de reproduction chez la femelle

Peu de biomarqueurs robustes et fiables sont aujourd'hui disponibles pour diagnostiquer spécifiquement une perturbation endocrinienne de la reproduction chez les crustacés et notamment chez des espèces d'eau douce couramment utilisées en écotoxicologie telles que *Gammarus sp.*. Cela résulte principalement d'un manque de connaissances de leur système endocrinien mais également d'une description limitée des processus biologiques liés à la reproduction (*i.e.* cycle de reproduction).

Notre première démarche a consisté à réaliser une description fine du cycle de reproduction de *Gammarus fossarum* dans le but de (*i*) définir des paramètres physiologiques permettant de déterminer le statut reproducteur des organismes femelles, ce qui est crucial pour le développement de marqueurs spécifiques de perturbations endocrines, et (*ii*) proposer un test de reprotoxicité qui puisse permettre une meilleure compréhension du mode d'action des produits chimiques sur les différents processus physiologiques en lien avec le succès reproducteur (*i.e.* la mue, la fertilité, la fécondité, la croissance de l'ovocyte et le développement embryonnaire) (Publication n°5).

Nous avons montré que chez les femelles *G. fossarum* le cycle d'inter-mue et le cycle de reproduction se déroulent de manière parfaitement synchrone. Chez les femelles en activité sexuelle, après chaque exuviation, la croissance gonadique (*i.e.* vitellogénèse secondaire) et le développement embryonnaire se mettent en place simultanément. Sous conditions contrôlée de laboratoire, la durée du cycle de reproduction de *G. fossarum* est de 30 jours à 12 °C. Ce résultat est en accord avec les durées de développement embryonnaire observées par d'autres auteurs chez la même espèce (Pöckl et Humpesch, 1990; Sutcliffe, 1993).

A notre connaissance, la caractérisation du cycle d'inter-mue n'a été réalisée que chez une espèce d'amphipode marin, *Orchestia gammarella* (Blanchet-Tournier, 1980). Sur la base de ces travaux, nous avons défini six stades de mue chez *G. fossarum*, ceci au moyen d'observation microscopique du développement des tissus à l'extrémité des 3^{ème} et 4^{ème} paires de périopodes : 2 en post-mue (*i.e.* A et B), 2 en inter-mue (*i.e.* Ca et Cb) et 2 en pré-mue (*i.e.* D1 et D2) correspondant à 20, 45 et 35 % de la durée totale du cycle (*Fig. III-7*). Chaque stade de mue est caractérisé par un stade de développement embryonnaire (*Fig. III-8*) et une surface ovocytaire (mesurée au moyen d'observation *in toto* à travers de la cuticule) (*Tab. III-1*) spécifiques. L'analyse de la surface et de la structure histologique des ovocytes (*Fig. III-9*) montrent que la vitellogénèse secondaire (*i.e.* accumulation de vésicules vitellines et de globules lipidiques dans les ovocytes, associée à une importante augmentation de leur taille), prend réellement place durant le stade C2 (en fin de phase d'inter-mue). Toutefois, la forte décroissance du nombre d'ovocytes par femelle observée entre les stades d'inter-mue C1 et C2 met en évidence que tous les ovocytes pré-vitellogéniques ne rentrent pas en vitellogénèse secondaire.





Stade A : cuticule du dactylopodite fine et molle; Stade B : épaississement de la cuticule du dactylopodite ; C1 : rétractation de l'épiderme du dactylopodite ; C2 : formation de fentes circulaires sur l'épiderme du dactylopodite causée par son invagination ; D1 : formation d'une cuticule sur le dactylopodite néoformé ; D2 : formation d'une cuticule sur les soies néoformées du protopodite.



Figure III-8 : Répartition des différents stades de développement embryonnaire observée dans les marsupium des femelles G. fossarum en fonction des stades de mue (n = 20 femelles par stade de mue).

Du fait, de la courte durée du stade A, les stades de post-mue (*i.e.* AB) ont été regroupés en stade AB. Stade 1 : Embryon nouvellement fertilisé, ovale et indifférencié ; Stade 2 : Apparition de la ventroflexion ; Stade 3 : Apparition du céphalothorax et segmentation des appendices ; Stade 4 : Les yeux sont clairement visibles, et les appendices sont complètement développés ; Stade 5 : Juvénile nouvellement éclos.

<i>de mue chez la femelle</i> G. fossarum			
Stade de mue	Surface ovocytaire	Nombre d'ovocytes	Nombre d'embryons
	(μm^2)		
AB	$21\ 900 \pm 1\ 800$	2.5 ± 0.25	1.3 ± 0.18
C1	$39\ 400\pm 4\ 500$	2.4 ± 0.43	1.4 ± 0.35
C2	$106\ 000\pm 6\ 800$	1.6 ± 0.17	1.6 ± 0.24 .
D1	$133\ 000 \pm 3\ 300$	1.6 ± 0.28	1.4 ± 0.38
D2	$164\ 000\pm 5\ 800$	1.5 ± 0.35	n.d.

 Table III-1: Surface ovocytaire (moyenne \pm écart type, n = 15) et nombre d'ovocytes et d'embryons (moyenne \pm écart type, n = 15; normalisée par la taille de la femelle) mesurés au cours des différents stades de mue chez la femelle C fosserum

n.d. : non determiné, les juvéniles nouvellement éclos n'ont pas été considérés, car ils peuvent quitter librement le marsupium.



Figure III-9 : Evolution de la structure histologique de l'ovaire au cours du cycle d'intermue des femelles chez Gammarus fossarum.

Du fait, de la courte durée du stade A, les stades de postmue (*i.e.* AB) ont été regroupés en stade AB.

cdf, cordon folliculaire ; cf, cellule folliculaire ; gl, gouttelette lipidique ; gv, globule vitellin ; O, oviducte ; odvs, ovocyte en début de vitellogénèse secondaire ; ofvp, ovocyte en fin de vitellogénèse primaire ; ovp, ovocyte en vitellogénèse primaire ; vg, vésicule germinative ; zg, zone germinative. Les barres d'échelle représentent 100 μ m.

En revanche, contrairement à d'autres espèces d'amphipodes (*e.g.* Echinogammarus marinus : Ford *et al.*, 2003) le nombre d'embryons contenu dans le marsupium ne décroit pas au cours du cycle d'inter-mue, chez *G. fossarum*. Il peut également être intéressant de noter que le nombre d'ovocytes observé au stade C2, D1et D2 (*i.e.* ovocytes en vitellogénèse secondaire) est similaire au nombre d'embryons, indiquant que le nombre d'ovocytes en vitellogénèse secondaire peut être utilisé comme un indicateur du nombre d'embryons produit au cycle suivant.

En se basant sur cette caractérisation du cycle de reproduction, nous avons proposé un test de reprotoxicité permettant d'évaluer simultanément les effets de stress de nature diverses sur le déroulement du cycle de mue, la maturation ovarienne et le développement embryonnaire. Le principe du test est le suivant. Des précopulats dont les femelles sont au stade D2 (*i.e.* proche de l'exuviation, avec des gonades très développées et des juvéniles fraichement éclos dans le marsupium) sont exposés pendant une période de 21 jours. Durant le test, les taux d'alimentation sont mesurés à plusieurs reprises, afin de souligner les éventuels effets indirects des stress testés *via* une modulation de la prise alimentaire. A l'issue de cette période, le stade de mue, la taille et le nombre d'ovocytes, ainsi que le stade et le nombre d'embryon sont déterminés pour chacune des femelles.

Plusieurs essais en laboratoire ont été réalisés dans le but de tester la fiabilité et la robustesse du biotest développé. Durant ces essais les organismes ont été soumis différents stress : un stress non toxique, la privation alimentaire, et divers stress chimiques (cadmium, nonylphénol et méthomyle). Les figures *III-10* et *III-11* vous donnent respectivement en exemple les effets de ces différents stress sur la croissance des ovocytes et le développement des embryons. Une très bonne reproductibilité des mesures a été observée dans les conditions témoins, au cours des différentes expérimentations réalisées, pour l'ensemble des paramètres étudiés. A l'issue des 21 jours, la majorité des femelles sont en stade C2 (80-90 %), portent des embryons de stade 3 (90-100 %) et ont des ovocytes en vitellogénèse secondaire (surface comprise entre 92 000 et 100 000 μ m²). Ces valeurs correspondent à celles précédemment reportées durant la caractérisation du cycle de reproduction. De ce fait, une valeur de référence préliminaire a été proposée pour chacun de ces paramètres, renforçant ainsi la véracité et la pertinence de ce bioessai.

Nous avons pu constater que la privation alimentaire conduit à un retard significatif du cycle de mue associée à une inhibition de la vitellogénèse secondaire. Ces résulta soulignent la nécessité de contrôler le taux d'alimentation lorsque l'on veut caractériser précisément le mode d'action d'un contaminant sur le succès reproducteur. Des retards du cycle d'intermue ainsi qu'une diminution de la croissance ovocytaire et du % d'embryon normaux ont été observés chez les organismes exposés à 1 et 3 μ g.l⁻¹ de Cd. Ces effets observés des concentrations létales pour *G. fossarum* soulignent une action non-spécifique du Cd sur la reproduction.



Figure III-10 : Surface ovocytaire (μm^2 , moyenne \pm écart type, n = 10) mesurée chez des femelles Gammarus fossarum en stade de mue C2 après 21 jours d'exposition au cadmium (Cd; 0.3, 1 et 3 $\mu g. \Gamma^1$), méthomyle (MT; 5, 20 et 80 $\mu g. \Gamma^1$) ou nonylphenol (NP; 0.05 et 5 $\mu g. \Gamma^1$), ou de privation alimentaire (St; les organismes ont été mis en présence de nourriture durant 50 et 25 % du temps d'exposition).

Cw: Contrôle sans-solvant, Cs: Contrôle solvant. *: différences significatives (p < 0.05) par rapport au contrôle; n.a. : non valable.



Figure III-11 : Nombre d'embryons normaux (%, moyenne \pm écart type, n = 10) mesuré chez des femelles Gammarus fossarum en stade de C2 après 21 jours d'exposition au cadmium (Cd; 0.3, 1 et 3 µg. Γ^1), méthomyle (MT; 5, 20 et 80 µg. Γ^1) ou nonylphenol (NP; 0.05 et 5 µg. Γ^1), ou de privation alimentaire (St; les organismes ont été mis en présence de nourriture durant 50 et 25 %du temps d'exposition).

Cw: Contrôle sans-solvant, Cs: Contrôle solvant. *: différences significatives (p < 0.05) par rapport au contrôle; n.a.: non valable.

A l'inverse, le nonylphénol affecte spécifiquement le développement embryonnaire, dès une concentration d'exposition très faible (*i.e.* $0.05 \ \mu g.l^{-1}$), ce qui est d'avantage compatible avec une action de type perturbateur endocrinien tel que cela a été suggéré chez d'autre espèces de crustacés (LeBlanc *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2003 ; Forget *et al.*, 2005). Enfin, le méthomyle qui est reconnu comme un inhibiteur spécifique des cholinestérases, n'a induit aucune altération du succès reproducteur.

Ainsi, l'utilisation simultanée de ces différentes réponses naturellement synchronisées apporte une meilleure évaluation du mode d'action d'une contamination sur la reproduction de *G. fossarum*.

2.2. Développement et application de la mesure d'expression du gène de la vitellogénine

L'induction de la synthèse de vitellogénine (Vtg) a été largement utilisée comme un biomarqueur chez le poisson afin d'évaluer l'exposition des juvéniles et les mâles adultes à des composés oestrogéniques. En revanche, son utilisation potentielle chez les invertébrés a reçu une attention bien moindre. Chez les crustacés, la synthèse de la Vtg semble être une réponse intéressante pour évaluer des perturbations du système endocrinien, notamment au niveau de l'action de l'hormone androgène chez les mâles (LeBlanc *et al.*, 2007). Cependant, les études rapportant une induction de Vtg chez les crustacés mâles sont *quasi* inexistantes.

L'objectif de cette dernière étude était d'évaluer si la mesure de l'expression du gène Vtg par RT–PCR en temps réel, peut être proposée comme biomarqueur d'exposition à des composés dits perturbateurs endocriniens chez *Gammarus fossarum* (Publication n°6).

La vitellogènine est le précurseur du vitellus (*i.e.* réserve énergétique nécessaire aux organismes au cours de leur développement embryonnaire). Par conséquent, la production de cette protéine est généralement faible voire inexistante chez les organismes mâles. En revanche, du fait de l'implication de la Vtg dans la physiologie de la reproduction chez les femelles, on peut s'attendre à ce que les niveaux d'expression de son gène montrent d'importantes modulations au cours de leur cycle de reproduction. Ainsi, dans un premier temps, l'expression de base de la Vtg (*i.e.* organismes non-exposés) a été mesurée pour les différents stades du cycle de reproduction précédemment décrits chez les femelles (Publication n°5), ainsi que chez des mâles (*Fig. III-12*). Cette étude visait à (*i*) vérifier la

fonctionnalité du gène amplifié et (*ii*) définir les niveaux maximums et minimuns d'expression chez la femelle afin de pouvoir les comparer par la suite à d'éventuelles inductions observées chez des mâles contaminés.

L'expression du gène Vtg était très faible chez les mâles, avec des valeurs de deux à trois ordres de grandeurs plus faibles que les valeurs de base observées chez les femelles. Des résultats identiques ont été rapportés chez des espèces de crustacés copépodes (Lee *et al.*, 2008 ; Volz et Chandler, 2004) et décapodes (Sagi *et al.*, 1999 ; Shechter *et al.*, 2005).

Chez les femelles, une élévation significative de l'expression du gène Vtg a été observée au cours du cycle de reproduction, en fin de la phase d'inter-mue (*i.e.* stade C2) et en début de prémue (*i.e.* stade D1). Ces résultats sont en accord avec nos précédentes observations (Publication n°5) qui montraient que la vitellogénèse prend réellement place en fin de phase d'inter-mue (*i.e.* stade C2) et viennent compléter nos connaissances relatives au fonctionnement du cycle de reproduction des femelles *G. fossarum* (*Fig. III-13*). A notre connaissance, de telles relations entre la vitéllogénèse (*i.e.* synthèse de Vtg et développement gonadique) et le cycle de mue n'ont été étudiées et rapportées que chez l'amphipode *Orchestia gammarella* (Meusy *et al.*, 1974; Blanchet-Tournier, 1980) et le décapode *Macrobrachium rosenbergii* (Jasmani *et al.*, 2000; Okumura et Aida, 2000b; Jayasankar *et al.*, 2006).



Figure III-12 : Niveaux d'expression du gène Vtg chez des G. fossarum mâles (\Im) et G. fossarum femelles au cours de leur cycle de reproduction ($\bigcirc A$ -D2).

A-D2 correspondent aux 6 stades de mue précédemment définis chez *G. fossarum* (Publication n°5). Les données sont reportées comme des moyennes \pm SEM du nombre d'ADNc quantifié par PCR en temps réel suite à la rétro-transcription des ARNm contenus dans 1 µg d'ARN totaux (n = 20 pour les mâles et 10 pour chacun des différents groupes de femelles). L'absence de différence significative est indiquée par une lettre identique (p > 0.05).



Figure III-13 : Description du cycle de reproduction chez la femelle G. fossarum sur la base des différents paramètres physiologiques étudiés au cours de nos travaux.

Toutefois, ces résultats mettent en évidence à quel point il peut être délicat d'utiliser la synthèse de Vtg comme un biomarqueur chez les femelles du fait des difficultés qu'il peut y avoir à différencier des variations naturelles liées au cycle de reproduction, d'une modulation induite par un contaminant. En effet, une telle application nécessite d'avoir une connaissance et une maîtrise pointues du cycle de reproduction de la femelle, ce qui est rarement le cas des espèces couramment utilisées en écotoxicologie notamment chez les espèces de microcrustacés qui présentent des cycles extrêmement courts. Paradoxalement, une analyse rapide de la bibliographie suffit à montrer que la quasi totalité des études d'écotoxicologie concernant la synthèse de Vtg chez les crustacés ont été menées chez des femelles (Ghekiere *et al.*, 2006 ; Huang *et al.*, 2006 ; Poynton *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2008).

Dans un second temps, le niveau d'expression de Vtg a été mesuré chez des mâles *G. fossarum* exposés à un mimétique-œstrogène, le nonylphénol, et un anti-androgène, le cyprotérone acétate (*Figure III-14*). Les résultats ont montré que ces molécules sont capables d'induire la synthèse de Vtg chez le gammare mâle. En effet, l'expression de Vtg moyenne mesurée, chez les mâles exposés durant 4 jours à 1 mg.l⁻¹ de cyprotérone acétates et ceux exposés 16 jours à $0.05 \ \mu g.l^{-1}$ de nonylphénol était, respectivement, 4 et 9 fois plus forte que

celles des témoins (*Tab. III-2*). Notre constat rejoint celui d'autres chercheurs qui ont observé des inductions de synthèse de la Vtg chez des femelles (Billinghurst *et al.*, 2000 ; Oberdorster *et al.*, 2000 ; Sanders *et al.*, 2005 ; Ghekiere *et al.*, 2006b ; Huang *et al.*, 2006), des stades larvaires (Billinghurst *et al.*, 2000 ; Sanders *et al.*, 2000 ; Sanders *et al.*, 2005) et des mâles (Huang et Chen, 2004), chez différentes espèces de crustacés suite à une exposition à un composé oestregénique. Les xenoestrogènes ont également été montrés pour être capables de causer une altération des caractères sexuels primaires et secondaires chez les mâles (Brown *et al.*, 1999 ; Vandenbergh *et al.*, 2003 ; Huang et Chen, 2004). De même, Wollenberger et Kusk (2006) rapportent la présence d'ovocytes prévitellogéniques dans les testicules du copépode *Acartia tonsa* exposé à l'anti-androgène cyprotérone acétate.



Figure III-14 : Niveaux d'expression du gène Vtg dans des pools d'ARN totaux de G. fossarum mâles exposés à différentes concentrations de nonylphénol (A) et de cyprotérone acétate (B) durant 2, 4, 8 et 16 jours.

Les données sont reportées comme une seule valeur du nombre de copies d'ADNc quantifiées par PCR en temps réel suite à la rétro-transcription des ARNm contenus dans 1 μ g d'ARN totaux poolés à partir de 5 extraits différents. C: contrôle sans solvant; CS: contrôle solvant. Le solvant utilisé dans le cadre de ces expérimentations était de l'acétone.

Toutefois, nous avons pu observer une diminution du niveau d'expression chez les organismes non-contaminés au cours du temps (*Fig. III-15*), ce qui suggère l'existence de facteurs non-toxiques capables de moduler l'expression de la Vtg chez les organismes mâles. L'origine et l'amplitude de cette variabilité devraient être étudiées à l'occasion de travaux futurs.

De plus, nos résultats ont montré que tous les individus ne présentaient pas la même sensibilité vis-à-vis du contaminant (*Tab. III-2*). Cette variabilité de réponse peut s'expliquer entre autre (*i*) par la diversité génétique inter-individuelle qui peut être importante chez des organismes échantillonnés au sein de population naturelle (tel que cela était le cas dans cette étude) ou (*ii*) par l'hétérogénéité des stades de mue comme cela a été montré par Shechter et *et al.* (2005). Il est donc nécessaire de pratiquer les mesures sur un plus grand nombre de réplicats par condition testée.



Figure III-15 : Expression du gène Vtg des mâles G. fossarum maintenus dans des conditions contrôles avec et sans solvant (CS et C, respectivement) durant 2, 4, et 16 jours.

Les données sont reportées comme des moyennes \pm SEM du nombre de copies d'ADNc quantifiées après rétrotranscription des ARNm contenues dans 1 µg d'ARN totaux (n = 5). * Indique une différence significative (p < 0.05). n.d. : non défini. Les niveaux d'expression des mâles maintenus 4 jours dans des conditions contrôles n'ont pas été mesurés. Le solvant utilisé dans le cadre de ces expérimentations était l'acétone.

		(<i>,</i> 1
	Expression du gène Vtg Après 4 jours		<i>Vtg</i> gene expression Après 16 jours	
	Contrôle Solvant	$1 \ 000 \ \mu g.l^{-1} \ de \ CP$	Contrôle solvant	$0.05 \ \mu g.l^{-1} \ de \ NP$
	1 689.7	27 781.4	0.6	38 445.6
	4 094.4	616.8	2 727.9	1 704.4
	3 080.6	23 493.4	1 218.5	13 140.8
	308.6	3 165.8	3 058.3	10 202.2
	4 750.2	1 625.9	136.8	2 590.8
Moyenne	2 784.7	11 336.7	1 428.4	13 216.8
SEM	806.1	5 891.5	711.3	6 674.7

Tableau III-2 : Valeurs de l'expression du gène de la Vtg mesurée chez des mâles G. fossarum exposés durant 4 jours à 1000 $\mu g. \Gamma^{-1}$ à la cyproterone acetate ou 16 jours à 0.05 $\mu g. \Gamma^{-1}$ de nonylphénol, en comparaison avec les valeurs mesurées chez leurs témoins (i.e. Contrôles avec solvant) respectifs.

Les données sont reportées en nombre de copies d'ADNc quantifiées après rétrotranscription des ARNm contenus dans1 µg d'ARN totaux. CP: cyproterone acetate; NP: nonylphenol. Le solvant utilisé dans le cadre de ces expérimentations était l'acétone.

Pour finir, les effets de rejet de stations d'épuration (STEP) sur l'expression du gène Vtg ont été évalués chez des organismes mâles transplantés dans le milieu dans le cadre de deux campagnes de bioessais *in situ* en novembre et juin 2007 (*Fig. III-16*). Aucun effet des effluents de STEP n'a été enregistré au cours de ces deux campagnes. Néanmoins, une induction du niveau de l'expression de Vtg a été constatée, durant la campagne de juin 2007, chez des mâles transplantés sur la station prise comme référence (*i.e.* B1).



Figure III-16 : Expression du gène Vtg chez des mâles G. fossarum transplantés durant 21 jours sur différents stations proches de la station dépuration de Bourgoins-Jallieu en Juin 2007 (A), et Fontaine-sur-Saône en Novembre 2007(B).

Les données sont reportées comme des moyennes \pm SEM du nombre de copies d'ADNc quantifiés après rétrotranscrition des ARNm contenus dans 1 µg d'ARN totaux (n = 5 et n = 10 pour le graph A et B, respectivement). Les stations B1, B2 et S1 sont considérées comme références car situées en amont des rejets des stations d'épuration. Le solvant utilisé dans le cadre de ces expérimentations était l'acétone.

Ces travaux fournissent des indications sur l'intérêt de développer la mesure de l'expression du gène de Vtg chez les crustacés mâles. Toutefois, un effort particulier devrait être fourni pour évaluer l'impact de facteurs confondants pouvant influer sur le niveau de base de l'expression de la Vtg chez les mâles *G. fossarum* ainsi que sur leur sensibilité vis-à-vis d'une contamination, notamment au travers d'études visant à décrire le cycle de reproduction chez ces organismes (*e.g.* période de mue).

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

CHAPITRE IV : MESURE ET INTERPRETATION DE L'ACTIVITE DES CHOLINESTERASES

Ce chapitre qui s'articule en trois parties, regroupe l'ensemble des travaux relatifs à la mesure de l'activité ChE chez le gammare, ainsi qu'à son interprétation en tant que biomarqueur. Ceci fait l'objet de quatre publications et deux notes :

- Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. (Publication n°1)²⁷
- 2- Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). (Publication n°2)
- Effet de la durée et du mode de conservation des échantillons sur l'activité ChE chez Gammarus fossarum. (Note n°1)
- 4- Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels and a reliable tool for field survey. (Publication n°3)
- 5- Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. (Publication n°4)
- 6- Mise en évidence de la présence et de l'impact de composés anticholinestérasiques dans les milieux aquatiques : mesure de l'activité acétycholinestérase chez le gammare, *Gammarus fossarum*, exposé *in situ*. (Note n°2)

La première partie présente les études de caractérisation biochimique et pharmacologique des ChE présentes chez le gammare (Publication $n^{\circ}1)^{21}$, ainsi que chez deux gastéropodes dulçaquicoles, *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis* (Publication $n^{\circ}2$).

La seconde partie concerne les effets de facteurs confondants – méthodologiques, biotiques intrinsèques et environnementaux – sur l'activité ChE de *Gammarus fossarum* (Note n°1 et Publication n°3).

La troisième partie présente l'étude des relations entre l'inhibition de l'activité ChE et les effets sur le comportement alimentaire et locomoteur, chez *Gammarus fossarum*.

Enfin, la dernière partie présente des exemples d'application *in situ* de la mesure de l'AChE chez *Gammarus fossarum*.

²⁷ N.B. : Dans la publication n°1 il faut comprendre *Gammarus fossarum* à la place de *Gammarus pulex*. En effet, durant les premières phases de nos travaux, une erreur de détermination spécifique avait été commise. Un *erratum* a été soumis auprès du journal pour corriger cette erreur.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

1. CARACTERISATION DES ACTIVITES CHOLINESTERASES

Publication n°1:

Cholinesterase activity in *Gammarus pulex*²⁸ (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos

Benoît Xuereb, Patrice Noury, Vincent Felten, Jeanne Garric, Olivier Geffard.

Le but de cette étude était de caractériser les cholinestérases (ChE) présentes chez *Gammarus pulex*, une espèce abondante qui occupe une place écologique importante au sein des écosystèmes des rivières européennes. Les propriétés biochimiques et pharmacologiques des ChE ont été testées au moyen de différents substrats spécifiques (l'acetylthiocholine iodide, le propionylthiocholine iodide et le butyrylthiocholine iodide) ainsi que des inhibiteurs sélectifs (l'ésérine sulfate, le BW284c51 et l'*iso*-OMPA). Dans une seconde partie, nous avons évalué les effets *in vitro* et *in vivo* sur l'activité ChE, d'un pesticide organophosphoré largement utilisé, le chlorpyrifos.

Les résultats montrent que *G. pulex* possède une seule isoforme de ChE qui présente des propriétés typiques d'une acétylcholinestérase de vertébré, puisque (1) elle hydrolyse préférentiellement l'acétylthiocholine en comparaison aux autres substrats testés, et (2) elle est fortement sensible à l'ésérine sulfate et au BW284c51 mais n'est pas inhibée par l'*iso*-OMPA. Des inhibitions *in vitro* et *in vivo* de l'AChE ont été observées pour des niveaux de contamination au chlorpyrifos très différents, suggérant l'implication de mécanismes de bioaccumulation et de biotransformation. Les inhibitions *in vivo* ont été observées à des concentrations de chlorpyrifos environnementalement réalistes. Les effets létaux sont apparus pour des inhibitions d'AChE supérieures à 50 %. Les résultats de cette présente étude soulignent l'intérêt d'utiliser *G. pulex* comme organisme sentinelle pour évaluer la présence dans l'environnement de composés anti-cholinestérases.

Mots clés : Caractérisation, Chlorpyrifos, Activité des Cholinestérases, Gammarus pulex.

Toxicology (2007) 236(3): 178-189

²⁸ N.B. : Dans la publication n°1 il faut comprendre *Gammarus fossarum* à la place de *Gammarus pulex*. En effet, durant les premières phases de nos travaux, une erreur de détermination spécifique avait été commise. Un *erratum* a été soumis auprès du journal pour corriger cette erreur.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref



Available online at www.sciencedirect.com



Toxicology 236 (2007) 178-189



www.elsevier.com/locate/toxicol

Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos

Benoît Xuereb, Patrice Noury, Vincent Felten, Jeanne Garric, Olivier Geffard*

Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, 3 bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France Received 27 March 2007; received in revised form 6 April 2007; accepted 10 April 2007 Available online 24 April 2007

Abstract

The aim of this study was to characterize cholinesterase (ChE) activity in *Gammarus pulex*, an abundant and ecologically relevant species of the European stream environment. Biochemical and pharmacological properties were tested using different substrates (acetylthiocholine iodide, propionylthiocholine iodide and butyrylthiocholine iodide) and selective inhibitors (eserine sulfate, BW284c51 and *iso*-OMPA). In a second part, the *in vitro* and *in vivo* effects of a widely used organophosphorous pesticide, chlorpyrifos, on ChE activity were investigated. The results suggest that *G. pulex* possess only one ChE which displays the typical properties of an acetylcholinesterase, since: (1) it hydrolyses to the substrate acetylthiocholine at a higher rate than all other tested substrates and (2) it is highly sensitive to eserine sulphate and BW284c51, but not to *iso*-OMPA. *In vitro* and *in vivo* inhibitions were observed for highly different contamination levels, which suggests that bioaccumulation and biotransformation mechanisms are involved. *In vivo* AChE inhibition was observed at realistic environmental concentrations, with lethal effects appearing at inhibitions higher than 50%. The results of this study show the value of *G. pulex* as a sentinel organism for environmental assessment. © 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Characterization; Chlorpyrifos; Cholinesterase activity; Gammarus pulex

1. Introduction

Nowadays, the most widely used insecticides in agricultural, commercial and urban settings are organophosphorous (OPs) and carbamates (Cbs). Most of these compounds have low persistence in aquatic ecosystems, but the relative lack of target specificity has raised concerns about their potential to cause adverse effects on non-target wildlife populations (Frasco et al., 2006). Moreover, Gälli et al. (1994), using the water flea *Daphnia magna* and Microtox[®] tests, showed that

* Corresponding author. Tel.: +33 4 72 20 87 85;

fax: +33 4 78 47 78 75.

some OP degradation products were more persistent, soluble and/or toxic than their parent compounds. Finally, Cid Montañés and Van Hattum (1995), Ashauer et al. (2006) and Woodburn et al. (2003) showed that the OP chlorpyrifos is highly bioaccumulated by the freshwater and marine invertebrates *Asellus aquaticus*, *Gammarus pulex* and *Crassostrea virginica*. The European Water Directive in the field of water policy (2000/60/CE) aims to assess inland and coastal marine water quality in order to promote sustainable water use and improve the status of aquatic ecosystems. To this end, one approach is to develop and validate early warning tools (i.e. biomarkers) in ecologically relevant species.

The toxicity of OP and Cb pesticides is mainly due to the inhibition of acetylcholinesterase (AChE) activity, the enzyme, which degrades the neurotransmitter

E-mail address: geffard@lyon.cemagref.fr (O. Geffard).

⁰³⁰⁰⁻⁴⁸³X/\$ - see front matter © 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.tox.2007.04.010

acetylcholine in cholinergic synapses. This inhibition leads to accumulation of acetylcholine, interfering with the function of the nervous system, inducing deleterious effects, and in the end respiratory failure and death (WHO, 1986). Consequently, since the 1970s, inhibition of cholinesterase (ChE) activity is widely used as a specific biomarker of exposure and/or the effect of OP and Cb pesticides in aquatic species (reviewed in Fulton and Key, 2001). However, distinct enzyme isoforms with different sensitivities towards anticholinergic contaminants may exist depending on the species. Biochemical and pharmacological characterization studies should be conducted as the first step before using ChE as a biomarker in new sentinel species (Garcia-de la Parra et al., 2006). In fish, cholinesterase activities are well documented and well known. They are usually divided into two broad classes: acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) (Fulton and Key, 2001), which are both strongly inhibited by eserine sulfate (Eto, 1974). These two isoforms are distinguished primarily on the basis of substrate specificity; AChE hydrolyzes acetylcholine much faster than other choline esters (such as propionylcholine) and is inactive on butyrylcholine. On the contrary, BChE not only hydrolyzes butyrylcholine but may also hydrolyze acetylcholine. The two enzyme isoforms may also be distinguished by their susceptibility to selective inhibitors; 1,5-bis-(4-allydimethyl-aminoniumphenyl)pentan-3-one dibromide (BW284c51) and tetraisopropyl pyrophosphoramide (iso-OMPA) are selective inhibitors for AChE and BChE, respectively (Massoulié et al., 1993). In aquatic invertebrates, classification of ChE isoforms has been investigated but less than in vertebrates. Moreover, most studies mainly focused on marine and estuarine species, such as echinoderma (Cunha et al., 2005), mollusc (Brown et al., 2004) and on different orders of crustacea: decapoda (Garciade la Parra et al., 2006), stomatopoda (Principato et al., 1988), copepoda (Forget et al., 2002) and branchiopoda (Varo et al., 2002). In general, only one ChE form is observed with typical properties of vertebrate AChE. However, in some cases, enzymes cannot be classified as AChE or as BChE, since they show intermediary characteristics between the two forms known in vertebrates (Bocquene et al., 1997; Cunha et al., 2005; Varo et al., 2002). Except for the cladocera D. magna (Diamantino et al., 2003), the bivalve Corbicula fluminea (Mora et al., 1999a,b), the gastropod Biomphalaria glabrata and the oligochaete Lumbriculus variegatus (Kristoff et al., 2006), ChE forms in freshwater invertebrate species have been less studied. To our knowledge, no data are available for the ecologically

relevant species amphipoda *G. pulex*, currently used as a sentinel species in ecotoxicological studies (Maltby et al., 2002; Watts et al., 2002) and to assess exposure to pesticide (Crane et al., 1999; McLoughlin et al., 2000).

The aim of this study was to investigate the value of ChE activities as biomarkers of neurotoxic stress in the freshwater amphipoda, *G. pulex*. To this end (1) ChEs activities were characterized using different substrates and selective inhibitors, (2) *in vitro* and *in vivo* effects of a widely used organophosphorous pesticide, chlorpyrifos, on ChE activity were studied and compared to activities of other invertebrates and (3) the advantage of using *G. pulex* as a sentinel organism of insecticide contamination was evaluated in terms of the sensitivity of its ChE activity.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine iodide (ATCh), propionylthiocholine iodide (PTCh), butyrylthiocholine iodide (BTCh), eserine sulfate, 1,5-bis(4-allyldimethylammoniumphenyl)-pentan-3-one dibromide (BW284c51), tetra-(monoisopropyl)pyrophosphortetra-mide (*iso*-OMPA), chlorpyrifos methyl and 5,5'dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Ellman's reagent) were purchased from Sigma–Aldrich (Villefranche, France). All chemicals used were of the highest purity grade commercially available.

2.2. Experimental animals

Mature *G. pulex* were collected using a net (by kick sampling) in the unpolluted upstream part of the Bourbre River (eastern central France) in spring 2006. Organisms were stored in polypropylene bottles containing stream water and quickly transferred to the laboratory. Organisms were kept at least 10 days for acclimatization in 30-L tanks continuously supplied with uncontaminated natural water (total hardness of 200 mg CaCO₃ L⁻¹, conductivity of 600 μ S cm⁻¹ similar to sample sites). A 16 h light:8 h dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 °C. Gammarids were fed with alder leaves (*Alnus glutinosa*). Only organisms with a body length of 9 ± 1 mm were used for all experiments.

2.3. Homogenate preparation and ChE activity measurements

Fresh organisms were homogenized in 1:10 (w/v) icecold phosphate buffer (100 mM; pH 7.8), plus 0.1% Triton X-100 with an Ultra-Turrax T25 basic[®] at 24,000 rpm for 25 s. The homogenate was centrifuged at 9000 g at 4 °C for 15 min. Clear supernatant was collected and kept at 4 °C until cholinesterase assay. Enzyme activity was determined in tripli-

cate, according to the colorimetric method initially developed by Ellman et al. (1961), adapted to microplate as described in Guilhermino et al. (1996), using ATCh as substrate. Briefly, $20\,\mu L$ of supernatant was added to the $360\,\mu L$ of reactional medium (phosphate buffer (100 mM, pH 7.8), DTNB (0.2 mM) and substrate (2 mM; see Section 3.1)). The reaction of thiol groups, and spontaneous substrate hydrolysis were assessed using two blanks (one without substrate and one without sample). Absorbance was read at 405 nm for 20 min (1 min intervals, 25 °C). ChE activity was expressed in nanomoles of substrate hydrolyzed per minute per milligram of protein (nmol min⁻¹ (mg P)⁻¹). The protein content of the samples was measured using the Lowry method (Lowry et al., 1951) adapted to the microplate, using bovine serum albumin as standard. A Safire® (TECAN®) spectrofluorimeter microplate reader was used.

2.4. Characterization of ChE activity

ChEs were characterized using different substrates and selective inhibitors. Three replicates were performed for each substrate and selective inhibitors.

2.4.1. Substrate affinity

The substrate preference was investigated by determining the enzyme activity at increasing concentrations (from 0.0625 to 4 mM) of the substrates ATCh, PTCh and BTCh. This experiment was a necessary prerequisite to define optimal substrate concentration for further assays.

2.4.2. Specific inhibitions

Eserine sulfate, BW284c51 and *iso*-OMPA were used as selective inhibitors of ChEs, AChE and BChE, respectively. Solutions of eserine sulfate and *iso*-OMPA were prepared in ethanol, and BW284c51 was dissolved in ultrapure water. Supernatants (495 μ L) were incubated at 22 °C for 30 min with 5 μ L of inhibitor dilution solution. Controls were incubated with 5 μ L of ultrapure water. Additional controls with 5 μ L of ethanol were included when appropriate. Final inhibitor concentrations ranged from 0.01 to 100 μ M for eserine sulfate and from 0.01 to 1000 μ M for BW284c51 and *iso*-OMPA. The effect of each inhibitor on cholinesterase activity was evaluated using 2 mM of ATCh, PTCh or BTCh, which were at optimal concentration for ATCh and PTCh substrates (see Section 3.1).

2.5. In vitro and in vivo effects of chlorpyrifos pesticide on AchE activity

2.5.1. In vitro test

Stock solutions of chlorpyrifos were prepared in ethanol at concentrations of $1-10,000 \,\mu\text{M}$ to obtain the final tested concentrations ranging from 0.01 to $100 \,\mu\text{M}$. The *in vitro* effect of chlorpyrifos was evaluated using the method described for selective inhibitors (see Section 2.4).

2.5.2. In vivo test

Seven nominal concentrations varying from 0 to 2.86 nM were studied. Chlorpyrifos stock solutions were prepared in acetone at concentrations ranging from 0.45 to 14.3 µM. Tested solutions were obtained by adding 100 µL of stock solution to 500 mL of uncontaminated natural water (see Section 2.2). Three replicates of 20 gammarids were placed in glass flasks containing 500 mL of each test solution for 96 h. The medium was renewed daily. Tests were performed at a temperature of 12 ± 1 °C and under a photoperiod of 8 h light: 16 h dark. Animals were not fed during the entire experiment. Solvent and solvent-free controls were included. At the end of exposure (96 h) and for each condition, living organisms were dried, weighed, and then sacrificed in liquid nitrogen and stored at -80 °C until AChE activity measurement. AChE was measured on a pool of 10 organisms. For the two highest concentrations tested, enzyme assays were performed on survival organisms using pools of seven and four organisms, respectively.

2.6. Data analysis

All results are expressed as mean ± standard deviation. Statistical comparisons of experimental data were performed using the non-parametric Kruskal-Wallis rank ANOVA test followed by non-parametric Mann-Whitney U-tests to determine the no-observed-effect concentration (NOEC) and the low-observed-effect concentration (LOEC). The significance p-level was set to 0.05. All data were analyzed by STA-TISTICA software v7.0 (Statsoft®). When data showed a concentration-dependent relationship, the median effect concentration (EC50) and its 95% confidence intervals were calculated using a logistic curve-fitting procedure according to the method described by Vindimian et al. (1999). These data were obtained using REGTOX, a Microsoft Excel® spreadsheet (http://eric.vindimian.9online.fr/). The Michaelis–Menten constant (K_m) and the maximum velocity of substrate hydrolisys (Vmax) were calculated using GOSA software http://www.bio-log.biz/).

3. Results

3.1. Substrate affinity

Fig. 1 shows cholinesterase activities observed for the three substrates. The activity observed with ATCh substrate was higher than that obtained with PTCh, which was in turn higher than that measured with BTCh. Whatever substrate was used, no activity inhibition was observed at the highest concentrations. At the highest concentration (4 mM), enzymatic activities (expressed as nmol min⁻¹ (mg P)⁻¹) were 47.8 ± 3.0 for ATCh (100%), 24.0 ± 1.0 for PTCh (51%) and 4.5 ± 0.3 for BTCh (9.5%). An apparent Michaelian kinetic was displayed only for ATCh and



Fig. 1. Substrate affinity of *G. pulex* ChEs evaluated at increasing concentrations of acetylthiocholine, ATCh (\bigcirc); propionylthiocholine, PTCh (\square) and butyrylthiocholine, BTCh (\blacktriangle). Data are reported as the mean \pm standard deviation of three independent experimentations.

PTCh. Theoretical $K_{\rm m}$ and $V_{\rm max}$ were 106.5 ± 11.6 μ M and 50.8 ± 1.2 nmol min⁻¹ (mg P)⁻¹ for ATCh and 267.7 ± 33.5 μ M and 25.7 ± 0.9 nmol min⁻¹ (mg P)⁻¹ for PTCh, respectively. Based on these findings, we defined 2 mM of substrate as the optimal concentration for AChE and PThE activity measurement.

3.2. Selective inhibitors

Fig. 2 illustrates the effects of eserine sulfate, a selective inhibitor of ChE activities, on hydrolysis of three substrates studied. Hydrolysis inhibition was observed for all substrates. A similar inhibition pattern was obtained when ATCh and PTCh were used as substrates, with nearly complete inhibition (95%) at the concentration of 100 μ M. NOEC and LOEC were 0.01 and 0.1 μ M for the two substrates, respectively, and IC₅₀ was 0.19 (0.16–0.20) μ M for ATCh and 0.21 (0.19–0.23) μ M for the PTCh substrate. For BTCh, partial inhibition (50%) was observed at the concentration of 100 μ M with an IC₅₀ value of 45.7 (30.0–68.1) μ M (NOEC = 0.1 μ M; LOEC = 1 μ M).

Fig. 3 shows the effects of selective inhibitors of mammal AChE (BW284c51) and BChE (*iso*-OMPA) on substrate hydrolysis. Strong inhibition (95% at 1000 μ M concentration) of ATCh and PTCh hydrolysis (NOEC=0.1 μ M; LOEC=1 μ M) was obtained in the presence of BW284c51, with IC₅₀ values of 5.74 (5.25–6.36) and 7.73 (6.93–8.43) μ M, respectively. As previously, the inhibition profiles of these two substrates



Fig. 2. Inhibition ($\% \pm$ standard deviation, n = 3 independent experimentations) of *G. pulex* ChE activity by eserine. Inhibitor effects were tested on acetylthiocholine (ATCh: \blacklozenge), propionylthiocholine (PTCh: \Box) and butyrylthiocholine (BTCh: \blacktriangle) hydrolysis. *: dose at which eserine induces significant effect (p < 0.05)..

182

B. Xuereb et al. / Toxicology 236 (2007) 178-189

were similar. For BTCh, no appreciable inhibition was registered. *iso*-OMPA did not induce significant inhibition of ChE activities for all tested substrates. In all cases, enzyme activity was not significantly impacted by the ethanol for all *in vitro* experiments.

3.3. In vitro and in vivo effects of chlorpyrifos pesticide on AChE activity

Both *in vitro* and *in vivo* chlorpyrifos exposure led to inhibition of *G. pulex* AChE activity (Fig. 4). *In vitro*, almost full inhibition (95%) was observed at a concentration of 100 μ M. Effects occurred within a narrow range of concentrations, with an IC₅₀ of 31.3 (27.6–34.6) μ M. After *in vivo* exposure, chlorpyrifos induced a significant AChE inhibition (p < 0.05), with a 96-h IC₅₀ of 0.99 (0.90–1.02) nM, corresponding to 0.35 (0.32–0.36) µg L⁻¹. Significant (p < 0.05) mortality was observed for a chlorpyrifos concentration higher than 1.44 nM, with a 96-h LC₅₀ of 1.78 (1.50–2.19) nM, corresponding to 0.62 (0.53–0.77) µg L⁻¹.

4. Discussion

4.1. G. pulex possess only one form of ChE corresponding to vertebrate AChE

The measurement of ChE inhibition is widely used to assess exposure and/or the effects of pesticides in aquatic invertebrates. However, distinct enzymatic isoforms



Fig. 3. Inhibition (% \pm standard deviation, n = 3 independent experimentations) of *G. pulex* ChE activity by BW284c51 (A) and iso-OMPA (B). Inhibitor effects were tested on acetylthiocholine (ATCh: •), propionylthiocholine (PTCh: □) and butyrylthiocholine (BTCh: ▲) hydrolysis. *: dose at which BW284c51 induces significant effect on ATCh and PTCh hydrolysis (p < 0.05).



Fig. 4. Effect of chlorpyrifos on *G. pulex* AChE activity. (A) : inhibition ($\% \pm$ standard deviation, n=3 independent experimentations) of ChE activity for *in vitro* experiment; (B) : inhibition ($\% \pm$ standard deviation, n=3) of ChE activity and survival ($\% \pm$ standard deviation, n=3) for *in vivo* experiment. *= dose at which chlorpyrifos induces significant effect (p < 0.05).

with different sensitivities towards anticholinergic contaminants may exist, and it should be controlled. *G. pulex* ChEs showed different affinity towards the three substrates studied. The highest hydrolysis was observed with ATCh substrate with a K_m of 0.1 mM and an enzymatic activity of 50 ± 1.2 nmol min⁻¹ (mg P)⁻¹. Similar to our results, ATCh substrate is preferred in other invertebrates, such as *Chasmagnathus granulata*, *Eurytemoras affinis*, *Tigriopus brevicornis*, *Mytilus gallprovincialies*, *Paracentrotus lividus*, *Litopenaeus vannamei* and *Palaemon serratus* (Cunha et al., 2005; Forget and Bocquene, 1999; Forget et al., 2002; Frasco et al., 2006; Garcia-de la Parra et al., 2006; Monserrat and Bianchini, 1998; Mora et al., 1999a). In other studies, PTCh was the most hydrolyzed substrate, for example in *C. fluminea* (Mora et al., 1999a,b), *D. magna* (Diamantino et al., 2003), the brine shrimp *Artemia parthenogenetica* (Varo et al., 2002) and *Murex brandaris* (Talesa et al., 1990). Compared to vertebrates, the ChEs of most invertebrate species studied showed little preference for BTCh. Table 1 summarizes K_m values (for the most hydrolyzed substrate) reported by other authors. Except for *C. granulata* (Monserrat and Bianchini, 1998) and *P. lividus* (Cunha et al., 2005), the cholinesterase of *G. pulex* has a lower affinity to ATCh than reported for the marine and freshwater invertebrates studied. In addition, for a particular species, substrate affinities can vary depending on the tissue used for activity measurement (Frasco et al., 2006) found that the preferred substrate of ChE

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

184

Table 1

Michaelis–Menten constant (K_m) of cholinesterase activity of some aquatic invertebrates

Species	Tissues	$K_{\rm m}~(\mu{ m M})$	References
Freshwater species			
Corbicula fluminea	Whole organism	70 (PTCh)	Mora et al. (1999a,b)
Daphnia magna	Whole organism	16(PTCh)	Diamantino et al. (2003)
Gammarus pulex	Whole organism	106	This study
Marine and/or estuarine species			
Murex brandaris	Whole organism	46 (PTCh)	Talesa et al. (1990)
Mytilus galloprovincialis	Gill	30	Mora et al. (1999a,b)
Maia verrucosa	Whole organism	44	Talesa et al. (1992)
Palinurus vulgaris	Whole organism	4.1 (PTCh)	Talesa et al. (1992)
Chasmagnathus granulata	Thoracic ganglia	280	Monserrat and Bianchini (1998)
Squilla mantis	Whole organism	78(PTCh)	Talesa et al. (1990)
Lepeophtheirus salmonis	Whole organism	72	Walday and Fonnum (1989)
Tigrinus brevicornis	Whole organism	20	Forget and Bocquene (1999)
Eurytemora affinis	Whole organism	30	Forget et al. (2002)
Paracentrotus lividus	Ambulacra	130	Cunha et al. (2005)

Excepted for C. fulminea, D. magna, P. vulgaris, S. mantis and M. brandaris the K_m values were calculated using ATCh as substrate.

present in *Palaemon serratus* eyes was ATCh, whereas Bocquene et al. (1990) found that PTCh was the highest substrate hydrolysis observed with whole extract of this species.

Enzymatic activity observed with BTCh substrate was only partially inhibited by eserine sulfate and was not modified by iso-OMPA, a selective BChE inhibitor in vertebrates. These results suggest that this enzymatic activity is more a non-specific esterase than a ChE. On the contrary, enzymatic activities measured using ATCh and PTCh were almost totally inhibited by eserine sulfate at concentration of 10 µM, suggesting that ChE is responsible for this activity. Similarly, for both substrates, a concentration-dependent ChE inhibition by BW284c51 was found, with activity reaching almost zero at the highest concentration tested. Finally, no effects of iso-OMPA were found. In this study, our results indicate the presence of a single ChE in G. pulex, which distinctly show all the properties of vertebrate AChE: (1) high preference for ATCh and low for BTCh and (2) high sensitivity to eserine sulfate and BW284c51, but not to iso-OMPA. In some cases, the authors could not clearly determine whether the enzyme was AChE or BChE, since they show intermediary characteristics between the two isoforms known in vertebrates (Bocquene et al., 1997; Cunha et al., 2005; Varo et al., 2002).

4.2. AChE activity in non-exposed G. pulex

Basal AChE activity of non-exposed *G. pulex* was $50 \text{ nmol min}^{-1} (\text{mg P})^{-1}$. A great deal of literature is available on the use of AChE as a specific biomarker of pesticide exposure in aquatic invertebrates. However,

the results are not easily compared since, in many papers, authors use relative units, such as DO mL⁻¹ (Forget and Bocquene, 1999; Forget et al., 2002) or % of activity in control (Kuhn and Streit, 1994) and do not give basal activity. Table 2 provides a review of AChE activity reported by other authors in aquatic invertebrates under control conditions. Based on these data, the activity measured using whole extracts of G. pulex was lower than activities obtained with the head capsule (Crane et al., 1999; McLoughlin et al., 2000). This lower activity is likely due to biological dilution caused by the sample treatment. It is worth noting that AChE activity values observed in G. pulex are on the same order of magnitude as those measured in most freshwater and marine invertebrates. Compared to G. pulex, low and very high values are observed in Artemia spp. and in E. affinis and C. granulata, respectively. Similar activity values have been obtained in A. parthenogenetica by Varo et al. (2002) and Nunes et al. (2006), whereas a substantial difference is observed for C. riparius between Ibrahim et al. (1998) and Callaghan et al. (2002) results. No tendency could be defined between marine and freshwater organisms and between the phyla studied.

4.3. Advantages of AChE activity as an exposure and toxicity marker in G. pulex

Several authors have estimated *in vitro* AChE sensitivity between organisms using K_i (inhibition coefficient; Monserrat and Bianchini, 1998; Forget and Bocquene, 1999; Forget et al., 2002), which is not available in our study. However, AChE sensitivity of organisms can be compared using *in vitro* IC₅₀ measured with a selec-

Table 2 AChE activity levels of some aquatic invertebrates reported in literature

Species	AChE (nmol min ⁻¹ (mg P) ⁻¹)	Tissues	References
Freshwater species			
Insect			
Chironomus tentans	5	Whole organism	Belden and Lydy (2001)
Chironomus riparius	20	Whole organism	Callaghan et al. (2002)
Chironomus riparius	3000	Whole organism	Ibrahim et al. (1998)
Oligochaete			
Lumbriculus variegatus	320	Whole organism	Kristoff et al. (2006)
Mollusc			
Corbicula fluminea	25.3	Whole organism	Mora et al. (1999a,b)
Biomphalaria glabrata	46	Whole organism	Kristoff et al. (2006)
Crustacean			
Daphnia magna	9	Whole organism	Guilhermino et al. (2000)
Daphnia magna	19	Whole organism	Diamantino et al. (2003)
Hyalella azteca	250	Whole organism	Anderson and Lydy (2002)
Gammarus pulex	250	Head capsule	Crane et al. (1999)
Gammarus pulex	50.8	Whole organism	This study
Marine and estuarine species			
Polychaete			
Nereis diversicolor	20	Whole organism	Scaps and Borot (2000)
Mollusc			
Mytilus galloprovincialis	6	Gills	Mora et al. (1999a,b)
Mytilus edulis	22	Whole organism	Lehtonen and Leinio (2003)
Macoma balthica	40	Whole organism	Lehtonen and Leinio (2003)
Hexaplex trunculus	60	Digestive gland	Romeo et al. (2006)
Crustacean			
Maia verrucosa	86	Whole organism	Talesa et al. (1992)
Palinurus vulgaris	20.5	Whole organism	Talesa et al. (1992)
Carcinu maenas	200	Hemolymph	Lundebye et al. (1997)
Chasmagnathus granulata	1750	Thoracic ganglia	Monserrat and Bianchini (1998)
Palaemonetes pugio	57	Whole organism	Key and Fulton (2002)
Litopenaeus vannamei	6	Muscle	Garcia-de la Parra et al. (2006)
-	23	Eyes	
Crangon crangon	50	Cephalothoraxe	Menezes et al. (2006)
Squilla mantis	33.9	Whole organism	Talesa et al. (1990)
Artemia salina	2.6	Whole organism	Varo et al. (2002)
Artemia parthenogenetica	3.7	Whole organism	Varo et al. (2002)
Artemia parthenogenetica	3.7	Whole organism	Nunes et al. (2006)
Eurytemora affinis	750,000	Whole organism	Cailleaud et al. (2007)
Echinoderm			
Paracentrotus lividus	47	Ambulacra	Cunha et al. (2005)

tive inhibitor, such as eserine sulfate (Tortelli et al., 2006). Table 3 summarizes AChE IC₅₀ and the lowestobserved-effect concentration (LOEC) reported by other authors in freshwater and marine invertebrate species. It can be observed that except for the marine shrimp *Palaemonetes pugio*, AChE *G. pulex* is one of the most sensitive species to selective inhibitors, showing the value of this species for biomonitoring of OP exposure. Monserrat and Bianchini (1998) write "considering that carbamate and organophosphorous pesticides are substrate analogues which inhibit cholinesterase, it could be suggested that cholinesterase with lower substrate affinity (high K_m) could be less sensitive to anticholinesterase agents". However, our results show that K_m assessment is not sufficient to characterize the sensitivity of cholinesterase activity to anticholinesterase compounds. For example, we can see that *G. pulex* presents a higher K_m than the K_m observed in *D. magna*, whereas *G. pulex* 186

B. Xuereb et al. / Toxicology 236 (2007) 178-189

Table 3

Comparaison of IC₅₀ and LOEC of specific inhibitor, eserine, for some aquatic invertebrates

Species	Sensivity to eserine		References
	IC ₅₀ (µM)	LOEC (µM)	
Freshwater species			
Daphnia magna		12.5	Diamantino et al. (2003)
Biomphalaria glabrata	1×10^{-2} (30% inhibition)		Kristoff et al. (2006)
Lumbriculus variegatus	1×10^{-2} (90% inhibition)		Kristoff et al. (2006)
Gammarus pulex	2×10^{-4}	1×10^{-4}	This study
Marine and estuarine species			
Crassostrea rhizophorae	0.91		Monserrat et al. (2002)
Perna perna	4.58		Monserrat et al. (2002)
Chasmagnathus granulata	0.53 (0.32-0.77)		Monserrat and Bianchini (1998)
Callimectes sapidus	0.32		Habig et al. (1988)
Palaemonetes pugio	1×10^{-5} (90% inhibition)		Key and Fulton (2002)
Litopenaeus vannamei	4.2×10^{-2} (muscle)	6.25×10^{-2} (muscle)	Garcia-de la Parra et al. (2006)
1	3.4×10^{-2} (eye)	6.25×10^{-2} (eye)	Garcia-de la Parra et al. (2006)
Artemia salina		6.25	Varo et al. (2002)
Artemia parthenogenetica		6.25	Varo et al. (2002)
Paracentrotus lividus	6.25×10^{-2} (98% inhibition)		Cunha et al. (2005)

AChE is much more sensitive. Likewise, *G. pulex* and *C. granulata* present a similar K_m , but AChE sensitivities in these species are very different.

Chlorpyrifos led to strong inhibition on G. pulex AChE after in vitro and in vivo exposures. A similar pattern occurs for the two types of exposure with rapid inhibition of the enzymatic activity. However, the substantial difference between in vivo and in vitro exposure should be noted, with an IC₅₀ 3×10^4 times lower for the in vivo exposure (0.99 nM) than for the *in vitro* exposure $(31 \,\mu\text{M})$. These results may be explained by: (1) chlorpyrifos bioaccumulation in G. pulex, with BCF and lipid-weight-based BCF of 1600 and 123,800, respectively (Ashauer et al., 2006), and (2) physiological variables, such as metabolism and/or detoxification mechanisms. Gälli et al. (1994) observed that degradation products of OPs were more toxic than parent compounds toward D. magna and Photobacterium phophoreum (Microtox®). Compared to vertebrate species, particularly in amphipods, biotransformation resulting from mixed-function oxygenase is less well known. However, Ashauer et al. (2006) found that accumulated chlorpyrifos is rapidly eliminated, suggesting biotransformation capacities in this species. These authors studied uptake and elimination of chlorpyrifos in G. pulex and showed that 50% of total accumulated chlorpyrifos was eliminated during the first 3 days of the depuration phase. To explain the difference observed between in vitro and in vivo effects, in vitro impacts of chlorpyrifos and chlorpyrifosoxon (mean biodegradation product) should be compared.

Strong AChE inhibition (94%) was observed in G. pulex after an exposure to chlorpyrifos at a concentration of 2.86 nM for 96 h, with an IC₅₀ of 0.99 nM. This value is similar to those reported by Key et al. (2005) in P. pugio, Leight and Van Dolah (1999) in Gammarus palustris, Roast et al. (1999) in Neomysis integer and Belden and Lydy (2001) and Jin-Clark et al. (2002) in Chironomus tentans. According to Day and Scott (1990) and Printes and Callaghan (2004), the G. pulex mortality rate is directly related to AChE inhibition and appears for AChE inhibition to be higher than 50%. These results show the value of AChE as an early warning tool to assess G. pulex exposure to organophosphorous compounds. However, the relationship between mortality and AChE activity does not exist for all invertebrate species (Escartin and Porte, 1996; Fulton and Key, 2001; Varo et al., 2002). For example, Varo et al. (2002) found 90% AChE inhibition in Artemia salina and A. parthenogenetica after 24 h of exposure to high chlorpyrifos concentrations (5.5 µM), without mortality. Therefore, Printes and Callaghan (2004) showed, in D. magna, that the relationship between AChE inhibition and immobility might depend on the pesticides studied. They noted that, using chlorpyrifos, malathion, parathion and propoxur, a 50% reduction in AChE activity was associated with detrimental effects on mobility, whereas acephate inhibited AChE by up to 70% with no effect on the organisms. Consequently, further research is needed before AChE activity can be proposed as a toxicity marker, by studying the relationships between inhibition activity and toxic effects for more than one pesticide.

5. Conclusion

G. pulex presents only one ChE which displays the properties of vertebrate AChE (high preference for ATCh and low preference for BTCh, and high sensitivity to BW284c51 but not to *iso*-OMPA) with a basal activity of 50 nmol min⁻¹ (mg P)⁻¹. Chlorpyrifos, an organophosphate pesticide currently used in agricultural settings, led to severe *in vivo* and *in vitro* AChE inhibition. *In vivo* enzymatic inhibition was observed for realistic environmental concentrations, showing the value of this species as a sentinel organism for environmental surveys.

Acknowledgements

This study was supported by ECCO Framework Project with financial support granted by the Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) du Centre National de Recherche Scientifique (CNRS) (Convention no. 06CV050).

References

- Anderson, T.D., Lydy, M.J., 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. Environ. Toxicol. Chem. 21, 1507–1514.
- Ashauer, R., Boxall, A., Brown, C., 2006. Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 542–548.
- Belden, J.B., Lydy, M.J., 2001. Effects of atrazine on acetylcholinesterase activity in midges (*Chironomus tentans*) exposed to organophosphorus insecticides. Chemosphere 44, 1685–1689.
- Bocquene, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. Mar. Environ. Res. 30, 75–89.
- Bocquene, G., Roig, A., Fournier, D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*)—evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. FEBS Lett. 407, 261–266.
- Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. Aquat. Toxicol. 66, 267–278.
- Callaghan, A., Fisher, T., Grosso, A., Holloway, G.J., Crane, M., 2002. Effect of temperature and pirimiphos methyl on biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. Ecotoxicol. Environ. Saf. 52, 128–133.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). Comp. Biochem. Physiol. A. 147, 841–849.

- Cid Montañés, J.F., Van Hattum, B., 1995. Bioconcentration of chlorpyrifos by the freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L.) in outdoor experimental ditches. Environ. Pollut. 88, 137–146.
- Crane, M., Attwood, C., Sheahan, D., Morris, S., 1999. Toxicity and bioavailability of the organophosphorus insecticide pirimiphos methyl to the freshwater ampipod *Gammarus pulex L*. in laboratory and mesocosm systems. Environ. Toxicol. Chem. 18, 1456– 1461.
- Cunha, I., García, L.M., Guilhermino, L., 2005. Sea-urchin (*Para-centrotus lividus*) glutathione S-transferases and cholinesterase activities as biomarkers of environmental contamination. J. Environ. Monit. 7, 288–294.
- Day, K.E., Scott, I., 1990. Use acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. Aquat. Toxicol. 18, 101–114.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2003. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* (Straus) and their inhibition by zinc. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 219–225.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
- Escartin, E., Porte, C., 1996. Acetylcholinesterase inhibition in the Crayfish *Procambarus clarkii* exposed to fenitrothion. Ecotoxicol. Environ. Saf. 34, 160–164.
- Eto, M., 1974. Organophosphorous Pesticides: Organic and Biochemical Chemistry. CRC Press, Cleveland, 387 p.
- Forget, J., Bocquene, G., 1999. Partial purification and enzymatic characterization of acetylcholinesterase from the intertidal marine copepod *Tigriopus brevicornis*. Comp. Biochem. Physiol. B 123, 345–350.
- Forget, J., Livet, S., Leboulenger, F., 2002. Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 132, 85–92.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2006. Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. Aquat. Toxicol. 77, 412–421.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environ. Toxicol. Chem. 20, 37–45.
- Gälli, R., Rich, H.W., Scholtz, R., 1994. Toxicity of organophosphate insecticides and their metabolites to the water flea *Daphnia magna*, the Microtox test and an acetylcholinesterase inhibition test. Aquat. Toxicol. 30, 259–269.
- Garcia-de la Parra, L.M., Bautista-Covarrubias, J.C., Rivera-de la Rosa, N., Betancourt-Lozano, M., Guilhermino, L., 2006. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 65, 372–380.
- Guilhermino, L., Lopes, M.C., Carvalho, A.P., Soared, A.M.V.M., 1996. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. Chemosphere 32, 727–738.
- Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2000. *In vitro* and *in vivo* inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents : possible implications for contamination biomonitoring. Sci. Total. Environ. 247, 137– 141.

188

B. Xuereb et al. / Toxicology 236 (2007) 178-189

- Habig, C., Di Giulio, R.T., Abou-Donia, M.B., 1988. Comparatives properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterase. Comp. Biochem. Physiol. C 91, 293–300.
- Ibrahim, H., Kheir, R., Helmi, S., Lewis, J., Crane, M., 1998. Effects of organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorine pesticides, and a heavy metal on survival and cholinesterase activity of *Chironomus riparius* Meigen. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60, 448–455.
- Jin-Clark, Y., Lydy, M.J., Zhu, K.Y., 2002. Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Environ. Toxicol. Chem. 21, 598– 603.
- Key, P., Delorenzo, M., Gross, K., Chung, K., Clum, A., 2005. Toxicity of the mosquito control pesticide Scourge (R) to adult and larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). J. Environ. Sci. Health B: Pesticides Food Contam. Agric. Wastes 40, 585– 594.
- Key, P.B., Fulton, M.H., 2002. Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). Pest. Biochem. Physiol. 72, 186–192.
- Kristoff, G., Guerrero, N.V., de D'Angelo, A.M.P., Cochon, A.C., 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicology 222, 185–194.
- Kuhn, K., Streit, B., 1994. Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53, 398–404.
- Leight, A.K., Van Dolah, R.F., 1999. Acute toxicity of the insecticides endosulfan, chlorpyrifos, and malathion to the epibenthic estuarine amphipod *Gammarus palustris* (Bousfield). Environ. Toxicol. Chem. 18, 958–964.
- Lehtonen, K.K., Leinio, S., 2003. Effects of exposure to copper and malathion on metallothionein levels and acetylcholinesterase activity of the mussel *Mytilus edulis* and the clam *Macoma balthica* from the northern Baltic sea. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 489–496.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
- Lundebye, A.K., Curtis, T.M., Braven, J., Depledge, M.H., 1997. Effects of organophosphorus pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. Aquat. Toxicol. 37, 183–200.
- 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.
- Massoulié, J., Pezzementi, L., Bon, S., Krejci, E., Vallette, F.-M., 1993. Molecular and cellular biology of cholinesterases. Prog. Neurobiol. 41, 31–91.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2085–2092.
- Menezes, S., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., Peck, M.R., 2006. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 335, 114–122.
- Monserrat, J.M., Bianchini, A., 1998. Some kinetic and toxicological characteristics of thoracic ganglia cholinesterase of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. C 120, 193–199.

- Monserrat, J.M., Bianchini, A., Bainy, A.C.D., 2002. Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills oysters (Crassostrea rhizophorae) and other aquatic species. Mar. Environ. Res. 54, 781–785.
- Mora, P., Fournier, D., Narbonne, J.-F., 1999a. Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* L. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. Comp. Biochem. Physiol. C 122, 353–361.
- Mora, P., Michel, X., Narbonne, J.F., 1999b. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. Environ. Toxicol. Pharmacol. 7, 253–260.
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2006. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean *Artemia parthenogenetica*. Chemosphere 62, 581–594.
- Principato, G.B., Talesa, V., Giovannini, E., Pascolini, R., Rosi, G., 1988. Characterization of the soluble cholinesterase from *Squilla mantis*. Comp. Biochem. Physiol. C: Comp. Pharmacol. 90, 413–416.
- Printes, L.B., Callaghan, A., 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1241–1247.
- Roast, S.D., Thompson, R.S., Donkin, P., Widdows, J., Jones, M.B., 1999. Toxicity of the organophosphate pesticides chlorpyrifos and dimethoate to *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea). Water Res. 33, 319–326.
- Romeo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., Aissa, P., 2006. Responses of Hexaplex (Murex) trunculus to selected pollutants. Sci. Total Environ. 359, 135–144.
- Scaps, P., Borot, O., 2000. Acetycholinesterase activity of the polychaete *Nereis diversicolor* : effects of temperature and salinity. Comp. Biochem. Physiol. C 125, 377–383.
- Sturm, A., Wogram, J., Hansen, P.-D., Liess, M., 1999. Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. Environ. Toxicol. Chem. 18, 194–200.
- Talesa, V., Contenti, S., Mangiabene, C., Pascolini, R., Rosi, G., Principato, G.B., 1990. Propionylcholinesterase from *Murex Brandaris*: comparison with other invertebrate cholinesterases. Comp. Biochem. Physiol. C 96, 39–43.
- Talesa, V., Contenti, S., Principato, G.B., Pascolini, R., Giovannini, E., Rosi, G., 1992. Cholinesterase from *Maia verrucosa* and *Palinurus vulgaris* : A comparative study. Comp. Biochem. Physiol. C 101, 499–503.
- Tortelli, V., Colares, E.P., Robaldo, R.B., Nery, L.E.M., Pinho, G.L.L., Bianchini, A., Monserrat, J.M., 2006. Importance of cholinesterase kinetic parameters in environmental monitoring using estuarine fish. Chemosphere 65, 560–566.
- Varo, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2002. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. Chemosphere 48, 563–569.
- Vindimian, E., Garric, J., Flammarion, P., Thybaud, E., Babut, M., 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2386–2391.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2002. Population reponses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 alpha-ethinylestradiol. Environ. Toxicol. Chem. 21, 445–450.

189

- Walday, P., Fonnum, F., 1989. Cholinergic activity in different stages of sealice (*Lepeophtheirus salmonis*). Comp. Biochem. Physiol. C 93, 143–147.
- Woodburn, K.B., Hansen, S.C., Roth, G.A., Strauss, K., 2003. The bioconcentration and metabolism of chlorpyrifos by the eastern

oyster, Crassostrea virginica. Environ. Toxicol. Chem. 22, 276–284.

World Health Organization, 1986. Organophosphorus Insecticides: A General Introduction. Environmental Health Criteria 63, WHO, Geneva.

Publication n°2:

Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, Potamopyrgus antipodarum (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and Valvata piscinalis (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774).

Beatrice Gagnaire, Olivier Geffard, Benoit Xuereb, Christelle Margoum, Jeanne Garric.

Les insecticides anti-cholinestérasiques constituent la majeure partie des pesticides utilisés. De ce fait, la mesure de l'inhibition des cholinestérases (ChE) est largement utilisée en tant que biomarqueur spécifique pour évaluer l'exposition d'organismes non-cible à ce type de contamination. Cependant, la plupart des études concernant ce biomarqueur ont été menées chez des vertébrés ; parmi les invertébrés, les mollusques gastéropodes ont rarement été utilisés. Le groupe des gastéropodes est largement représenté au sein des habitats aquatiques, y compris dans les écosystèmes dulçaquicoles où ils sont d'une grande importance écologique. Dans ce contexte, les activités ChE ont été caractérisées chez deux espèces dulçaquicoles de mollusques gastéropodes, Potamopyrgus antipodarum et Valvata piscinalis, afin d'évaluer leur valeur en tant qu'espèces sentinelles. Premièrement, la caractérisation des activités ChE a été réalisée au moyen de différents substrats (acétylcholine iodide, butyrylcholine iodide and propionylcholine iodide) et inhibiteurs spécifiques (ésérine, iso-OMPA and BW284c51). Dans un second temps, l'effet sur l'activité ChE d'un insecticide organophosphoré largement utilisé, le chlorpyrifos, a été testé in vivo chez les deux espèces. Les résultats montrent que P. antipodarum possède deux isoformes de ChE : une isoforme avec des propriétés intermédiaires à celles de l'acétyl- et de la propionyl-ChE, et une isoforme minoritaire correspondant à une butyryl-ChE ; alors que V. piscinalis semble ne posséder qu'une isoforme présentant les propriétés typiques d'une acétyl-ChE. Le chlorpyrifos n'a induit aucun effet sur l'activité ChE de V. piscinalis. En revanche, l'activité de P. antipodarum a été significativement inhibée à des concentrations environnementalement réalistes (2.86 and 14.2 nM) après sept jours d'exposition. La présente étude suggère que P. antipodarum peut être employé comme un indicateur biologique dans le cadre de l'évaluation d'une contamination par des pesticides.

Mots clés : Activité des cholinestérases ; Substrats ; *Potamopyrgus antipodarum* ; *Valvata piscinalis* ; Chlorpyrifos ; Biomarqueur.

Chemosphere (2008) 71(3): 553-560

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref



Available online at www.sciencedirect.com



CHEMOSPHERE

Chemosphere 71 (2008) 553-560

www.elsevier.com/locate/chemosphere

Cholinesterase activities as potential biomarkers: Characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774)

Beatrice Gagnaire ^a, Olivier Geffard ^a, Benoit Xuereb ^a, Christelle Margoum ^b, Jeanne Garric ^{a,*}

^a Cemagref, Unité Biologie des Ecosystèmes Aquatiques, Laboratoire d'Ecotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France ^b Cemagref, Unité Qualité des Eaux et Prévention des Pollutions, Laboratoire des Micropolluants Organiques, 3 bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon Cedex 09, France

> Received 5 July 2007; received in revised form 28 August 2007; accepted 27 September 2007 Available online 12 November 2007

Abstract

Anti-cholinesterase insecticides constitute a major portion of modern synthetic pesticides and the assessment of cholinesterase (ChE) inhibition is widely used as a specific biomarker for evaluating the exposure of non-target organisms to these pollutants. However, most studies on this biomarker were developed on vertebrates and among invertebrates, gastropod mollusks are rarely used. Gastropods are important members of aquatic habitats and therefore present a high ecological relevance for freshwater ecosystems. In this context, ChE activities were characterized in two freshwater gastropod mollusks, *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*, in order to ascertain their value as sentinel species. Firstly, characterization of ChE activities was performed using different substrates (acetylcholine iodide, butyrylcholine iodide and propionylcholine iodide) and specific inhibitors (eserine, *iso*-OMPA and BW284c51). Secondly, *in vivo* effect of a widely used organophosphate insecticide, chlorpyrifos, was tested on ChE activity in both species. Results suggested that *P. antipodarum* possesses two isoforms of cholinesterases, one isoform which properties are intermediate between an acetyl and a propionyl ChE, and one minor isoform which correspond to a butyryl ChE, while *V. piscinalis* ChE. In contrast, *P. antipodarum* activity was significantly decreased by environmental realistic chlorpyrifos concentrations (2.86 and 14.2 nM) after seven days of contact. The present study suggests that *P. antipodarum* may be employed as a biological indicator for assessing pesticide contamination.

Keywords: Cholinesterase activity; Substrates; Potamopyrgus antipodarum; Valvata piscinalis; Chlorpyrifos; Biomarker

1. Introduction

The measurement of the exposure to pollution and of the biological effects of toxicants has become of major importance for the assessment of the quality of the environment (van der Oost et al., 2003). The use of biological markers at the molecular or cellular level have been proposed as sensitive 'early warning' tools for biological effect measurement (van der Oost et al., 2003). This approach has been widely used both *in vivo* and *in vitro* for the evaluation of xenobiotic effects on animals (Binelli et al., 2006).

Among anthropogenic contaminants, pesticides are widely detected in freshwater and estuarine ecosystems. These molecules are spread on terrestrial cultures and enter waterways from agricultural and urban run-off. Pesticides may have major ecological consequences (Ozretic and

^{*} Corresponding author. Tel.: +33 4 72 20 89 05; fax: +33 4 78 47 78 75. *E-mail address:* garric@lyon.cemagref.fr (J. Garric).

^{0045-6535/\$ -} see front matter © 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.09.048

B. Gagnaire et al. / Chemosphere 71 (2008) 553-560

Krajnovic-Ozretic, 1992). The organophosphates (OPs) and carbamates (Cs) are modern synthetic insecticides and are potent neurotoxic molecules (Ashauer et al., 2006). They exert acute toxicity by blocking the breakdown of acetylcholine by the enzyme acetylcholinesterase (AChE: E.C.3.1.1.7) in vertebrate and invertebrate organisms (Fulton and Key, 2001). Acetylcholine is the primary neuro-transmitter in the sensory and neuromuscular systems in most species. The activity of this system is vital to muscular function and represents a prime target on which OPs and Cs can exert a detrimental effect (Sarkar et al., 2006).

554

Monitoring AChE activity in wildlife populations has been proposed as a general method for detecting environmental contamination from OPs and Cs, particularly since many of these chemicals have relatively short half-lives in the aquatic environment and are not water soluble. The World Health Organization (Paris) recognizes AChE biomonitoring as a preventive measure against OP overexposure in non-target species (Romani et al., 2005). Its use as a specific biomarker to assess the exposure of aquatic organisms to these compounds is widely applied in laboratory and field studies (Bocquené et al., 1997; Scaps et al., 1997; Galloway et al., 2002; Binelli et al., 2006).

In vertebrates two isoforms occur, acetylcholinesterase (AChE) which preferentially hydrolyses acetyl esters such as acetylcholine, and butyrylcholinesterases (BChE) which preferentially acts on butyrylcholine. The main function of AChE is the rapid hydrolysis of the neurotransmitter, whereas BChE has no known specific natural substrate, although it is able to hydrolyse acetylcholine (Fulton and Key, 2001; Valbonesi et al., 2003). Another isoform, propionylcholinesterase (PChE), has been characterized (Mora et al., 1999). Since the properties of ChE may differ between species, it is important to characterize the type of enzyme present in the species studied before its use as a biomarker (Kristoff et al., 2006).

Whilst ChEs have been extensively studied in vertebrates and insects, few data are available in molluscs (Mora et al., 1999). Molluscs, in particular bivalves, are often used as sentinel organisms: their world-wide distribution, their sedentary mode of life and their filter-feeding behaviour susceptible to induce pollutant bioaccumulation make them ideal species for the assessment of environmental pollution (Rittschof and McClellan-Green, 2005). Prosobranch snails including Potamopyrgus antipodarum (Hydrobiidae) and Valvata piscinalis (Valvatidae) are important members of aquatic habitats and possess a high ecological relevance for freshwater ecosystems (Mouthon and Charvet, 1999). They have proved to be sensitive test organisms in several studies (Oetken et al., 2005) and P. antipodarum has been recommended for toxicity tests by the Invertebrate testing group of OECD (Duft et al., 2007). Using these animals might facilitate the linking of laboratory data to field studies and field experiments could be undertaken on autochthonous or caged animals.

The aim of this study was to characterize and to investigate the relevance of ChE activities as early warning tools of neurotoxic stress in two freshwater mudsnails. Activities in *P. antipodarum* and *V. piscinalis* were firstly characterized *in vitro* by using different substrates acetylthiocholine (ASCh), propionylthiocholine (PSCh) and butyrylthiocholine (BSCh) and specific inhibitors (eserine for ChE, BW284c51 for AChE, *iso*-OMPA for BChE). Secondly, *in vivo* effects of a model insecticide, chlorpyrifos, on ChE activities were then studied in order to assess the value of *P. antipodarum* and *V. piscinalis* as sentinel species of freshwater insecticide contamination.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine iodide (ASCh), butyrylthiocholine iodide (BSCh), propionylthiocholine iodide (PSCh), 5,5dithio-bis-2-nitrobenzoate (DTNB), eserine, BW284c51 (1,5-bis(4-allydimethylammoniumphenyl)-pentan-3-one dibromide), *iso*-OMPA (tetra-(monoisopropyl)pyrophosphor-tetra-mide) and chlorpyrifos were obtained from Sigma-Aldrich (Villefranche, France).

2.2. Organisms

P. antipodarum and *V. piscinalis* were obtained from the laboratory culture established in the laboratory (CEMAG-REF, Lyon, France). Animals were reared under standard conditions in aerated glass aquariums (17–20 l), at a temperature of 22 ± 1 °C, and under a 16–8 h artificial light-dark photoperiod regime. For the cultures, animals were fed using Tetramin[®]. For all experiments, adult snails of similar size (4 mm) were used.

2.3. Cholinesterase activity

The whole animals with shell were weighed and homogenized with an Ultra-Turrax T25 basic® at 24000 rpm for 40 s in 1:10 (W:V) for *V. piscinalis* and 1:20 for *P. antipodarum* 0.1 M phosphate buffer, pH 7.8, plus 0,1% Triton X-100. Homogenates were centrifuged at 9000×g for 15 min at 4 °C. Supernatants were used as the enzyme source.

The enzyme activity was measured following the Ellman method (1961). In a typical assay, 330 µl of 0.1 M phosphate buffer pH 7.8, 20 µl of 7.6 mM the chromogenic agent DTNB and 20 µl of sample were successively added in a 96 wells microtitre plate. Measurement of enzyme activity was initiated by the addition of 10 µl of freshly prepared acetylthiocholine iodide solution in distilled water. Absorption of the 2-nitro-5-thiobenzoate anion, formed from the reaction, was then recorded at 405 nm every 60 s for 9 min at room temperature using a TECAN[®] Safire[®] spectrofluorimeter. Spontaneous substrate hydrolysis was assessed using a blank without sample. Kinetic was calculated in the linear range. Each sample was analyzed in triplicates. Total protein was determined according to the

Lowry method (1951), using bovine serum albumin as standard. Enzyme activity was expressed as nmol ASCh hydrolysed min⁻¹ mg⁻¹ of protein.

2.3.1. Substrate affinity

Substrate preference in supernatants obtained from control organisms was assessed using ASCh, BSCh and PSCh as substrates. Fifteen animals sampled in our laboratory culture were individually homogenized and supernatants were pooled and used as samples. The effects of increased substrate concentration on ChE activity were determined with concentrations of ASCh, BSCh and PSCh ranging from 0.0625 to 8 mM. Three replicates of each substrate were performed.

2.3.2. Specific inhibitors

Eserine, *iso*-OMPA and BW284c51 were used as specific inhibitors of ChEs, BChEs and AChEs, respectively. Eserine and *iso*-OMPA were dissolved in ethanol and BW284c51 was dissolved in distilled water. Ten animals were individually homogenized and supernatants were pooled. Supernatants were then incubated 30 min at 20 °C with inhibitor or water or ethanol for eserine and *iso*-OMPA (1%). Final inhibitor concentrations ranged from 0.01 to 100 μ M for eserine and from 0.1 to 1000 μ M for *iso*-OMPA and BW284c51. Effects of inhibitors on ChE activities were assessed using ASCh, BSCh and PSCh as substrates.

2.4. Chlorpyrifos exposure

A seven days semi-static bioassay was performed, and the survival and the ChE activity of the snails were followed in the course of the experiment. Snails were placed in glass beakers filled with 300 ml of drilled ground water. Snails of both species were placed in the same beakers, one day before the beginning of the contamination experiment for acclimatization. Stock solutions of chlorpyrifos were prepared daily by dissolving chlorpyrifos in acetone used as solvent, and diluted in an appropriate amount of drilled ground water, using serial dilution. The concentration of acetone was kept at $0.05\%_{\!oo}$ in all pesticide solutions used. Solvent (acetone) and solvent-free (drilled ground water) controls were included in the test design. Water in beakers was renewed daily. For each concentration, five replicates with 10 animals of each species were carried out. One beaker of each nominal chlorpyrifos concentration was added for chemical analyses. No food was added during the experiment. Tests were performed as in rearing conditions.

Snails were exposed to three nominal chlorpyrifos concentrations (0.14, 2.86 and 14.2 nM, which correspond to 0.05, 1 and 5 μ g l⁻¹). For each concentration, one individual of each species were sampled on each of the five beaker per condition at 0, 24, 96 and 168 h and immediately frozen at -80 °C until analysis.

2.5. Measurement of chlorpyrifos concentration in water

Samples for chlorpyrifos analyses were collected every day, 10 min and 24 h after the water renewal in two beakers of each contamination levels (0.14, 2.86 and 14.2 nM). Chlorpyrifos was quantified after direct injection in LC-MS-MS. Chlorpyrifos ethyl standards were purchased from Riedel De Haën (Sigma-Aldrich, France). Standard stock solutions were prepared by dissolving 5 mg of accurately weighed reference standard in 50 ml acetone. The stock solutions were diluted with ultrapure water (Milli-Q, Millipore) for LC-MS-MS analysis standards.

Water samples were collected in glass bottles and then filtered on 0.20 μ m polyester filters (Chromafil PET 20/15 MS, Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Nine hundred and ninety microliters of filtered water was added to 10 μ l of deutered diuron (D6) used as injection standard.

Liquid chromatography was performed on an Agilent Series 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Chromatographic separation was achieved using a Synergi Fusion-RP 80A analytical column (4 µm particle size, 2 mm × 50 mm) from Phenomenex (Le Pecq, France), at a flow rate of 200 µl min⁻¹ with mobile phase consisting of acetonitrile and water (80/20, v/v), both with 0.1% v/v formic acid. Injection volume was 100 µl. The HPLC system was interfaced to a triple quadripole mass spectrometer (API 4000, Applied Biosystems, Les Ulis, France). The following transitions $352 \rightarrow 200$ and $350 \rightarrow 198 m/z$ were used respectively for quantification and confirmation of chlorpyriphos ethyl. Quantification was performed by internal calibration using diuron D6.

2.6. Data analysis

Results were expressed as means \pm standard error. Values were transformed (log X) to achieve normality when necessary. Data were analysed using ANOVA on Statgraphics[®] Centurion version XV.II software. Significance was set at $p \leq 0.05$. In the case of rejection of H_0 , an *a posteriori* LSD (least significant difference) test was applied. When data showed a concentration–dependant relationship, the median inhibitory concentration (IC₅₀) was calculated by logistic curve-fitting procedure using REGTOX[®] (http://eric.vindimian.9online.fr). The Michaelis–Menten constant (K_m) and the maximum velocity of substrate hydrolysis (V_{max}) were calculated using GOSA[®] software (http://www.bio-log.biz).

3. Results

3.1. In vitro experiments

3.1.1. Substrate affinity

For *P. antipodarum*, measured esterase activities depended on the substrate. The reaction rate increased with increasing substrate concentration, with ASCh > PSCh > BsCh (p < 0.05) (Fig. 1A). However, for the highest

555

B. Gagnaire et al. / Chemosphere 71 (2008) 553-560



Fig. 1. Substrate affinity of *P. antipodarum* (A) and *V. piscinalis* (B) ChEs measured at increasing concentrations of ASCh, PSCh and BSCh. Values are means of three replicates. Standard error is presented. a, b, and c represent significant differences between substrates at p < 0.05 (a > b > c).

concentrations (>2 mM), no differences were measured between activities with ASCh and PSCh (Fig. 1A). On the same way, increased ChE activity were measured for *V. piscinalis*, according to the substrate, with ASCh > PSCh > BsCh (p < 0.05) (Fig. 1B). No inhibitory effect was observed whatever the substrate used at high concentrations for both species. At the highest substrate concentration (8 mM) enzymatic activities (expressed as nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) for *P. antipodarum* were 31.6 ± 0.2 for ASCh (100%), 30.2 ± 1.2 for PSCh (95.5%) and 2.7 ± 0.3 for BSCh (8.5%). For *V. piscinalis*, enzymatic activities were 17.3 ± 0.5 for ASCh (100%), 9.1 ± 0.7 for PSCh (52.6%) and 3.9 ± 0.3 for BSCh (22.5%). Four millimolar was defined as the optimal concentration for ASCh and PSCh for both species.

ChE activities followed the Michaelis–Menten kinetic when ASCh and PSCh were used as substrates for both species (Fig. 1). Kinetics parameters ($K_{\rm m}$, $V_{\rm max}$, and $V_{\rm max}/K_{\rm m}$) are reported in Table 1. $K_{\rm m}$ values were 10 times higher for *V. piscinalis* than for *P. antipodarum*, whatever the substrate used.

3.1.2. Specific inhibitors

Eserine decreased significantly ChE activities measured with the three substrates for the two species (Fig. 2A and B). However, at 100 μ M of eserine, inhibition was lower for BSCh than for ASCh and PSCh for both snails. The

Table 1 Michaelis–Menten constant (K_m) and maximum rate of substrate hydrolysis (V_{max}) of ChEs of *P. antipodarum* and *V. piscinalis*. Results are expressed as the mean \pm SE of three replicates

-			
	$K_{\rm m}~({ m mM})$	$V_{\rm max}$ (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	$V_{\rm max}/K_{\rm m}$ (ml min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)
P. antij	podarum		
ASCh PSCh	$\begin{array}{c} 0.13 \pm 0.065 \\ 0.32 \pm 0.09 \end{array}$	$\begin{array}{c} 29.6 \pm 2.7 \\ 30.2 \pm 2.2 \end{array}$	0.23 9.43×10^{-2}
V. pisci	inalis		
ASCh PSCh	$\begin{array}{c} 1.31\pm0.37\\ 3.19\pm2.66\end{array}$	$\begin{array}{c} 20.6 \pm 1.7 \\ 13.4 \pm 5.0 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1.57 \times 10^{-2} \\ 4.62 \times 10^{-3} \end{array}$

inhibition profiles of ASCh and PSCh were similar for *P. antipodarum* and *V. piscinalis*. Nevertheless, whatever the substrate used, the IC₅₀ values of eserine were lower for *P. antipodarum* (0.034, 5.29 and 0.024 μ M) than for *V. piscinalis* (1.39, 8.68 and 1.40 μ M) for ASCh, BSCh and PSCh, respectively.

Iso-OMPA only induced a significant decrease butyrylcholinesterase activity of *P. antipodarum* (Fig. 2C and D). However, 50% of inhibition was not reached in our experiment).

BW284c51 significantly decreased the activities obtained for ASCh and PSCh for both gastropod species. For BSCh, the activity was significantly decreased only for *V. piscinalis* (Fig. 2E and F). The inhibition profiles of ASCh and PSCh and the IC₅₀ values were similar for *P. antipodarum* (290.4 and 387.1 μ M) and *V. piscinalis* (150.2 and 262.2 μ M) for ASCh and PSCh, respectively.

3.2. In vivo experiments

3.2.1. Concentration of chlorpyrifos in water

Chlorpyrifos concentrations in water were analyzed after 10 min and 24 h in the experimental conditions. Measured concentrations of chlorpyrifos for the three nominal concentrations (0.14, 2.86 and 14.2 nM) were 0.28 ± 0.02 , 2.65 ± 0.2 and 13.12 ± 0.8 nM 10 min after water renewal, respectively, and 0.22 ± 0.02 , 1.48 ± 0.1 , 5.98 ± 0.4 nM 24 h after water renewal, respectively (data not shown). After 24 h of contamination, a decrease of concentration was observed: chlorpyrifos measured concentrations were 58.1%, 39.5% and 27.2% of the concentrations measured at 10 min (data not shown).

3.2.2. In vivo effects of chlorpyrifos on ChE activity

During the seven days of experiment, no mortality was reported for *P. antipodarum*, neither in controls, nor in contaminated beakers. A slight mortality was registered for *V. piscinalis* (5–6% of cumulative mortality), but this was not significantly different between controls and contaminated animals (data not shown).

In vivo exposure to chlorpyrifos led to inhibition of ChE activity in *P. antipodarum* (Fig. 3A). Decrease of activity


B. Gagnaire et al. / Chemosphere 71 (2008) 553-560

Fig. 2. Effects of eserine (A and B), iso-OMPA (C and D) and BW284c51 (E and F) on ChE activity in *P. antipodarum* (A, C and E) and *V. piscinalis* (B, D and F). Values are means of three replicates. Standard error is presented. *: p < 0.05; ***: p < 0.001.



Fig. 3. ChE activities (percentage of control) for *P. antipodarum* (A) and *V. piscinalis* (B) during *in vivo* contamination with chlorpyrifos. Values are means of five replicates. Standard error is presented. ***: p < 0.001.

was time and dose-dependent. After 24 h and 96 h of exposure, activity was significantly decreased for 14.2 nM compared to control. Values were 11.4 and 4.9 nmol ASCh $\min^{-1} mg^{-1}$ protein, respectively, which represented an activity of 63.3% and 31.5% of the control (100%). At 168 h, activity was significantly decreased for 2.86 and 14.2 nM compared to control. Values were 5.9 and 2.9 nmol ASCh min⁻¹ mg⁻¹ protein, respectively, which represented

B. Gagnaire et al. / Chemosphere 71 (2008) 553-560

an activity of 40.5% and 20.2% of the control (100%). IC_{50} values of chlorpyrifos were 16.34, 9.71 and 3.15 nM at 24, 96 and 168 h, respectively.

No significant inhibition occurred for *V. piscinalis*, however a slight significant increase occurred for nominal concentration of 0.14 nM after seven days of contamination (p < 0.05, Fig. 3B).

4. Discussion

The level of ChE activity obtained for our species (31.6 for *P. antipodarum* and 17.3 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein for V. piscinalis) was quite similar to those reported in the literature for several bivalve species (between 3 and 20 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) (Bocquené et al., 1997; Najimi et al., 1997; Mora et al., 1999; Valbonesi et al., 2003; Binelli et al., 2006). Literature reports AChE activities values of 20-45 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein for annelids *Eisena* andrei (Caselli et al., 2006), Nereis diversicolor (Scaps and Borot, 2000). However, an AChE activity of 320 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein was reported in Lumbriculus variegatus (Kristoff et al., 2006). A few studies reported AChE level for other gastropods. The basal AChE activity of the bloodfluke planorb, Biomphalaria glabrata, was 45 nmol $min^{-1} mg^{-1}$ protein (Kristoff et al., 2006) and was 60 nmol $min^{-1} mg^{-1}$ protein for the murex, *Hexaplex trunculus* (Romeo et al., 2006).

Vertebrate cholinesterases have been classified into two groups, acetyl ChE and butyryl ChE, depending on substrate hydrolysis and sensitivity to inhibitors. AChE hydrolyses ASCh much faster than other choline esters, like PSCh, and is inactive on BSCh, whereas BChE hydrolyses both BSCh and ASCh at an appreciable rate (Valbonesi et al., 2003). Several studies show that situation of invertebrate cholinesterases is more complex. ASCh has been reported as the preferential substrate for most bivalves including oysters (Bocquené et al., 1997; Valbonesi et al., 2003), marine and freshwater mussels (Mora et al., 1999; Romani et al., 2005; Binelli et al., 2006), as well as for *E. andrei* (Caselli et al., 2006), *B. glabrata* (Kristoff et al., 2006), and the common shredder, *Gammarus pulex* (Xuereb et al., 2007).

Both species of gastropods studied here showed different affinities toward the three substrates used (ASCh, PSCh and BSCh). At high concentrations of substrates, *P. antipodarum* cholinesterase presented the same affinity for ASCh and PSCh. *V. piscinalis* presented a higher affinity for ASCh. However, the enzymatic activity level was lower for *V. piscinalis*. In our study, gastropods revealed a low BSCh hydrolysis.

Comparative analysis of the K_m values in *P. antipodarum* indicated that ChE affinity for ASCh and PSCh were in the same range of that reported for *E. andrei* (0.18 and 0.14 mM for ASCh and PSCh, respectively) (Caselli et al., 2006) and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (0.124 mM for PSCh) (Bocquené et al., 1997), while *V. piscinalis* showed higher values, closer to those reported in the blue mussel, *Mytilus edulis* (1.3 mM for ASCh) (Galloway et al., 2002). Moreover, these values appeared one order of magnitude higher than that generally reported for bivalves: $50-93 \mu$ M for *Ostrea edulis, Mytilus galloprovincialis, Crassostrea. gigas* (ASCh), *Corbicula fluminea* (PSCh), *Perna perna* (Bocquené et al., 1997; Najimi et al., 1997; Mora et al., 1999; Valbonesi et al., 2003). High K_m values represent lower ChE affinity by substrate. Therefore, ChE activities of *V. piscinalis* presented lower affinity to substrates than *P. antipodarum* ones.

 $V_{\rm max}$ values were similar for both species. For *P. antipodarum*, the ASCh ratio $V_{\rm max}/K_{\rm m}$ was in the same range that those reported in *M. galloprovincialis* (0.24 ml min⁻¹ mg⁻¹ protein) (Valbonesi et al., 2003) and *E. andrei* (0.25 ml min⁻¹ mg⁻¹ protein) (Caselli et al., 2006). ASCh $V_{\rm max}/K_{\rm m}$ ratio for *V. piscinalis* was closer to *O. edulis* one $(5.1 \times 10^{-2} \text{ ml min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein) (Valbonesi et al., 2003). These results indicated that *V. piscinalis* enzyme has a lower efficiency of hydrolysis than *P. antipodarum*, in agreement with the lower activity observed and with the lower substrate affinity, as discussed before.

Enzymatic activity observed with BSCh was inhibited for both species by eserine, a cholinesterase inhibitor. Enzymatic activities measured using ASCh and PSCh were almost totally inhibited by eserine in both species. Iso-OMPA, a specific inhibitor of BChE in vertebrates (Bocquené et al., 1997), did not modified this activity in V. piscinalis. However, a significant inhibition occurred in P. antipodarum. An important decrease was observed in both species with BW284c51, specific inhibitor of AChEs in vertebrates (Caselli et al., 2006).

The whole results suggest that *V. piscinalis* possesses a single ChE isoform, which presents all the properties of a vertebrate AChE: high preference for ASCh and low for BSCh; high sensitivity to eserine and BW284c51, but not to *iso*-OMPA. On the contrary, more complex isoforms of ChE seem to coexist in *P. antipodarum*, one major isoform presenting properties intermediate between an AChE and a PChE, and another minor isoform presenting properties of a BChE.

IC₅₀ reported for eserine in *P. antipodarum* were in the same range than the values reported for other invertebrates (0.01, 0.01, 0.14, 0.020 and 0.014 μ M for *B. glabrata, L. variegatus, O. edulis, M. galloprovincialis* and *E. andrei*, respectively) (Valbonesi et al., 2003; Caselli et al., 2006; Kristoff et al., 2006). However, values for *V. piscinalis* were higher. These results suggest that *V. piscinalis* ChEs are less sensitive that in *P. antipodarum*.

In our experiments, we measured effects of chlorpyrifos on *P. antipodarum* and *V. piscinalis.* Chlorpyrifos is a widely used organophosphate insecticide and is the active ingredient in a number of commonly used household and agricultural insecticide formulations (Fulton and Key, 2001). It is volatile and concentration decreases rapidly in water in constant exposure conditions. For these reasons, we performed the laboratory experiment using semi-static conditions. Nevertheless, an important decrease of chlorpyrifos level was measured after 24 h. A similar 50% loss was reported in a contamination experiment of *G. pulex* to 0.3 nM of chlorpyrifos: concentration reached 0.17 nM after 24 h of exposition (Ashauer et al., 2006).

Chlorpyrifos was tested in this study at concentrations ranging from 0.14 to 14.2 nM (0.05–5 μ gl⁻¹). Measured concentrations of chlorpyrifos in surface waters often fall at concentrations below the nM level (USEPA, 2002). However, studies showed that chlorpyrifos concentrations in small streams and wetlands adjacent to agricultural fields could range from 0.2 to 2 μ M (Moore et al., 2002). Moreover, the relatively short-half life of chlorpyrifos in water may result in underestimate levels of exposure (Mazanti et al., 2003).

We demonstrated the dose-response and time-dependant effects of chlorpyrifos on P. antipodarum: for 14.2 nM, inhibition was 40% of the control after 24 h of contact and increased to 80% of the control after 168 h of contact, without significant mortality. However, an increase of ChE activity was shown on V. piscinalis. Chlorpyrifos have already been shown as a powerful AChE inhibitor in invertebrates. Chlorpyrifos decreased AChE activity after 96 h of contact in D. polymorpha (0.03 nM) (Binelli et al., 2006) and in C. fluminea (80% inhibition at 1.4 and 2.8 µM) (Cooper and Bidwell, 2006). Chlorpyrifos also decreased in vitro AChE activity in M. edulis (Galloway et al., 2002) and in in vivo exposures in the midge, Chironomius riparius (Callaghan et al., 2001) and in rat brain (Hancock et al., 2007), which agrees with our results. On the contrary, this OP increased AChE activity in S. inaequivalvis after 15 days of exposure to 0.3 nM (Romani et al., 2005), which comforts our results on V. piscinalis; however, the biological explanation remains unknown. IC₅₀ of chlorpyrifos for AChE was 9.71 nM in P. antipodarum at 96 h, which was 10 times higher that for G. pulex in the same experimental conditions (Xuereb et al., 2007).

High resistance of *V. piscinalis* to eserine *in vitro* and to chlorpyrifos *in vivo* may be related to the lower ChE affinity to the substrate. On the contrary, high substrate specificity and high sensitivity to eserine *in vitro* and chlorpyrifos *in vivo* would suggest that *P. antipodarum* ChEs could be very sensitive to anti-cholinesterase agents.

In our study, we showed that inhibition of AChE happened for *P. antipodarum* without any mortality. The relationship between AChE inhibition and mortality in invertebrates is generally less well established than in vertebrates. No mortality was observed after an environmental contamination with azinphos-methyl in *B. glabrata* and *L. variegatus* (Kristoff et al., 2006), even though inhibition of AChE reached between 35% and 99% of control. However, a high mortality was observed in *N. diversicolor* contaminated with parathion and malathion when 55% of AChE inhibition occurred (Scaps et al., 1997). A high mortality and 70% of AChE inhibition also occurred in *G. pulex* exposed to chlorpyrifos (Xuereb et al., 2007). More research is needed to clarify the relationships between OP exposure, AChE inhibition and mortality. *P. antipodarum* AChE could be an useful biomarker of pesticide contamination as its inhibition occurred at low concentration without mortality. Therefore, *P. antipodarum* could be used in field contamination assessment. However, ChE activities may be differentially modulated depending on the pollutant tested (Ozretic and Krajnovic-Ozretic, 1992). To better assess the interest of *P. antipodarum* as field sentinel species, we need to confirm its sensitivity to several anti-cholinesterase compounds and in different exposure conditions. Moreover, as pesticide contamination in the field is a discontinuous phenomenon, it will be necessary to test recovery of AChE activity after a contamination and to assess the effects of successive contamination exposure.

5. Conclusion

The aim of our work was to characterize *P. antipodarum* and *V. piscinalis* ChEs. Our results show that *P. antipodarum* possesses several isoforms of ChEs, one undifferentiated between an AChE and a PChE, and another one which could be assimilated as a BChE. *V. piscinalis* seems to possess only one isoform close to the vertebrate AChE. Our results also illustrate the relative insensitivity of ChE activity following *V. piscinalis* exposure to environmental concentrations of chlorpyrifos. On the contrary, the present study gives valuable indications for selecting *P. antipodarum* in biomonitoring programs.

Laboratory studies generally do not take into account natural stressors, including fluctuations in biotic and abiotic factors, which could have effects on AChE activity (Bocquené et al., 1997). Some complementary experiments are needed in order to identify the factors inducing ChE variability (age, season) in order to make the difference between effects due to chemical exposure and the natural variability.

Acknowledgments

R. Mons and H. Queau are acknowledged for their technical assistance during chlorpyrifos contamination. C. Guillemain is acknowledged for the chlorpyrifos analyses.

References

- Ashauer, R., Boxall, A., Brown, C., 2006. Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Arch. Environ. Con. Tox. 51, 542–548.
- Binelli, A., Ricciardi, F., Riva, C., Provini, A., 2006. New evidences for old biomarkers: Effects of several xenobiotics on EROD and AChE activities in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). Chemosphere 62, 510–519.
- Bocquené, G., Roig, A., Fournier, D., 1997. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*). Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. FEBS Lett. 407, 261–266.
- Callaghan, A., Hirthe, G., Fisher, T., Crane, M., 2001. Effect of shortterm exposure to chlorpyrifos on developmental parameters and biochemical biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. Ecotox. Environ. Safe. 50, 19–24.

560

B. Gagnaire et al. / Chemosphere 71 (2008) 553-560

- Caselli, F., Gastaldi, L., Gambi, N., Fabbri, E., 2006. *In vitro* characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei*. Comp. Biochem. Phys. C 143, 416–421.
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R., 2006. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. Aquat. Toxicol. 76, 258–267.
- Duft, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2007. Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicals – an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. Ecotoxicology 16, 169–182.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr., V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environ. Toxicol. Chem. 20, 37–45.
- Galloway, T.S., Millward, N., Browne, M.A., Depledge, M.H., 2002. Rapid assessment of organophosphorous/carbamate exposure in the bivalve mollusc *Mytilus edulis* using combined esterase activities as biomarkers. Aquat. Toxicol. 61, 169–180.
- Hancock, S., Ehrich, M., Hinckley, J., Pung, T., Jortner, B.S., 2007. The effect of stress on the acute neurotoxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. Toxicol. Appl. Pharm. 219, 136–141.
- Kristoff, G., Guerrero, N.V., de D'Angelo, A.M.P., Cochon, A.C., 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus* variegatus. Toxicology 222, 185–194.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265– 275.
- Mazanti, L., Rice, C., Bialek, K., Sparling, D., Stevenson, C., Johnson, W.E., Kangas, P., Rheinstein, J., 2003. Aqueous-phase disappearance of atrazine, metolachlor, and chlorpyrifos in laboratory aquaria and outdoor macrocosms. Arch. Environ. Con. Tox. 44, 67–76.
- Moore, M.T., Schulz, R., Cooper, C.M., Smith Jr., S., Rodgers Jr., J.H., 2002. Mitigation of chlorpyrifos runoff using constructed wetlands. Chemosphere 46, 827–835.
- Mora, P., Michel, X., Narbonne, J.-F., 1999. Cholinesterase activity as potential biomarker in two bivalves. Environ. Toxicol. Phar. 7, 253– 260.
- Mouthon, J., Charvet, S., 1999. Compared sensitivity of species, genera and families of Molluscs to biodegradable pollution. Ann. Limnol – Int. J. Lim. 35, 31–39.

- Najimi, S., Bouhaimi, A., Daubeze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrim, A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir marine bay (South of Morocco). B. Environ. Contam. Toxicol. 58, 901–908.
- Oetken, M., Nentwig, G., Loffler, D., Ternes, T., Oehlmann, J., 2005. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine.. Arch. Environ. Con. Tox. 49, 353–361.
- Ozretic, B., Krajnovic-Ozretic, M., 1992. Esterase heterogeneity in mussel Mytilus galloprovincialis: effects of organophosphate and carbamate pesticides in vitro. Comp. Biochem. Phys. C 103, 221–225.
- Rittschof, D., McClellan-Green, P., 2005. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. Mar. Pollut. Bull. 50, 369–373.
- Romani, R., Isani, G., De Santis, A., Giovannini, E., Rosi, G., 2005. Effects of chlorpyrifos on the catalytic efficiency and expression level of acetylcholinesterases in the bivalve mollusk *Scapharca inaequivalvis*. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2879–2886.
- Romeo, M., Gharbi-Bouraoui, S., Gnassia-Barelli, M., Dellali, M., Aissa, P., 2006. Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants. Sci. Total Environ. 359, 135–144.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S., 2006. Molecular biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. Ecotoxicology 15, 333–340.
- Scaps, P., Demuynck, S., Descamps, M., Dhainaut, A., 1997. Effects of organophosphate and carbamate pesticides on acetylcholinesterase and choline acetyltransferase activities of the polychaete *Nereis diversicolor*. Arch. Environ. Con. Tox. 33, 203–208.
- Scaps, P., Borot, O., 2000. Acetylcholinesterase activity of the polychaete Nereis diversicolor: effects of temperature and salinity. Comp. Biochem. Phys. C 125, 377–383.
- USEPA, 2002. Interim registration eligibility decision for chlorpyrifos. URL: http://www.epa.gov/REDs/chlorpyrifos_ired.pdf. Final/ Technical Report, US Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Valbonesi, P., Sartor, G., Fabbri, E., 2003. Characterization of cholinesterase activity in three bivalves inhabiting the North Adriatic sea and their possible use as sentinel organisms for biosurveillance programmes. Sci. Total Environ. 312, 79–88.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Phar. 13, 57–149.
- 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.

2. IMPACT DE FACTEURS CONFONDANTS

Note n°1 :

Effet de la méthode et de la durée de conservation des échantillons sur l'activité ChE chez *Gammarus fossarum*

Résumé

En vue de valider et de standardiser la procédure de préparation et de traitement des échantillons pour la mesure de l'activité AChE, nous avons étudié l'influence de la méthode et de la durée de conservation. Pour cela, des pools de gammares ont été conservés à -80 °C sous une forme congelée ou lyophilisée durant 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60 et 120 jours.

Aucun effet de la durée de conservation n'a été mis en évidence quelque soit la méthode employée. En revanche, l'activité AChE mesurée sur les échantillons congelés était significativement plus forte que celle mesurée avec les échantillons lyophilisés. Les valeurs d'activité AChE mesurées sur des échantillons conditionnés de différentes manières ne peuvent donc pas être rigoureusement comparées.

Pour la suite de nos travaux, nous avons choisi la congélation, plus simple et plus rapide que la lyophilisation.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Effet de la méthode et de la durée de conservation des échantillons sur l'activité ChE chez *Gammarus fossarum*

Introduction

La mesure précise et répétable d'un biomarqueur nécessite d'avoir préalablement mis au point, validée et standardisée la procédure de préparation et de traitement des échantillons. Le stockage des échantillons est une étape critique de cette procédure, en particulier lorsque l'on étudie des variables moléculaires qui peuvent être très rapidement altérées dans de mauvaises conditions de conservation.

Bien que la mesure de l'activité AChE figure parmi les plus anciens biomarqueurs utilisés en écotoxicologie, peu de données relatives aux effets des méthodes et de la durée de stockage des échantillons sont disponibles dans la littérature. Il a été rapporté, chez quelques espèces de poissons et de mollusques bivalves, que le conditionnement des échantillons à -80 °C permet de maintenir une activité AChE constante durant plusieurs mois (Mora, 1998; Phillips *et al.*, 2002; Pathiratne *et al.*, 2008). Cependant, à notre connaissance, aucun travail abordant la question chez les crustacés n'a été publié. Il semblerait également que les différentes méthodes de conservation classiquement employées (*e.g.* congélation et lyophilisation) n'aient pas fait l'objet d'étude d'inter-comparaison.

But de l'étude

L'objectif de cette étude était d'évaluer les effets de la méthode ainsi que de la durée du stockage des échantillons sur le niveau de base de l'activité AChE de *Gammarus fossarum*. Deux conditions de stockage à -80 °C (*i.e.* congélation et lyophilisation) et 8 durées de conservation (1, 2, 4, 8, 15, 30, 60 et 120 jours) ont été testées.

Les organismes ont été prélevés en amont de la Bourbre sur le site de La Tour du Pin (voir section II-1.1) en Avril 2006. Après une période d'acclimatation en laboratoire d'environ 15 jours (voir section II-1.2), 90 pools de 5 mâles de taille homogène (d'un poids frais de 22 ± 3 mg) ont été sélectionnés. Les pools destinés à être conservés ont été saisis dans de l'azote liquide puis stockés en l'état à -80 °C, ou lyophilisés durant 24 h au moyen d'un lyophilisateur Alpha 1-4[®] (Christ) avant d'être stockés à -80 °C. L'activité AChE (voir section II-3.1) a été mesurée sur des pools d'organismes (n = 5 par condition) frais (*i.e.* vivants), immédiatement après congélation dans l'azote liquide ou après 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60 et 120 jours de conservation sous forme congelée ou lyophilisée.

Résultats et discussion

La congélation comme la lyophilisation assure le maintien de l'activité AChE corporelle de *G. fossarum*. L'activité enzymatique est restée stable même après plusieurs mois de conservation, quelque soit la méthode de stockage employée (Fig. 1), bien que la congélation permette une meilleur répétabilité des mesures. En effet, les coefficients de variation (CV) calculés sur l'ensemble des données sont de 5.5 % pour les échantillons congelés et 9.9 % pour les échantillons lyophilisés. De plus, aucune corrélation n'a été établie entre la durée de conservation et l'activité AChE mesurée (respectivement, $R^2 = 0.004$ et 0.023, p = 0.28 et 0.16).



Temps de conservation (jour)

Figure 1 : Activité AChE corporelle (nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) mesurée sur des échantillons de *G. fossarum* stockés sous forme congelée et lyophilisée, après différentes périodes de conservation. Les données sont présentées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). La ligne en pointillés orange représente la valeur moyenne de l'activité AChE corporelle mesurée dans les pools d'organismes frais.

La valeur moyenne d'activité enregistrée pour les échantillons lyophilisés (41.57 ± 4.19 nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) est relativement proche de celle mesurée dans les échantillons d'organismes frais. En comparaison, l'activité mesurée dans les échantillons congelés (47.53 ± 4.52 nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) est significativement plus forte ($p < 10^{-6}$).

Cette différence s'explique principalement par le fait que la fraction protéique totale extraite des échantillons congelés est significativement plus faible ($p < 10^{-6}$) que celle extraite des échantillons lyophilisés (Fig. 2) ; sans que toutefois cela ait une incidence sur la quantité d'enzyme active. En effet, aucune différence d'activité non-normalisée par la concentration en protéines (p > 0.20) n'a été observée entre les deux méthodes de stockage (Fig. 3). De plus il peut être noté que la variabilité inter-échantillons diminue lorsque l'activité AChE est

exprimée en nmol.min⁻¹, avec des CV de 3.8 et 8.0 % concernant respectivement les échantillons congelés et les échantillons lyophilisés.



Figure 2: Relation entre l'activité AChE corporelle (nmol.min⁻¹.mg de protéines⁻¹) et la concentration en protéines totale (g.l⁻¹) mesurées sur des échantillons de G. fossarum frais (▲), congelés (●) et lyophilisés (○).

Les données sont reportées comme des valeurs individuelles. * signifie que la corrélation est significative (p < 0.05).



Temps de conservation (jour)

Figure 3 : Activité AChE corporelle non-normalisée (nmol.min⁻¹) mesurée sur des échantillons de *G. fossarum* stockés sous forme congelée et lyophilisée, après différentes périodes de conservation.

Les données sont présentées comme des moyennes \pm écart type (n = 5). La ligne en pointillés orange représente la valeur moyenne de l'activité AChE corporelle non-normalisée mesurée dans les pools d'organismes frais.

Conclusion

La conservation des échantillons à -80 °C, que ce soit sous forme congelée ou lyophilisée assure le maintien de l'activité AChE du gammare, même après plusieurs mois de stockage. En revanche, la méthode de conservation semble influer sur les propriétés d'extraction protéique des échantillons. Les valeurs d'activité AChE mesurées sur des

échantillons conditionnés de différentes manières ne peuvent donc pas être rigoureusement comparées lorsque l'activité AChE est normalisée par la concentration en protéine.

Pour la continuité de nos travaux, nous avons opté pour la méthode de congélation ; plus simple et plus rapide que la lyophilisation, elle permet également une meilleure répétabilité des mesures.

Références

- **MORA, P. (1998)**. Caractérisation des cholinestérases de trois mollusques bivalves: Mytilus edulis, Mytilus Galloprovincialis et Corbicula fulminea. Contribution au developpement d'un biomarqueur de contamination des milieux marins et dulçaquicoles. Université de Bordeaux I, 260 pp.
- PATHIRATNE, A., CHANDRASEKERA, L.W.H.U. & DE SERAM, P.K.C. (2008). Effects of biological and technical factors on brain and muscle cholinesterase in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Implications for biomonitoring neurotoxic contaminations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 309-317.
- **PHILLIPS, T.A., SUMMERFELT, R.C. & ATCHISON, G.J. (2002)**. Environmental, biological, and methodological factors affecting cholinesterase activity in Walleye (*Stizostedion vitreum*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 43, 75-80.

Publication n°3:

Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels and a reliable tool for field survey.

Benoît Xuereb, Arnaud Chaumot, Raphael Mons, Jeanne Garric, & Olivier Geffard.

L'utilisation appropriée d'une activité enzymatique en tant que biomarqueur requiert une bonne connaissance de son niveau de base ainsi que de sa variabilité naturelle vis-à-vis de facteurs biotiques et abiotiques. En vue d'utiliser l'activité corporelle de l'acétylcholinestérase (AChE) chez Gammarus fossarum comme un biomarqueur fiable de l'exposition aux agents anti-cholinestérasiques, (i) les effets des principaux facteurs biotiques (le sexe, le statut reproducteur et le poids) et abiotiques (température de l'eau) sur le niveau d'activité de base de cette enzyme ont été mesurés en laboratoire, et (ii) sa variabilité spatio-temporelle au sein de différentes populations naturelles, a été suivie sur une période d'un an. Les résultats ne montrent aucun effet direct du sexe. Toutefois, des différences significatives d'activité AChE ont été observées au sein des femelles en fonction de leur statut reproducteur. Les niveaux d'activité AChE ont été montrés pour être fortement et négativement corrélés aux poids des organismes. En effet, l'activité AChE diminue au cours de la croissance des juvéniles et tend à se stabiliser chez les adultes. Ces résultats nous ont conduit à sélectionner un « organisme standard » (mâle avec un poids de 15-20 mg) afin de minimiser la variabilité interindividuelle. Aucun effet de la température n'a été observé pour la gamme testée en laboratoire (6-24 °C). De la même manière, aucun changement spatio-temporel relatif à la saison et/ou aux caractéristiques physicochimiques de l'eau (telles que la conductivité ou la température) n'a été enregistré durant l'étude de terrain. Sur la base de ces données, nous avons défini, chez l'organisme standard, un niveau d'activité de référence ainsi que des seuils d'activité maximale et minimale au delà desquels la modulation traduit une exposition à un composé anti-ChE.

Mots clés : Biomonitoring, Cholinestérase, *Gammarus fossarum*, Variations spatiales et temporelles, Valeurs de référence.

Aquatic toxicology (2009) 93: 178-189

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Aquatic Toxicology 93 (2009) 225-233

Contents lists available at ScienceDirect



Aquatic Toxicology



journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda) Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys

Benoît Xuereb, Arnaud Chaumot, Raphael Mons, Jeanne Garric, Olivier Geffard*

Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, UR BELY, F-69336 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 5 January 2009 Received in revised form 6 May 2009 Accepted 9 May 2009

Keywords: Biomonitoring Cholinesterase Gammarus fossarum Spatial and temporal variations Reference value

ABSTRACT

The appropriate use of an enzyme activity as a biomarker requires good knowledge of its basal level and its natural variability related to intrinsic biotic and environmental abiotic factors. In view of using wholebody acetylcholinesterase (AChE) activity in Gammarus fossarum as a reliable biomarker of exposure to anti-cholinesterase agents in aquatic ecosystems, (i) the effects of the main biotic (sex, reproductive status, and weight) and abiotic (water temperature) factors on the basal activity level of this enzyme were measured in the laboratory and (ii) the spatio-temporal variability of basal enzyme activity was followed in wild populations over a 1-year period. The results show no direct effect of sex. However, significant differences in AChE activity were observed between females depending on gonadal and embryonic development. A strong negative correlation between the AChE activity levels and organism body weight was observed. Indeed, AChE activity decreases drastically during the early life stages and tends to stabilise in larger individuals. These reports led us to select a standard organism (male; weight range, 15-20 mg) to minimise inter-individual variability. No effect of temperature on basal AChE activity was observed in the laboratory for the tested range (6-24 °C). Similarly, no spatio-temporal change relative to season or the physico-chemical characteristics of the water (such as conductivity and temperature) was recorded during the field survey. On the basis of field-collected data, we defined the standard organism having a reference activity level with minimal and maximal threshold values. Finally, the value of AChE activity normalisation by protein contents is discussed.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

A large amount and great diversity of chemical compounds have been and still are introduced into aquatic ecosystems. Consequently, to assess whether organisms are impacted by these pollutants, biological indicators have been developed and used over the past few years, using biological metrics from subcellular to ecosystem levels. In this context, biochemical biomarkers, at the suborganism level, have been considered sensitive and toxicologically relevant tools reflecting the biological responses towards anthropogenic pollutions (Depledge and Fossi, 1994). Biomarkers are useful tools because their responses integrate spatial and temporal environmental variations, which modulate the exposure conditions of organisms to contaminants.

Today, the most widely used insecticides in agricultural, commercial, and urban settings are organophosphorous (Ops) and carbamate (Cbs) compounds. Most of these compounds have low persistence in aquatic ecosystems, but the relative lack of tar-

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

get specificity has raised concerns about their potential to cause adverse effects on non-target wildlife populations, particularly invertebrates (Schulz and Liess, 1999). The toxicity of Ops and Cbs pesticides results mainly from the inhibition of acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) activity. AChE is responsible for the hydrolytic degradation of acetylcholine, which is the primary neurotransmitter in the sensory and neuromuscular systems in most animal species. This enzyme plays a key role in regulation of cholinergic nervous transmission. AChE inhibition leads to overstimulation of the central and peripheral nervous system, resulting in deleterious effects for the organism, and ultimately death. Consequently, since the 1970s, inhibition of AChE is proposed as a specific biomarker for exposures to Ops and Cbs (Payne et al., 1996; Fulton and Key, 2001).

Among freshwater species, crustacean amphipods are suitable organisms for ecotoxicological assessment of environmental pollutants (Gerhardt et al., 1998; McLoughlin et al., 2000; Correia et al., 2002a; Correia et al., 2002b; Maltby et al., 2002; Wallace and Estephan, 2004; Geffard et al., 2007). Gammarids are widespread and common in the streams of Western Europe where they are often found in high density. They are ecologically relevant species since they represent an important reserve of food for macroinvertebrate, fish, bird, and amphibian species (Welton, 1979; Friberg et al., 1994;

^{*} Corresponding author at: Cemagref, UR BELY, 3 bis quai Chauveau, CP 220, F-69336 Lyon, France. Tel.: +334 72 20 87 85; fax: +33 4 78 47 78 75.

⁰¹⁶⁶⁻⁴⁴⁵X/\$ - see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.006

226

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 93 (2009) 225-233

MacNeil et al., 2002) and play a major part in leaf litter breakdown processes (Maltby et al., 2002). In *Gammarus* spp., AChE activity has never been characterised and used during laboratory and field studies for pollutants and contamination source assessment in aquatic areas (Kuhn and Streit, 1994; Streit and Kuhn, 1994; Crane et al., 1995; McLoughlin et al., 2000; Xuereb et al., 2007).

However, the interpretation of AChE data is fraught with difficulty because biotic and environmental factors are known to affect enzyme activities. Depending on food availability, reproductive stage, growth, and a number of other factors, the levels of biomarker responses may fluctuate extensively. As a result, changes in biomarker levels may simply be a natural part of the physiological cycle of species and thus quite unrelated to changes in exposure to chemical pollution (Sheehan and Power, 1999). In freshwater and seawater bivalves, seasonal variation has been identified as one of the most important regulating factors of AChE activity, depending on the reproductive cycle and growth period of species (Radenac et al., 1998; Dellali et al., 2001; Robillard et al., 2003; Leinio and Lehtonen, 2005). Other studies have shown that the water's pH and salinity affect AChE activity of Nereis diversicolor (Scaps and Borot, 2000), Anodonta cygnea (Robillard et al., 2003), Mytilus spp. (Pfeifer et al., 2005), Crangon crangon (Menezes et al., 2006) and Eurytemora affinis (Cailleaud et al., 2007). Although crustaceans are more sensitive to anti-cholinesterase compounds than bivalve and vertebrate species (Kuhn and Streit, 1994; Forget et al., 2003; Xuereb et al., 2007), few studies have focused on the range of natural variability of AChE activity in freshwater species (Jemec et al., 2007; Printes et al., 2008).

The ideal biomarker would only be modulated by contaminants, but in reality, this is highly unlikely to occur (Sheehan and Power, 1999). Consequently, *in situ* biomarker applications generally amount to occasional comparisons between reference and impacted sites. To distinguish contaminant effects with biomarkers and prevent any misinterpretation due to potential factors of variability, biomarkers are mainly applied to sites with similar physico-chemical parameters (e.g., upstream and downstream from point sources) (Flammarion et al., 2002). However, in this context, it is not conceivable to make widespread use of AChE activity as a bio-monitoring tool.

In the perspective of a bio-monitoring application, it is essential to (i) develop a procedure for which the lowest biomarker variability related to methodological and intrinsic biotic factors is obtained and (ii) define reference values of biomarker basal response taking into account its spatio-temporal changes. This study aims to apply this approach to developing the whole-body AChE activity measurement in *Gammarus fossarum* and to use it as a simple, robust and reliable biomarker in bio-monitoring programmes. This required us to assess the effects of biotic (sex, weight, reproductive status) and abiotic (temperature) factors on the AChE activity of organisms previously acclimatised in the laboratory and to study AChE activity on a monthly basis in wild gammarid populations from different catchment areas during an annual field survey.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

G. fossarum were collected using a net (by kick sampling) and different size classes were separated by sieving. Immediately after sampling, specimens were stored in plastic bottles containing ambient fresh water, and quickly transferred to the laboratory. The organisms used during laboratory assays were collected from La Tour du Pin, upstream of the Bourbre River (Middle Eastern France). This site has good water quality according to RNB data records (Réseau National de Bassin, French Watershed Biomonitoring Net-

work; http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/index.php) and a high density of gammarids is found. The organisms were kept during an acclimatisation period of at least 10 days in 30-L tanks continuously supplied with drilled groundwater adjusted to the sampling site conductivity (i.e., $550 \,\mu\text{S} \,\text{cm}^{-1}$) and under constant aeration. An 8/16 h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 ± 1 °C. Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*). The leaves were conditioned for at least 6 ± 1 days in water. Freeze-dried Tubifex worms were given as a dietary supplement twice a week.

2.2. Impact of sex, female reproductive stage and individual weight on AChE basal activity

In Amphipoda, for each reproductive-moult cycle in sexually active females, gonad growth (i.e., the secondary vitellogenesis) and embryo development in marsupium take place simultaneously (Charniaux-Cotton, 1985). Freshly hatched juveniles are released from the marsupium a few times before the ecdysis of the mother, shortly after which she lays a new batch of matured oocytes in the marsupium. Then a secondary vitellogenic cycle starts for a new batch of primary oocytes. Therefore, to study the impact of gender and female reproductive stage, AChE activity measurements were taken in males (σ) and four different female groups: (Q1) females at the beginning of the reproductive-moult cycle with a few developed gonads and newly laid eggs in marsupium, (q2) the same females for which the eggs were manually released from marsupium, (93) females at the end of the reproductive-moult cycle with mature oocytes in gonads and freshly hatched juveniles in marsupium, and (94) the same females for which the freshly hatched juveniles were manually released from marsupium. For each group, five replicates of five organisms with similar weight (range, 15-20 mg) were analysed.

The weight impact on AChE activity levels was investigated in six weight classes: class 1, 2, 3, 4, 5 and 6. To this end, sexually undifferentiated juveniles or adult males, with homogenous weight $(1.0 \pm 0.3, 3.9 \pm 0.2, 7.8 \pm 0.3, 14.6 \pm 0.7, 22.9 \pm 0.7$ and 38.6 ± 3.1 , respectively) were selected in different sieving fractions. Enzyme activity was measured for five replicates per weight class. The number of organisms per replicate was different for each weight class (class 1: n = 50, class 2: n = 25, class 3: n = 12, class 4: n = 6, class 5: n = 4 and class 6: n = 2) to keep a comparable homogenisation volume during the enzyme extraction procedure (see Section 2.4).

After treatment, pools of organisms were weighed, sacrificed in liquid nitrogen and stored at -80 °C until enzymatic assays.

2.3. Impact of environmental factors

2.3.1. Temperature under laboratory conditions

In the temperature impact study, glass tanks filled with 500 mL of filtered fresh water (with the same chemical properties as described in Section 2.1) were kept for 24 h at temperatures of 6, 12, 18 and $24 \pm 1 \,^{\circ}$ C (in four different thermo-regulated water baths). These temperatures were relevant to the annual temperature range found in French streams. Five replicates of 20 male gammarids of homogeneous weight (range, 15–20 mg) per temperature were transferred to the previously prepared tanks. Animals were fed *ad libitum* during the entire experiment with partially decomposed alder leaves (*A. glutinosa*). After exposure periods of 2 and 15 days, a pool of five organisms per replicate was sampled, weighed, sacrificed in liquid nitrogen and stored at $-80 \,^{\circ}$ C until enzyme assays.

2.3.2. Spatio-temporal variability of G. fossarum AChE

A monthly follow-up of AChE activity levels was carried out, from January 2007 to January 2008, on gammarid populations from two

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 93 (2009) 225-233

Temperature (°C) pН Conductivity (µS cm⁻¹) Flow rate (m³ s⁻¹)^a A В С D A В С D A В С D A В С D January 2007 6.9 7.1 7.8 7.8 7.5 716 761 205 1.30 0.43 8.8 0.82 0.03 9.0 7.5 99 0.65 February 5.7 6.0 8.9 7.8 7.8 7.5 570 512 143 2.36 1.14 0.08 March 5.8 5.9 5.3 5.5 8.6 8.2 7.0 7.0 576 528 114 151 2.68 0.72 1.18 0.07 April 1.53 0.52 0.420.03 13.3 14.8 12.0 11.1 8.3 506 457 120 115 8.4 8.4 8.1 0.52 0.46 Mav 2 92 0.03 4.30 1.02 0.47 15.8 16.8 8.3 8.3 8.2 8.3 517 466 104 134 0.04 June 17.1 14.8 7.2 1.77 0.54 0.02 Iulv 16.1 17.0 16.2 15.4 8.3 8.1 7.1 493 422 100 111 0.55 0.29 August 15.0 17.0 15.0 15.1 7.8 8.2 8.2 7.7 475 424 106 147 0.99 0.38 0.01 September 8.2 485 425 110 0.92 0.40 0.33 0.02 13.5 14.8 14.2 13.3 8.3 7.3 7.8 141 October 11.4 12.3 10.9 8.2 8.1 7.8 7.5 513 456 103 0.99 0.39 0.34 0.03 11.8 133 November 7.5 7.5 8.4 8.6 8.4 8.3 7.7 7.8 478 457 102 111 1.63 0.50 0.61 0.16 2.2 2.1 3.3 3.8 8.6 8.6 7.0 8.1 565 93 106 3.32 0.72 1.38 0.10 December 524 January 2008 6.4 6.5 7.0 7.3 8.4 8.5 7.4 8.4 515 475 90 111 3.90 0.88 1.19 0.09

Values of different physico-chemical water characteristics (temperature, pH and conductivity) measured at each sampling and the monthly flow rate of the study sites (A: the Bourbre River; B: the Agny River; C: the Ardière River; D: the Morcille River).

a These values were produced by the DIREN (Directions REgionales de l'ENvironement) of the Rhône-Alpes region (http://www.rhone-alpes.ecologie.gouv.fr/).

catchment areas of eastern central France: the Bourbre and Ardière Rivers. These catchment areas have identical temperature profiles with strong variations throughout the year, but differ by their water conductivity (500 and 100 µS cm⁻¹, respectively). Organisms were collected in the upstream part of the Bourbre River, the Agny River (a Bourbre River tributary), the Ardière River and the Morcille River (an Ardière River tributary). The sites studied are located in areas with negligible urban and industrial inputs. However, only the station on the Morcille River could be defined as a pristine site, because it is located in a wooded area with no agricultural activity; conversely, the other stations are adjacent to agricultural areas. As previously described, after sampling, specimens were immediately stored in water from the sample site and transferred to the laboratory. Then, for each station, five pools of five male organisms with homogeneous weight (range, 15-20 mg) were quickly selected, weighed, sacrificed in liquid nitrogen and stored at -80 °C until biochemical analysis. Water temperature, conductivity, and pH were recorded monthly (Table 1).

2.4. AChE activity measurement

Table 1

G. fossarum whole bodies were homogenised in 1:10 (w:v) icecold phosphate buffer (100 mM; pH 7.8) plus 0.1% Triton X-100, with an Ultra-Turrax® T25 basic at 24,000 rpm for 35 s. The homogenate was centrifuged at $9000 \times g$ at 4° C for 15 min. Clear supernatant (S9) was collected and kept at 4 °C to be used as an enzyme source. The enzyme activity was determined in triplicate for each sample according to the colorimetric method initially developed by Ellman et al. (1961) adapted to microplates. Briefly, 330 µL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8), 20 µL of the chromogenic agent DTNB (0.0076 M) and 20 µL of supernatant were added to a 96-well microtiter plate. Measurement of enzyme activity was initiated by adding 10 µL of acetylthiocholine iodide solution (0.076 M). When the variation coefficient was higher than 4%, the sample was analysed again. Spontaneous substrate hydrolysis was assessed using two controls, a blank without acetylthiocholine and a blank without the sample. Absorption of the 2-nitro-5-thiobenzoate anion, formed from the reaction, was recorded at 405 nm every 60 s for 10 min (at 25 °C). Absorption kinetics were calculated in the linear range, then converted in nanomoles per minute according to the molar extinction coefficient of DTNB ($\varepsilon = 1.36 \times 10^{4} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

rate
$$(\text{mol}\,\text{min}^{-1}) = \frac{\Delta \text{absorbance}\ (\text{min}^{-1})}{\varepsilon} \times \text{volume}\ (\text{L})$$

The rate of DTNB hydrolysis recorded in blanks was always less than 0.03 nmol min⁻¹. The quantification limit calculated with the methodology described for AChE activity measurement was 0.1 nmol min⁻¹. Enzyme activity is conventionally normalised by the weight of proteins contained in the volume of the enzyme extract. To this end, for each sample the protein concentration was estimated in triplicate according to Lowry et al. (1951) adapted to the microplate, using bovine serum albumin as standard. A Safire® spectrofluorometer microplate-reader (TECAM) was used for both enzyme activity and protein concentration measurement,

To the end, no normalised AChE activity was expressed as nanomoles of substrate hydrolysed per minute (nmol min⁻¹) and normalised as nanomoles of substrate hydrolysed per minute per milligram of protein (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹).

The chemicals, acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis(2nitrobenzoic acid) (DTNB) and the reagents used for the protein dosages were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.5. Statistical analysis

All results are expressed as the mean ± standard deviation. The normality of variables and the variance homogeneity were tested using the Shapiro-Wilk test and the Hartley-Cochran-Bartlett test, respectively. The differences between groups of gammarids were evaluated by analysis of variance (ANOVA). In case of rejection of Ho, post hoc comparisons were performed using Tukey's test. The significance p-level was set at 0.05. These analyses were carried out with STATISTICA[®] software v7.0 (Statsoft).

For field data analysis, minimum and maximum reference thresholds of AChE activity were constructed on the basis of the variation range of the data collected from the most probable unimpacted station, the Morcille River station, as the 95% confidence interval (95% CI) of monthly means. To apply these reference thresholds to the AChE activities measured in organisms from other stations, we tested that there were no significant differences in the annual mean value with the Morcille River station.

3. Results

3.1. Unit used to express AChE activity

AChE activities are currently normalised against the protein content in the sample and expressed in nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ to correct the potential variations in enzyme concentration possibly resulting from output differences during the extraction procedure. However, normalisation against protein concentrations assumes that changes in the AChE enzyme and total protein contents are proportional and consequently a positive relationship between AChE



Fig. 1. Relationships between protein concentration (g L⁻¹) and non-normalised AChE activity (nmol min⁻¹) or normalised AChE activity (nmol min⁻¹ mg protein⁻¹) measured in whole-body extract of females with different reproductive statuses (A and B) and males analysed during the field survey (C and D). Data are reported as individual values. (\bullet , 91) Females at the beginning of the reproductive-moult cycle with few developed gonads and newly laid eggs in marsupium; (\triangle , 92) females at the beginning of the reproductive-moult cycle with the eggs were manually released from marsupium; (\triangle , 93) females at the end of reproductive-moult cycle with mature oocytes in gonads and freshly hatched juveniles in marsupium; (\triangle , 94) females at the end of the reproductive-moult cycle with mature oocytes in gonads and freshly hatched juveniles were manually released to marsupium; (\triangle , 94) males analysed during the field survey.

activity expressed in nmol min⁻¹ and total protein contents should be found.

Fig. 1 illustrates the relationships between AChE activity and protein contents observed in females in relation to their reproductive status and in males throughout our field study. When AChE activities were expressed in nmol min⁻¹, no significant relationships were observed between the enzymatic activities and the total protein contents of the samples (Fig. 5A and C), with a R^2 of 0.067 in females (Fig. 5A) and 0.034 in males (Fig. 5C). In contrast, a significant negative relationship was observed when AChE activities were expressed in nmol min⁻¹ mg protein⁻¹ (Fig. 1B and D). The highest total protein contents were observed in females with freshly laid eggs in marsupium (q1) and mature oocytes in gonads (q3 and q4), leading to a decrease in the normalised AChE activity level (Fig. 1B).

3.2. Impact of intrinsic biotic factors: sex, female reproductive status, and weight

Fig. 2 illustrates the mean values of AChE activity (expressed in nmol min⁻¹) in males and females for different reproductive statuses. The basal levels of AChE activities showed significant inter-group differences (ANOVA: $p < 10^{-3}$). No significant differences were registered between males and the different female groups (p > 0.05). Among the females, two statistically different groups (p < 0.01) were distinguished: Q1 and Q4 showed a lower AChE activity than Q2 and Q3.

Fig. 3 shows the levels of AChE activity measured in gammarid pools of different size classes according to their mean individual fresh weight. A significant negative relationship was found $(p < 10^{-6})$, with the data fitting a power function well $(R^2 = 0.98)$. AChE activity levels decreased drastically from class 1 to 3 (from 18.8 ± 0.9 to 10.3 ± 0.2 nmol min⁻¹), and then tended to stabilise in

larger size classes (8.5 ± 0.3 , 7.6 ± 0.3 and 6.3 ± 0.9 nmol min⁻¹ for classes 4, 5 and 6, respectively).

3.3. Impact of temperature under controlled conditions

Fig. 4 presents the AChE activity of gammarids kept at water temperatures ranging from 6 to 24° C for 2 and 15 days. No signif-



Fig. 2. Whole-body AChE activity (nmol min⁻¹) measured in pools of *G. fossarum* males and females (four different reproductive statuses). Data are reported as mean \pm standard deviation (*n* = 5). Similar letter: no significant difference (*p*>0.05). (σ ³) Males; (Q1) females at the beginning of the reproductive–moult cycle with few developed gonads and newly laid eggs in marsupium; (Q2) females at the beginning of the reproductive–moult cycle with few developed gonads and for which the eggs were manually released from marsupium; (Q3) females at the end of the reproductive–moult cycle with mature oocytes in gonads and freshly hatched juveniles in marsupium; (Q4) females at the end of the reproductive–moult cycle with mature oocytes in gonads and for which the freshly hatched juveniles were manually released from the reproductive–moult cycle with mature ootytes in gonads and for which the freshly hatched juveniles were manually released from marsupium; (Q4) females at the end of the reproductive–moult cycle with mature ootytes in gonads and for which the freshly hatched juveniles were manually released from the freshly hatched juveniles were manually released from marsupium; (Q4) females at the end of the reproductive–moult cycle with mature ootytes in gonads and for which the freshly hatched juveniles were manually released from marsupium.

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 93 (2009) 225-233



Fig. 3. Relationships between whole-body AChE activity (nmol min⁻¹) and mean individual fresh-weight of organism pools (mg) for six size classes of sexually undifferentiated juvenile or adult male *G. fossarum*. (\blacklozenge) class 1, (\diamondsuit) class 2, (\blacktriangle) class 3, (\bigtriangleup) class 5, (\blacksquare) class 6.

icant differences were detected whatever the tested temperature (ANOVA: p = 0.51). The mean AChE activity values ranged from 8.7 ± 0.4 to 9.5 ± 0.9 nmol min⁻¹.

3.4. Spatio-temporal variability of G. fossarum AChE

Fig. 5 presents the AChE activities measured in the different gammarid populations studied from January 2007 to January 2008. The annual means (average of monthly means) recorded on the Bourbre, Agny, Ardière and Morcille Rivers (8.3 ± 0.6 , 8.0 ± 1.0 , 8.7 ± 1.0 , 8.4 ± 0.5 nmol min⁻¹, respectively) were not significantly different between stations (p = 0.18). As no spatial variations of AChE activity occurred, the data were analysed according to reference thresholds



Fig. 4. Whole-body AChE activity (nmol min⁻¹) of male *G. fossarum* measured after 2 and 15 days of exposure to 6, 12, 18 and 24 °C. Data are reported as mean \pm standard deviation (*n* = 5).

(95% CI) constructed on the basis of the data collected from the Morcille River station, ranging from 7.4 to 9.5 nmol min⁻¹.

The AChE activity measured in gammarids from the Morcille River station did not present temporal variability trends. Indeed, the monthly mean values presented little variability over the year (VC=6.2%) and all of them (from 7.7 ± 0.2 to 9.2 ± 0.6) remained within the reference range (95% CI). Conversely, the largest annual variations were recorded on other stations, especially for Ardière and Agny River stations (VC%=11.2 and 12.4, respectively). According to reference thresholds, low levels of AChE activity were observed in April for the Ardière River station and in May and from October to January for the Agny River station. Surprisingly, high levels were also observed in July and August for the Ardière River station. No significant relationships (p > 0.05) were found between



Fig. 5. Annual variations of whole-body AChE activity (nmol min⁻¹) measured in male *G. fossarum* collected from January 2007 to January 2008 in upstream part of the Morcille River (A), Ardière River (B), Bourbre River (C) and Agny River (D). Data are reported as mean ± standard deviation (*n* = 5). The continuous line represents the annual mean of AChE activity values obtained for the Morcille River (8.4 ± 0.5 nmol min⁻¹), and dotted line, the 95% confidence intervals (7.4–9.5 nmol min⁻¹).

230

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 93 (2009) 225-233

the AChE activities and physico-chemical parameters (temperature, pH, conductivity and flow rates; Table 1).

processes should be applied to allow an accurate comparison and interpretation of data obtained from different studies, sampling dates and sampling sites.

4. Discussion

Applying biomarkers in aquatic invertebrates as indicators of pollution has been extensively developed during recent decades. Since chemical stress can thus be expressed in biological terms, biomarkers provide a valuable tool for environmental assessment. However, the appropriate use of an enzyme activity as a biomarker of any contamination requires good knowledge of its variability, related to intrinsic biotic and environmental factors. From a biomonitoring point of view, the ideal biomarker should be reliable, robust, easily applied and only be modulated by contaminants. In this context, prior to the proper use of biomarkers, one must (i) study the effect of biotic factors (such as sex, size and reproductive status) on biomarker levels in order to choose the model organism for which intrinsic enzymatic variability will be the lowest and (ii) investigate the impact of abiotic factors (such as seasonality and the physico-chemical characteristics of water) on enzyme activity levels, in order to establish reference basal levels.

In some species such as fish and bivalves, AChE activity assays have been performed on specific tissues, particularly brain (Hazel, 1969; Hogan, 1970; Payne et al., 1994), muscle (Payne et al., 1994; Flammarion et al., 2002) and gill (McHenery et al., 1997; Leinio and Lehtonen, 2005; Pfeifer et al., 2005), making it possible to use homogeneous samples to reduce the variability in enzyme activity measurements. In small invertebrate species, such as daphnids (Barata et al., 2007; Jemec et al., 2007; Printes et al., 2008), gammarids (Kuhn and Streit, 1994; Streit and Kuhn, 1994; Crane et al., 1999; McLoughlin et al., 2000) and copepods (Forget et al., 2003; Cailleaud et al., 2007), dissection of specific tissue is impractical and it is not conceivable with a reliable and simple measurement and for large-scale use of this biomarker. Consequently, in our study, we chose to develop AChE measurement on whole body of *G. fossarum*.

4.1. Selection of model organism

4.1.1. Normalisation of AChE activity

In general, AChE activities are currently normalised against the protein content in sample extracts (S9; see Section 2.4) and expressed in nanomoles of substrate hydrolyzed or DOunits min⁻¹ mg protein⁻¹ (McHenery et al., 1997; Forget et al., 2003; Cailleaud et al., 2007; Hoguet and Key, 2007). However, our results show that the natural variation of structural protein contents, related to physiological changes (such as reproductive status) constitutes a source of variability, leading to an under- or over-estimation of the basal level of AChE activity (Fig. 1). Similar results have been observed in whole-body extracts of Mytilus edulis (Radenac et al., 1998) and Perna viridis (Lau et al., 2004). Radenac et al. (1998) showed that oocyte development constitutes an additional protein source in organisms and involves an underestimation of AChE activity. As discussed by Printes and Callaghan (2003), changes in total protein may be related to the use of whole organisms in small invertebrates as compared to vertebrates and larger invertebrates where analyses are performed on specific tissues. However, Owen et al. (2002) and Leinio and Lehtonen (2005) found large protein concentration variations of S9 with values ranging from 0.5 to 2 mg mL⁻¹ for Euvola ziczac hemolymph, from 5 to 10 mg mL⁻¹ for Macoma balthica foot muscle and from 3 to 5 mg mL^{-1} for *M. edulis* gill.

According to Owen et al. (2002), it is advisable to express AChE activity in nmol min⁻¹. However, in these conditions, AChE activity directly depends on sample weight and the technical process used to prepare S9. Consequently, identical sample preparation

According to the results obtained for fish (Galgani et al., 1992; Payne et al., 1994; Flammarion et al., 2002) and crustaceans (Forget et al., 2003), the AChE activity (expressed in nmol min⁻¹) observed for male and female groups are similar (Fig. 2). As stated in the first part of our discussion, AChE activity variations are lower when the results are expressed in nmol min⁻¹; however, significant differences were still observed between female groups (Fig. 2). AChE activities observed for the groups 91 and 94, that is to say females with newly laid eggs in marsupium and with mature oocytes in gonads, respectively, were lower than group 92, corresponding to the sexual resting stage (no developed gonad and without marsupium contents). This difference may be explained by the presence of mature oocytes which can account for up to 15% of the female body weight and that might induce a biological dilution of the enzyme fraction during the homogenisation procedure. In the group Q3 with mature oocytes, this under-estimation is compensated for by the higher AChE activity of the juveniles present in the marsupium (see below). Although there is not a direct gender effect on G. fossarum AChE activity, the male organism was selected for the rest of our study in order to limit the variability of AChE activity measurements.

A significant relationship was observed between AChE activity levels and organism weight (Fig. 3). Similar results were obtained with size (data not shown). Juveniles present the highest specific activity and then the activity level decreases as a function of size. These results agree with those obtained in various fish - Mullus barbatus, Callionymus lyra and Serranus cabrilla (Burgeot et al., 1996) and Leuciscus cephalus (Flammarion et al., 2002) - and in the crustaceans Tigriopus brevicornis (Forget, 1998), Palaemonetes pugio (Hoguet and Key, 2007) and Daphnia magna (Printes and Callaghan, 2003). In our study, the results clearly show that the highest AChE activity observed in G. fossarum juveniles stems from an increase in the rate of substrate hydrolysis, i.e., it results from higher specific AChE activity. On the other hand, Radenac et al. (1998) in M. edulis and Printes and Callaghan (2003) in D. magna, assume that the relationships observed between AChE activity and body length mainly result from protein changes which could be observed during the development and the growth of the organisms.

As for the impact of biotic factors (sex, reproductive status in females and weight), our results show that weight is one of the most influential factors on AChE basal activity in *G. fossarum*. Juvenile organisms presented the highest AChE activities and are likely more sensitive to insecticide contamination (Buchwalter et al., 2004), but a low weight change induces high AChE activity variability, moreover, juveniles are not easily found year around. With the aim of developing *G. fossarum* AChE activity as a robust and reliable tool for bio-monitoring studies, male organisms weighing from 15 to 20 mg were selected as the standard organism for the rest of our study, because they are among the most abundant in wild populations and are easily sampled.

4.2. Abiotic factor impact

4.2.1. Water temperature

Our results show that no water temperature effect was observed on the *G. fossarum* AChE basal activity levels (Fig. 4). After 2- and 15-day exposure to water temperatures ranging from 6 to 24° C, AChE activity levels recorded in male organisms were constant and were similar to those previously observed, with values ranging from 8.7 ± 0.4 to 9.5 ± 0.9 nmol min⁻¹. For fish, Bocquené and Galgani CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

(1998) underline the temperature of the environment from which the organisms were sampled as one of the most important factors affecting AChE activity. However, Baslow and Nigrelli (1964) show that AChE activity varies inversely with the acclimation temperature in *Fundulus heteroclitus*, whereas Hogan (1970) observed a linear increase of bluegill AChE depending on water temperature. In invertebrate species, to our knowledge only three papers have focused on the effect of water temperature on AChE basal activity, concerning estuarine species, *N. diversicolor* (Scaps and Borot, 2000), *E. affinis* (Cailleaud et al., 2007) and *C. crangon* (Menezes et al., 2006). In all cases, no clear relationship has been observed between AChE activity and temperature.

Given that the *G. fossarum* AChE activity level is not regulated by water temperature, these results underline the advantage of this species for bio-monitoring studies.

Storage method of organisms could be another abiotic factor influencing enzyme activity measurement. Freezing $(-80 \,^{\circ}\text{C})$ organisms is the storage method conventionally used for enzyme activity assessment in aquatic vertebrates and invertebrates. For this study, we studied the impact of freezing $(-80 \,^{\circ}\text{C})$ on *G. fossarum* AChE activity in measuring AChE activity on a frozen organism pool after 0, 1, 2 and 4 storage months. No AChE modification was observed in this species (data not shown).

4.2.2. Spatio-temporal variations of AChE activity in field populations

In the literature, few studies have focused on the seasonal variability of AChE activity in crustacean species, other than Forget et al. (2003). in the crustacean *T. brevicornis*, the data reported concern mainly bivalve species (Escartin and Porte, 1996; Dellali et al., 2001; Owen et al., 2002; Robillard et al., 2003; Lau et al., 2004; Leinio and Lehtonen, 2005).

In this study, AChE activity levels in standard-size male G. fossarum were surveyed on a monthly basis over 13 months (January 2007-January 2008) in order to set seasonal baseline levels and the range of natural variability in a population living under environmental constraints typical for French streams. Two catchment areas were investigated, characterised by water with low and high conductivity levels, and high temperature variations throughout the year (Table 1). For each catchment area, two streams were studied. The Morcille River station was the only sampling station which could be characterised as unimpacted because it is located in wooded areas and is not under the influence of anthropogenic stressors (Gouy and Nivon, 2006; Dorigo et al., 2007; Rabiet et al., 2008). For other stations, even though the organisms were collected upstream, they were located in areas with agricultural activities: vineyards for the Ardière River and cereals for the Bourbre and Agny Rivers. However, all the stations studied had good water quality according to RNB (Réseau National de Bassin, French Watershed Bio-monitoring Network; http://sierm.eaurmc.fr/eauxsuperficielles/index.php) data records, which are based on the analysis of the invertebrate community structure index (Indice Biologique Global Normalisé, Standardised Global Biological Index; 94 NF T 90-350).

The AChE activity levels observed in gammarids collected from the Morcille River were particularly stable, with a mean annual value of 8.4 ± 0.5 nmol min⁻¹ (Fig. 5). Similar mean annual values were observed for the Bourbre, Agny and Ardière River stations. However, variation coefficients for these last three stations were higher than the variation coefficient obtained on the Morcille River, resulting from periods of AChE activity decrease observed in April (the Ardière and Bourbre Rivers), May (Bourbre and Agny Rivers) and between October and January for the Agny River. Considering that (i) no seasonal variation of AChE activity levels was observed in the unimpacted Morcille River station, (ii) no temperature impact was observed under laboratory conditions (see Section 4.2.1), (iii) no significant relationships were found between the AChE activities and the physico-chemical parameters (temperature, pH, conductivity and flow rates; Table 1), in relation to the location of sampling stations, we conclude that these periods of AChE activity depreciation reflect environmental exposure to anticholinesterase compounds and not seasonal changes of *G. fossarum* AChE basal levels.

Contrary to our results, Forget et al. (2003) found that T. brevicornis AChE activity levels depend on the season, with the highest values in summer and the lowest in winter. Similarly, Robillard et al. (2003) in A. cygnea, Lau et al. (2004) in Pernas veridis and Leinio and Lehtonen (2005) in M. edulis and M. balthica showed that AChE activity levels of bivalves vary throughout the year. In all these studies, AChE activity levels are expressed using protein normalisation. The authors clearly showed that the seasonal patterns observed in the AChE activity of bivalves appear to follow their reproductive stage and main growth period, carrying out variations of total protein contents and biological dilution of studied tissues. These observations confirm that biotic factors (as discussed above; see Section 4.1.2) are the main regulating factors of basal AChE activity and underline the need to understand their impacts on AChE activity measurement before this activity can be used as a bio-monitoring tool.

4.2.3. Reference value of AChE activity

Assuming that Morcille River station is unimpacted by anthropogenic activities and that there is no seasonal effect on G. fossarum AChE basal activity, the reference and threshold values were defined for our standard organism (male with a weight ranging from 15 to 20 mg). The reference value is 8.4 nmol min⁻¹, corresponding to the AChE annual mean value obtained for the Morcille River station. The maximal and minimal threshold values are 7.4 and 9.5 nmol min⁻¹, corresponding to the 95% confidence intervals. That means that an AChE activity (average level computed from five individual values) lower than 88% (corresponding to the minimal threshold value of 7.4 nmol min⁻¹) at the reference activity level could be interpreted as a modulation resulting from an exposure to contamination. This value (12% inhibition) is lower than the value proposed in the literature for freshwater and marine invertebrates. It is generally admitted that AChE inhibition should be in excess of 20-30% from values observed on reference sites for reflecting an exposure to anticholinesterase compounds (Escartin and Porte, 1996; Owen et al., 2002). This difference could mainly be explained by the higher seasonal variability of AChE activity observed in bivalves as compared to G. fossarum. In fish, for which the impact of biotic and abiotic factors on AChE activity has been extensively studied, the authors observed that given the variability observed in AChE levels in control fish, the activity must be reduced by 13% to indicate exposure to organophosphorus insecticides (review in Fulton and Key, 2001).

Based on the reference AChE value, significant inhibition of roughly 20% from reference activity was observed in April for the Ardière River and in May and from October to January for the Agny River (Fig. 5). As previously discussed, organism weight is the main regulating factor of G. fossarum AChE activity levels. Although this confounding factor is limited by the use of organisms standardised in weight (15-20 mg), we were able to estimate the values of expected AChE activities more accurately by using the actual organism weight and the relationship between AChE activity level and organism weight (Fig. 3). In all cases, estimated AChE values were similar to the reference value (results not shown), showing that weight variations observed during the field survey do not explain this AChE activity decrease. In addition, in another study we showed (Xuereb et al., submitted for publication) that the significant 20% inhibition of AChE activity could be observed after G. fossarum exposure to 0.72 nM of chlorpyrifos (organophosphorus insecticide) and 123.30 nM of methomyl (carbamate insecticide), which are envi-

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 93 (2009) 225-233

ronmentally realistic concentrations (Mazanti et al., 2003; Carbo et al., 2008). Consequently, these AChE modulations may result from a contamination exposure. Moreover, Escartin and Porte (1996), Robillard et al. (2003) and Forget et al. (2003) showed that the highest pesticide concentrations are detected in rivers in spring. This corresponds to periods of agricultural applications. The significant AChE inhibition observed in the Agny River between October and January could be explained by pesticide inputs resulting from ground leaching by autumnal rains. Unfortunately, no information concerning pesticide contamination is available. Hence nothing can be concluded on the exposure to some anti-cholinesterase compounds.

A surprising and significant increase in AChE activity was observed in July and August for the Ardière River. This increase appeared after a period of low AChE activity, and the increased activity was associated with recovery phenomena. Although the biological mechanisms remain unknown, AChE activity inductions have been observed for laboratory and field studies (Flammarion et al., 2002; Romani et al., 2005; Gagnaire et al., 2008) after exposure to sub-lethal concentrations of organophosphorus compounds. Similarly, after recovery experiments, AChE activity of T. brevicornis collected from an impacted site were higher than those of organisms sampled from the reference site (Forget et al., 2003).

5. Conclusion

The aim of this study was to obtain better knowledge of wholebody AChE activity measurement in G. fossarum in order to avoid misinterpretation of this biomarker response. The results showed that the variations of whole-body G. fossarum AChE activity are mainly related to intrinsic biotic factors (such as size or reproductive status), the environmental factors (seasonality and the water's physico-chemical characteristics) having negligible impacts in this species. Consequently, in order to limit the variability close to biotic factors, we defined a standard organism: male organisms with a body weight ranging from 15 to 20 mg. Second, we propose for this standard organism a reference basal activity value and maximum and minimum thresholds beyond which inhibitions or inductions may be attributed to present or past contamination exposure.

Acknowledgments

The authors wish to thank the French National Research Programs ECCO (convention no. 06CV050) and ECOGER (convention no. 20-2006), the Cluster Environnement Région Rhône-Alpes and the GIS Envirhonalp for partial financial support.

References

- Barata, C., Damasio, J., Lopez, M.A., Kuster, M., de Alda, M.L., Barcelo, D., Riva, M.C., Raldua, D., 2007. Combined use of biomarkers and in situ bioassays in Daphnia magna to monitor environmental hazards of pesticides in the field. Environ Toxicol. Chem. 26. 370–379.
- Baslow, M.H., Nigrelli, R.F., 1964. The effect of thermal acclimation on brain cholinesterase activity of the killifish, Fundulus heteroclitus. Zoologica 49, 41-51.
- Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effects of contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. ICES Tech. Mar. Environ. Sci. 22, 1–12.
- Buchwalter, D.B., Sandahl, J.F., Jenkins, J.J., Curtis, L.R., 2004. Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in determining the differential toxicity of chlorpyrifos to second to fourth instar Chironomous riparius (Meigen). Aquat. Toxicol. 66, 149–157.
- Burgeot, T., Bocquene, G., Porte, C., Dimeet, J., Santella, R.M., 1996. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 131, 125–141.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in Eury-temora affinis (Calanoida, Copepoda). Comp. Biochem. Physiol. A 147, 841–849.
- Carbo, L., Souza, V., Dores, E., Ribeiro, M.L., 2008. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. J. Braz. Chem. Soc. 19, 1111-1117.

- Charniaux-Cotton, H., 1985. Vitellogenesis and its control in malacostracan Crus-tacea. Am. Zool. 25, 197–206.
- Correia, A.D., Lima, G., Costa, M.H., Livingstone, D.R., 2002a. Studies on biomarkers of copper exposure and toxicity in the marine amphipod Gammarus locusta (Crustacea). I. Induction of metallothionein and lipid peroxidation. Biomarkers 7.422-437
- Correia, A.D., Livingstone, D.R., Costa, M.H., 2002b. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod Gammarus locusta. Mar. Environ. Res. 54, 357–360. Crane, M., Delaney, P., Watson, S., Parker, P., Walker, C., 1995. The effect of malathion
- 60 on Gammarus pulex (L.) below watercress beds. Environ. Toxicol. Chem. 14, 1181-1188.
- Crane, M., Attwood, C., Sheahan, D., Morris, S., 1999. Toxicity and bioaivalability of the organophosphorus insecticide pirimiphos methyl to the frechwater ampipod Gammarus pulex L. in laboratory and mesocosm systems. Environ. Toxicol. Chem. 18 1456-1461
- Dellali, M., Barelli, M.G., Romeo, M., Aissa, P., 2001, The use of acetylcholinesterase activity in Ruditapes decussatus and Mytilus galloprovincialis in the biomonitoring of Bizerta lagoon. Comp. Biochem. Physiol. C – Toxicol. Pharmacol. 130, 227–235.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assess-ment (2). Invertebrates. Ecotoxicology 3, 161–172.
- Dorigo, U., Leboulanger, C., Berard, A., Bouchez, A., Humbert, J.F., Montuelle, B., 2007. Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. Aquat. Microb. Ecol. 50, 91–102. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new rapid col-
- orimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95
- Escartin, E., Porte, C., 1996, Acetylcholinesterase inhibition in the cravfish Procambarus clarkii exposed to fenitrothion. Ecotoxicol. Environ. Saf. 34, 160–164.
- Flammarion, P., Noury, P., Garric, J., 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. Environ. Pollut. 120, 325–332.
- Forget, J., 1998. Neurotoxic impact of contaminans on the acethylcholinesterase activity of the marine copepod Tigriopus brevicornis (Müller). Ph.D. Thesis, University of Paris, pp. 180.
- Forget, J., Beliaeff, B., Bocquené, G., 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (Tigriopus brevicornis) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. Aquat. Toxicol. 62, 195-204.
- Friberg, N., Andersen, T.H., Hansen, H.O., Iversen, T.M., Jacobsen, D., Krojgaard, L., Larsen, S.E., 1994. The effect brown trout (Salmo trutta L.) on stream invertebrate drift, with specieal reference to Gammarus pulex (L.). Hydrobiologia 294, 105-110.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environ. Toxicol. Chem. 20, 37–45.
- Gagnaire, B., Geffard, O., Xuereb, B., Margoum, C., Garric, J., 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, Potamopyrgus antipodarum (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and Valvata piscinalis (Mollusca, Valvatidae, Muller 1774). Chemosphere 71, 553–560. Galgani, F., Bocquené, G., Cadiou, Y., 1992. Evidence of variation in cholinesterase
- activity in fish along a pollution gradient in the North Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 91, 77-82.
- Geffard, A., Queau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risboug, S., Geffard, O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in Gammarus pulex. Comp. Biochem. Physiol. C – Toxicol. Pharmacol. 145, 632.
- Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C., Stich, K.P., 1998. New online biomonitoring system for Gammarus pulex (L.) (Crustacea): in situ test below a copper effluent in south Sweden, Environ, Sci. Technol, 32, 150-156.
- Gouy, V., Nivon, C., 2006. Protection des Eaux en Beaujolais Viticole: Caractérisation et suivi de la qualité de l'eau sur le bassin versant de la morcille sur la période 2001-mi 2005. Rapport final d'étude. Cemagref - Chambre d'Agriculture du Rhône – Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, p. 59.
- Hazel, J., 1969. The effect of thermal acclimatation upon brain acetylcholinesterase activity of Carassius auratus and Fundulus heteroclitus. Life Sci. 8, 775–784. Hogan, J.W., 1970. Water temperature as a source of variation in specific activ-
- ity of brain acetylcholinesterase of bluegills. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 5, 347-353.
- Hoguet, J., Key, P.B., 2007. Activities of biomarkers in multiple life stages of the model crustacean, Palaemonetes pugio. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 353, 235–244. Jemec, A., Drobne, D., Tisler, T., Trebse, P., Ros, M., Sepcic, K., 2007. The applicability
- of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in Daphnia magna toxicity test. Comp. Biochem. Physiol. C – Toxicol. Pharmacol. 144, 303–309. Kuhn, K., Streit, B., 1994. Detecting sublethal effects of organophosphates by
- meusuring acetylcholinesterase activity in Gammarus. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53, 398-404.
- Lau, P.S., Wong, H.L., Garrigues, P., 2004. Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in Perna viridis in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. Continental Shelf Res. 24, 1969–1987.
- Leinio, S., Lehtonen, K.K., 2005. Seasonal variability in biomarkers in the bivalves Mytilus edulis and Macoma balthica from the northern Baltic Sea. Comp. Biochem. Physiol. C - Toxicol. Pharmacol. 140, 408-421.
- wry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with
- the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275. 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.

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 93 (2009) 225–233

- 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.
- Mazanti, L., Rice, C., Bialek, K., Sparling, D., Stevenson, C., Johnson, W.E., Kangas, P., Rheinstein, J., 2003. Aqueous-phase disappearance of atrazine, metolachlor, and chlorpyrifos in laboratory aquaria and outdoor macrocosms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 44, 67–76.
- McHenery, J.G., LinleyAdams, G.E., Moore, D.C., Rodger, G.K., Davies, I.M., 1997. Experimental and field studies of effects of dichlorvos exposure on acetylcholinesterase activity in the gills of the mussel, *Mytilus edulis* L. Aquat. Toxicol. 38, 125–143.
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2085–2092.
- Menezes, S., Soares, A., Guilhermino, L., Peck, M.R., 2006. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp Crangon crangon L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 335, 114–122.
- Owen, R., Buxton, L., Sarkis, S., Toaspern, M., Knap, A., Depledge, M., 2002. An evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola* (*Pecten*) ziczac, for the rapid assessment of pesticide exposure. Mar. Pollut. Bull. 44, 1010–1017.
- Payne, J.F., Melvin, W., Mathieu, A., Fancey, L.L., 1994. Biomarkers of stress in urban rivers: mixed-function oxygenase and acetylcholinesterase effects in brown trout in rivers in St. John's, Newfoundland. Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci. 1947, 1–23.
- Payne, J.F., Mathieu, A., Melvin, W., Fancey, L.L., 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Mar. Pollut. Bull. 32, 225–231.
- Pfeifer, S., Schiedek, D., Dippner, J.W., 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-westem Baltic Sea. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 320, 93–103.
- Printes, L.B., Callaghan, A., 2003. Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker. Environ. Toxicol. Chem. 22, 2042–2047.
- Printes, L.B., Fellowes, M.D.E., Callaghan, A., 2008. Clonal variation in acetylcholinesterase biomarkers and life history traits following OP exposure in *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 71, 519–526.
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carluer, N., Coquery, M., 2008. Transfert des pesticides et métaux dans un petit bassin versant viticole – Étude préliminaire de

l'influence des conditions hydrologiques sur le transport de ces contaminants Ingénierie EAT Numéro spécial Azote, phosphore et pesticides, pp. 65–75.

- Radenac, G., Bocquene, G., Fichet, D., Miramand, P., 1998. Contamination of a dredged-material disposal site (La Rochelle Bay, France). The use of the acetylcholinesterase activity of *Mytilus edulis* (L.) as a biomarker of pesticides: the need for a critical approach. Biomarkers 3, 305–315.
- Robillard, S., Beauchamp, G., Laulier, M., 2003. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel Anodonta cygnea at three different exposure sites. Comp. Biochem. Physiol. C – Toxicol. Pharmacol. 135, 49–59.
- Romani, R., Isani, G., De Santis, A., Giovannini, E., Rosi, G., 2005. Effects of chlorpyrifos on the catalytic efficiency and expression level of acetylcholinesterases in the bivalve mollusk *Scapharca inaequivalvis*. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2879– 2886.
- Scaps, P., Borot, O., 2000. Acetylcholinesterase activity of the polychaete Nereis diversicolor: effects of temperature and salinity. Comp. Biochem. Physiol. C – Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 125, 377–383.
- Schulz, R., Liess, M., 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. Aquat. Toxicol. 46, 155–176.
- Sheehan, D., Power, A., 1999. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. Comp. Biochem. Physiol. C – Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 123, 193–199.
- Streit, B., Kuhn, K., 1994. Effects of organophosphorous insecticides on autochthonous and introduduced *Gamarus* species. Water Sci. Technol. 29, 233–240.
- Wallace, W.G., Estephan, A., 2004. Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). Aquat. Toxicol. 69, 289–297.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. Freshwater Biol. 9, 263–285.
- 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.
- Xuereb et al., Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard, O., This paper was accpeted with revisions. Corrected paper has been re-submitted at Aquatic Toxicology (May 5th 2009), it is always under review submitted for publication. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquat. Toxicol.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

3. INTERPRETATION DE L'INHIBITION DE L'ACTIVITE ACETYL-CHOLINESTERASE EN TERME D'EFFETS AU NIVEAU INDIVIDUEL

Publication n°4:

Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration.

Benoît Xuereb, Estelle Lefèvre, Jeanne Garric & Olivier Geffard.

Les relations entre l'inhibition de l'activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et les changements du comportement alimentaire et locomoteur ont été étudiées chez des mâles adultes de l'espèce Gammarus fossarum exposés durant une courte période (96 h) au pesticide organophosphoré chlorpyrifos (CPE), ainsi qu'au pesticide carbamate méthomyl (MT). L'activité AChE a été mesurée après 24, 48 et 96 h d'exposition. Le taux d'alimentation a été évalué après 48 et 96 h d'exposition, et l'activité locomotrice a été mesurée à la fin de l'expérimentation. Des diminutions concentration-dépendantes de l'activité AChE et des paramètres comportementaux ont été observées dans les deux cas, avec le CPE et le MT. Cependant, ces deux composés présentent un mode d'action différent. En effet, les effets induits par le MT apparaissent rapidement durant les premières 48 h d'expérimentation et restent constants jusqu'à la fin du test. A l'inverse, les effets induits par le CPE n'apparaissent progressivement qu'après 48 h d'exposition. Dans le cas du CPE, une diminution significative de la survie a été observée pour des niveaux d'inhibitions \geq 50 %, contrairement au MT pour lequel aucune mortalité n'a été observée malgré des inhibitions supérieures à 65 %. Ces résultats suggèrent que, dans le cas du CPE, la mortalité observée n'est pas directement liée à l'inhibition de l'AChE mais résulte d'un autre mode d'action. Les altérations de la prise alimentaire et de la locomotion sont directement corrélées au niveau d'inhibition de l'AChE dans les deux cas. Excepté aux faibles concentrations de MT pour lesquelles nous avons observé une induction des paramètres comportementaux, les relations entre l'activité AChE et les paramètres comportementaux obtenues avec ces deux composés sont relativement proches. Cette étude est une première étape dans l'interpréter l'AChE chez G. fossarum en tant que biomarqueur d'effet sur la prise alimentaire et la locomotion qui sont reconnues pour être des réponses écologiquement pertinentes.

Mots clés : Acétylcholinestérase; Comportement; Chlorpyrifos; *Gammarus fossarum*; Taux d'alimentation; Locomotion; Méthomyl.

Aquatic toxicology (2009) 94: 114-122

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Aquatic Toxicology 94 (2009) 114-122

Contents lists available at ScienceDirect



Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aquatox

Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration

Benoît Xuereb, Estelle Lefèvre, Jeanne Garric, Olivier Geffard*

Laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref, UR BELY, F-69336 Lyon, France

ARTICLE INFO

Article history: Received 5 January 2009 Received in revised form 2 June 2009 Accepted 6 June 2009

Keywords: Acetylcholinesterase Behaviour Chlorpyrifos Gammarus fossarum Feeding rate Locomotion Methomyl

ABSTRACT

Relations between whole-body acetylcholinesterase (AChE) inhibition and changes in feeding and locomotor behaviours were investigated in adult male Gammarus fossarum during short-term exposure (96 h) to the organophosphorous pesticide chlorpyrifos (CPE) and the carbamate pesticide methomyl (MT). AChE activity was measured after 24, 48 and 96 h of exposure. The feeding rate was assessed after 48 and 96 h of exposure and locomotor activity was measured at the end of the experiment. A concentration-dependent decrease of AChE activity and behavioural parameters was observed for both CPE and MT. However, these two compounds presented dissimilar modes of action since MT-induced effects appeared rapidly during the first 48 h of the experiment and remained constant until the end of experiment, contrary to CPEinduced effects, which occurred gradually during the last 48 h. For CPE, significant mortality was observed from 50% AChE inhibition, contrary to MT for which no mortality was observed despite 66% inhibition. These results suggest that, for CPE, the observed mortality was not directly related to AChE inhibition but that an additional toxic mode of action occurred. On the contrary, the feeding rate and locomotion impairment were directly correlated to levels of AChE inhibition for both chemicals, except for the lowest concentrations of MT for which an induction of the behavioural parameters was observed. Although CPE and MT have different modes of action (acting as indirect and direct inhibitors), the relations between AChE activity and inhibition of behavioural parameters were relatively close for these two compounds. This study provides a basis to interpret the biomarker AChE at the upper biological organisation level, on both the feeding rate and locomotor behaviour, which are known to be relevant ecological responses.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

aquatic

1. Introduction

Organophosphorus (OP) and carbamates (Cbs) are among the most commonly used pesticides in agricultural, commercial and urban areas. These compounds have replaced organochlorides because of their rapid degradation and their low persistence in the environment. Unfortunately, their high toxicity and relative lack of target specificity have raised concerns about their potential to cause adverse effects on non-target, aquatic wildlife populations, particularly invertebrates (see Schulz and Liess, 1999). In addition, it is often difficult to assess the environmental risks associated with OPs and Cbs using only chemical analysis owing to their short halflife in water and their high biotransformation rates in organisms (Ashauer et al., 2006). In this context, the use of specific biomarkers is a valuable approach to evaluate exposure to such compounds.

The toxicity of OP and Cb pesticides results mainly from the inhibition of cholinesterase enzymes. Consequently, since the 1970s,

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

inhibition of cholinesterase (ChE) activity has been widely used as a specific biomarker for OP and Cb pesticide exposure in aquatic species (review in Fulton and Key, 2001). More recently, some studies have shown that other classes of compounds such as heavy metals (Diamantino et al., 2003; Frasco et al., 2006; Jebali et al., 2006), surfactants (Guilhermino et al., 2000; Jifa et al., 2005), hydrocarbons (Kang and Fang, 1997; Oropesa et al., 2007) and pharmaceuticals (Nunes et al., 2006) could be sources of disruption of ChE function although only at high contamination levels. Among ChEs, acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) plays a key role in regulation of cholinergic nervous transmission. Indeed, AChE is responsible for the hydrolytic degradation of acetylcholine, which is the primary neurotransmitter in the sensory and neuromuscular systems in most animal species. AChE inhibition leads to overstimulation of the central and peripheral nervous systems, resulting in deleterious neurotoxic effects in organisms, which can lead to death.

Currently, a major issue in ecotoxicology is the relation between suborganism-level measurements and impairment at the population level in order to develop predictive indicators of chemical stressors (Mc Carthy and Shugart, 1990; Jensen et al., 1997; Baird et al., 2007). Although AChE plays an essential function for organ-

^{*} Corresponding author at: Cemagref, UR BELY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France. Tel.: +33 4 72 20 87 85; fax: +33 4 78 47 78 75.

⁰¹⁶⁶⁻⁴⁴⁵X/\$ - see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.aquatox.2009.06.010

ism performance (i.e., neurotransmission), few studies have linked AChE inhibition with behavioural or physiological parameters which could affect the organism's *fitness* and cause impairment at the population level. Some studies using aquatic species have shown that ChE inhibitions were correlated with deleterious effects on behaviour. These relationships have been predominantly studied in fish (Van Dolah et al., 1997; Kumar and Chapman, 1998; Beauvais et al., 2000; Castro et al., 2004; Sismeiro-Vivas et al., 2007) and in a few invertebrates (Comoglio et al., 2005; Cooper and Bidwell, 2006; Garcia-de la Parra et al., 2006; Kristoff et al., 2006).

Amphipods of Gammarus sp. are commonly used in freshwater risk assessment (Rinderhagen et al., 2000). These crustaceans are common and widespread throughout Western Europe. They are often found in high densities in headstreams where they are an important reserve of food for macro-invertebrates, i.e., fish, bird and amphibian species (Welton, 1979; Friberg et al., 1994; MacNeil et al., 2002), and play a major role in the leaf litter breakdown process (Forrow and Maltby, 2000) and consequently in the entire food web. Moreover, the use of these species is logistically interesting because they can be sampled throughout the year and easily identified, manipulated and maintained in the laboratory or used for in situ bioassays. The Gammarus genus has been shown to be among the most sensitive species to anti-cholinesterase compounds (Kuhn and Streit, 1994; Xuereb et al., 2007). Several studies have shown the sensitivity and the relevance of behaviour parameters such as the feeding rate (Forrow and Maltby, 2000; Maltby et al., 2002; Bloor and Banks, 2006), maintenance of precopulary pairing (Borlakoglu and Kickuth, 1990; Pascoe et al., 1994; Malbouisson et al., 1995), locomotion and ventilation (Borlakoglu and Kickuth, 1990; Gerhardt et al., 1998; De Lange et al., 2006; Felten et al., 2008) in organisms exposed to contaminants.

This study aims to develop AChE activity measurement in G. fossarum and propose it as a reliable and robust exposure and effect biomarker in field surveys. Data on methodological development (the impact of biotic and abiotic factors on this activity) and the assessment of a field reference activity level (seasonal variations of this enzymatic activity) were reported previously (Xuereb et al., 2009). The aim of the present paper was to study and establish the relations between AChE inhibitions and ecologically relevant behavioural parameters, such as feeding rate and locomotor activity, in G. fossarum, in order to develop predictive indicators of chemical stressors. We therefore evaluated the effects of two anti-cholinesterase compound families: the OP pesticide chlorpyrifos and the Cb pesticide methomyl. The majority of OP pesticides are slowly toxic in their original form and need to be oxidised by biotransformation enzymes (e.g., monooxygenases of cytochrome P450 group) to become potent AChE inhibitors (see Reddy and Rao, 1987; Jin-Clark et al., 2002). The complex oxidised OP/AChE is in most cases irreversible; therefore re-establishment of enzyme activity is very slow and depends mainly on de novo synthesis (Yuan and Chambers, 1996). In contrast, the carbamate pesticides do not need to be activated to exert their toxicity and recovery of carbamate-inhibited AChE is relatively fast (Zinkl et al., 1991). Accordingly, using OP and Cb pesticides makes it possible to compare enzymatic and toxicity patterns in two different acting chemicals (Barata et al., 2004).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Ellman's reagent), chlorpyrifos ethyl PESTANAL® (Riedel-de Haën) and methomyl PESTANAL® (Riedel-de Haën) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All chemicals used were of the highest purity grade commercially available.

2.2. Experimental animals

G. fossarum were collected in spring 2007 using a net (by kick sampling) from La Tour du Pin, upstream of the Bourbre River (eastern-central France). This site has a good water quality according to RNB data records (Réseau National de Bassin, French Watershed Biomonitoring Network; http://sierm.eaurmc.fr/eauxsuperficielles/index.php), and high densities of gammarids are found. Different size classes were separated by sieving. Immediately after sampling, specimens were stored in plastic bottles containing stream water and quickly transferred to the laboratory. Gammarids were kept during an acclimatisation period of at least 10 days in 30-L tanks continuously supplied with drilled groundwater adjusted to the sampling site conductivity (i.e., $550 \,\mu\text{S}\,\text{cm}^{-1}$). The tanks were under constant aeration. An 8/16-h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 ± 1 °C. The organisms were fed ad libitum with alder leaves (Alnus glutinosa). The leaves were conditioned for at least 6 ± 1 days in water. Freezedried Tubifex worms were issued as a dietary supplement twice a week.

2.3. Toxicity tests

Ninety-six hour semi-static exposure tests were conducted at a temperature of 12±1°C and under a photoperiod of 8/16h light/dark. Four nominal concentrations of chlorpyrifos (CPE: 0.36, 0.72, 1.44 and 2.86 nM, which correspond to 0.125, 0.25, 0.5 and $1\,\mu g\,L^{-1},$ respectively) and five nominal concentrations of methomyl (MT: 61.7, 123.3, 246.6, 493.2 and 986.4 nM, which correspond to 10, 20, 40, 80, 160 µg L⁻¹, respectively) were studied. CPE stock solutions were prepared in acetone for 3.60-28.60-µM concentrations. MT stock solutions were prepared in ultrapure water for 61.7-986.4-µM concentrations. The contaminated media were obtained by adding 200 μL of CPE stock solution or 2000 μL of MT stock solution to 2L of uncontaminated drilled ground water (i.e., 550 μ S cm⁻¹; previously kept to 12 ± 1 °C). Water controls without toxicant were included as well as a solvent control in the CPE experiments (the concentration of acetone was kept at 0.1% in contaminated media). For each condition tested, ten replicates of 20 male gammarids ranging in weight from 15 to 20 mg were exposed in 500-mL glass beakers maintained at 12±1°C in a thermoregulated water bath. A piece of polyamide net (mesh size: $500 \,\mu$ m; length \times width: 6 cm \times 5 cm) was added to the vessel to provide a resting surface, thus minimising cannibalism and the confrontations between organisms. For each concentration, five beakers were used for the non-destructive measurements of behavioural parameters (feeding rate and locomotor activity; see Section 2.5) and five others were used for AChE activity measurement (see Section 2.4). During the tests, the organisms were fed ad libitum with conditioned alder leaves (A. glutinosa). For feeding rate assessment, the methodology is described in Section 2.5. The media were renewed every 24 h, and at the same time the living organisms were counted and the dead ones were removed. Water guality parameters (pH, conductivity, temperature and dissolved oxygen) were recorded before and after the renewal of the test solutions. To check exposure conditions, water samples were collected for chemical analysis (see Section 2.7).

2.4. AChE activity measurements

Pools of five organisms were randomly sampled in each beaker at 24, 48 and 96 h, to measure AChE activity and obtain five replicates (n=5) for each condition. Immediately after sampling, the organ-

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 94 (2009) 114-122

isms were weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until the enzyme activity was measured.

Pools of *G. fossarum* whole bodies were homogenised in 1:10 (W:V) ice-cold phosphate buffer (100 mM; pH 7.8) plus 0.1% Triton X-100, with an Ultra-Turrax[®] T25 basic at 24,000 rpm for 35 s. The homogenate was centrifuged at $9000 \times g$ at $4 \circ C$ for 15 min. Clear supernatant was collected and kept at $4 \circ C$ to be used as an enzyme source.

The enzyme activity was determined in triplicate for each sample according to the colorimetric method initially developed by Ellman et al. (1961) adapted to microplates. Briefly, 330 µL of phosphate buffer (0.1 M, pH 7.8), 20 µL of the chromogenic agent DTNB $(0.0076\,M)$ and $20\,\mu L$ of supernatant were added to a 96-well microtiter plate. Measurement of enzyme activity was initiated by adding 10 µL of acetylthiocholine iodide solution (0.076 M). When the variation coefficient was higher than 4%, the sample was analysed again. Spontaneous substrate hydrolysis was assessed using two controls, a blank without acetylthiocholine and a blank without the sample. Absorption of the 2-nitro-5thiobenzoate anion, formed from the reaction, was recorded at 405 nm every 60 s for 10 min (at 25 °C) using a Safire[®] spectrofluorimeter microplate reader (TECAM; Trappes, France). Absorption kinetics were calculated in a linear range, then converted to nanomoles per minute according to the molar extinction coefficient of DTNB ($\varepsilon = 1.36 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$):

$$rate(mol min^{-1}) = \frac{\Delta absorbance min^{-1}}{\varepsilon} \times volume(L)$$

According to our previous data (Xuereb et al., 2009), AChE activity was expressed as nanomoles of substrate hydrolyzed per minute (nmol min⁻¹). It can be noted that the rate of DTNB extinction recorded in the blanks was always less than 0.03 nmol min⁻¹. The quantification limit calculated with the methodology described for AChE activity measurement was 0.1 nmol min⁻¹.

2.5. Behavioural parameter measurement

To assess the feeding rate (FR), ten alder leaf discs (20 mm in diameter, without major veins) were supplied in each beaker (i.e., 5 per tested concentration). The leaf discs were numerically scanned using an Epson perfection 3490 PHOTO[®] scanner at the beginning of the experiment (t_0) and every 24 h when the media were renewed. The surfaces of the ten discs were then measured daily using SigmaScan[®] Pro v5.0 Imaging Software (Systat Software). The FR expressed as a consumed surface per gammarid per day was (mm²/day/organism or % of control) calculated as follows:

$$FR_t = \frac{\sum_{i=1}^{5} \sum_{t=1}^{D} (Si, t - Si, t - 1) / ((l_{i,t} + l_{i,t-1})/2) / 5}{D}$$

where i (i=1-5) is the *i*th replicate, D (D=1,2 or 4) is the Dth day during the experimental period, S is the total surface of leaf discs present in each beaker and l is the number of living gammarids.

Locomotor activity (LA) was assessed at the end of the experiment. The measurements were taken at fixed measurement times (i.e., between 2 and 4 pm) for both the MT and CP experiment in order to minimise behavioural changes caused by the circadian rhythm. Our experimental design allowed simultaneously recording the movements of nine gammarids. The organisms were randomly sampled from the five replicates devoted to behaviour measurement (see Section 2.3) and individually distributed in Petri dishes (100 mm in diameter) containing 50 mL of test medium. After a 2-min period of acclimatisation to the new environment, the LA of the organisms was recorded using a numerical video camera for 5 min \pm 15 s. Two different groups of nine organisms were filmed for each condition tested. The Petri dish media were

renewed between each film to ensure a constant temperature. After locomotor activity measurement, the organisms were returned to the beakers. The films were then split into frame sets using frame grabber software at the rate of one frame per second. The *x*, *y* position of each gammarid was determined every second using Visiolog v6.4[®] Imaging Software (NOESIS; Les Ulis, France) and transformed into series of connected vectors. The total distances covered by the organisms were normalised by the film duration. Finally, the LA was expressed in distance covered per second (mm s⁻¹).

2.6. Measurement of chlorpyrifos and methomyl concentration in water

To determine contamination lost during exposure and accurate exposure contaminations, water samples (500 mL) were collected just after and before renewing the medium (see Section 2.3) for chemical analysis. The water was sampled once (between 24 and 36 h) and twice (between 24 and 36 h and between 72 and 96 h) for MT and CPE exposure, respectively, during the experiment.

CPE analyses were performed by the Laboratoire des Micropolluants Organiques (Cemagref, Unité Qualité des Eaux et Prevention Pollutions; http://www.lyon.cemagref.fr/qe/index.html) des according to the method described in Gagnaire et al. (2008). CPE was quantified after direct injection in liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). Chlorpyrifos ethyl standards were purchased from Riedel De Haën (Sigma-Aldrich, France). Standard stock solutions were prepared by dissolving 5 mg of accurately weighed reference standard in 50 mL acetone. The stock solutions were diluted with ultrapure water for LC-MS-MS analysis standards. Water samples were filtered on 0.20-µm polyester filters (Chromafil PET 20/15 MS, Macherey-Nagel, Hoerdt, France). We added 990 µL filtered water to 10 µL of deutered diuron (D6) used as the injection standard. Liquid chromatography was performed on an Agilent Series 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Chromatographic separation was achieved using a Synergi Fusion-RP 80A analytical column (4- μ m particle size, 2 mm \times 50 mm) from Phenomenex (Le Pecq, France), at a flow rate of 200 μ Lmin⁻¹ with a mobile phase consisting of acetonitrile and water (80/20, v/v), both with 0.1% v/v formic acid. The injection volume was 100 µL. The HPLC system was interfaced to a triple quadripole mass spectrometer (API 4000, Applied Biosystems, Les Ulis, France). Two transitions $352 \rightarrow 200$ and $350 \rightarrow 198$ m/z – were used for quantification and confirmation of chlorpyrifos ethyl, respectively. They were quantified with internal calibration using diuron D6. The detection limit of this method is 0.09 nM of CPE.

MT was analysed by the Laboratoire Départemental d'Analyses de la Drôme (http://www.lda26.com/) using the LC-MS-MS procedure. Methomyl standards were purchased from Riedel De Haën (Sigma-Aldrich, France). Standard solutions were prepared in ultrapure water for analysis calibration. Water samples were analysed after solid/liquid extraction performed using a symbiosis system from Spark Holland (Emmen, the Netherlands). We used 1 mL of water sample percolated on a 7-µm cartridge C18 High Density (Spark Holland). The cartridges were previously conditioned with 5 mL of acetonitrile and 5 mL of ultrapure water. Liquid chromatography was performed on an Agilent Series 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Chromatographic separation was achieved using a C18 Altima analytical column (5 µm particle size, 2.1 mm × 150 mm) from Alltech (Templemars, France), within a mobile phase consisting of acetonitrile and ultrapure water (80/20, v/v), both with 0.1% v/v formic acid. The HPLC system was interfaced to a triple quadripole mass spectrometer (API 3200, Applied Biosystems, Les Ulis, France). The detection limit of this method is 0.62 nM of MT.

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 94 (2009) 114-122

117

Physico-chemical characteristics of water (i.e., temperature, pH, conductivity and dissolved oxygen) recorded during the two exposure tests (chlorpyrifos and methomyl experiments), 10 min and 24 h following the renewal of test solutions.

Experiment	Temperature (°C)		pH		Conductivity (μ S cm ⁻¹)		Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	
	10 min	24 h	10 min	24 h	10 min	24 h	10 min	24 h
Chlorpyrifos Methomyl	$\begin{array}{c} 12.3 \pm 0.5 \\ 12.6 \pm 0.2 \end{array}$	11.7 ± 0.2 11.9 ± 0.2	7.85 ± 0.26 7.59 ± 0.13	7.79 ± 0.19 7.49 ± 0.14	$630 \pm 20 \\ 620 \pm 23$	631 ± 20 623 ± 25	9.7 ± 0.5 9.9 ± 0.7	6.7 ± 0.4 6.4 ± 0.4

Values are expressed as mean \pm standard deviation (n = 12).

2.7. Statistical analysis

Table 1

All results are expressed as mean \pm standard deviation. The normal distribution of the variables and the variance homogeneity were tested using the Shapiro–Wilk test and Hartley–Cochran–Bartlett tests, respectively. Differences between groups of gammarids were evaluated by analysis of variance (ANOVA). If *Ho* was rejected, *post hoc* comparisons were performed using Turkey's test. Relationships between variables were examined by regression analysis. The significance *p*-level was set at 0.05. These analyses were carried out with Statistica[®] Software v7.0 (StatSoft). When data showed a concentration-dependent relationship, the median effect concentration (EC₅₀) and its 95% confidence intervals were calculated using a logistic curve-fitting procedure according to the method described by Vindimian et al. (1999). These data were obtained using REGTOX, a Microsoft Excel[®] spreadsheet (http://eric.vindimian.9online.fr/).

3. Results

3.1. Water quality and pesticide concentrations

Table 1 displays the pH, conductivity, and temperature values recorded during the two exposure tests.

Measured concentrations of pesticides in water after and just prior to the test solution renewal are presented in Table 2. The mean gaps between concentrations measured after renewal and nominal concentration were within $20.6 \pm 12.6\%$ and $29.7 \pm 8.9\%$, for methomyl (MT) and chlorpyrifos (CPE), respectively. No decrease of ending MT concentrations was really observed after 24 h of exposure. Concentration changes were likely due to the sampling or quantification methods. Conversely, the measured chlorpyrifos (CPE) concentrations decreased notably after 24 h of contamina-

Table 2

Nominal and measured concentrations of chlorpyrifos (mean ± standard deviation of duplicate) and methomyl in water samples taken during the experiments, following the renewal of tested solutions (i.e., initial concentrations) and after 24 h of contamination (i.e., ending concentrations).

Nominal	Measured (nM)				
	Initial concentrations	Ending concentrations			
Chlorpyrifos					
Water control	<q.l.< td=""><td><q.l.< td=""></q.l.<></td></q.l.<>	<q.l.< td=""></q.l.<>			
Solvent control	<q.l.< td=""><td><q.l.< td=""></q.l.<></td></q.l.<>	<q.l.< td=""></q.l.<>			
0.36 nM	0.30 ± 0.05	0.13 ± 0.03			
0.72 nM	0.51 ± 0.10	0.20 ± 0.06			
1.44 nM	0.96 ± 0.27	0.34 ± 0.13			
2.86 nM	1.73 ± 0.60	0.50 ± 0.12			
Methomyl					
Water control	<q.l.< td=""><td><q.l.< td=""></q.l.<></td></q.l.<>	<q.l.< td=""></q.l.<>			
61.7 nM	51.17	67.81			
123.3 nM	162.75	151.66			
246.6 nM	394.55	255.84			
493.2 nM	570.25	607.24			
986.4 nM	N.A.	N.A.			

Quantification limit (Q.L.) = 0.09 and 0.62 nM, for chlorpyrifos and methomyl, respectively. N.A. means "not assessed". tion, ranging from 55.8% to 71.3% of the concentrations measured after the renewal of test solutions.

3.2. Survival

No significant mortality compared to controls was observed among the MT-exposed organisms (p > 0.05), contrary to CPE treatment, which induced significant mortality (p < 0.05) from 72 h at 2.86 nM (Table 3). The 96-h LC₅₀ of CPE was 2.90 (2.70–3.15) nM.

3.3. AChE inhibition

No significant difference (p > 0.05) of AChE activity in control organisms was found in the two different tests, where the effects of the time of exposure or the nature of the controls (solvent free and acetone controls) were studied (Fig. 1). The range of this basal AChE activity was 8.88 ± 0.49 nmol min⁻¹ (mean \pm standard deviation, n = 45).

Both CPE and MT led to an inhibition of AChE activity in wholebody *G. fossarum* concentration dependently (Fig. 1). The decrease in AChE activity caused by CPE was also time-dependent. Indeed, a significant inhibition (p < 0.0005) of $17.8 \pm 3.3\%$ compared to solvent control was observed from 24 h for 2.86 nM. After 96 h, the decrease was significant from 0.72 nM (p < 0.005) with inhibition of $19.9 \pm 10.9\%$, $53.2 \pm 5.9\%$ and $72.5 \pm 5.2\%$ compared to solvent control for 0.72, 1.44 and 2.86 nM, respectively. The IC₅₀ at 96 h was 1.47 (1.32-1.62) nM. In contrast, with MT no time-dependent AChE inhibition was observed. The AChE activity decrease by MT was significant from the lowest tested concentration, with mean inhibitions of $13.4 \pm 5.7\%$, $21.3 \pm 3.6\%$, $38.4 \pm 4.3\%$, $53.9 \pm 4.4\%$ and $66.2 \pm 3.2\%$ compared to the control at concentrations of 61.7, 123.3, 246.6, 493.2 and 986.4 nM, respectively. The mean IC₅₀ was 441.4 (409.3-469.9) nM.

Та	h	le

Mean survival rate (%) of *Gammarus fossarum* after 24, 48, 72 and 96 h of exposure to organophosphorous chlorpyrifos and carbamate methomyl.

Nominal concentrations	Mean survival rate (%)					
	24 h	48 h	72 h	96 h		
Chlorpyrifos						
Water control	99.0 ± 2.2	97.0 ± 2.7	94.0 ± 8.2	92.0 ± 9.1		
Solvent control	100.0 ± 0	97.0 ± 2.7	96.0 ± 4.2	96.0 ± 4.2		
0.36 nM	99.0 ± 2.2	98.0 ± 2.7	98.0 ± 2.7	97.0 ± 2.7		
0.72 nM	99.0 ± 2.2	98.0 ± 2.2	98.0 ± 4.5	97.0 ± 5.5		
1.44 nM	99.0 ± 2.2	98.0 ± 2.7	97.0 ± 2.7	87.0 ± 4.5		
2.86 nM	100.0 ± 0	98.0 ± 4.5	75.0 ± 17.7^{a}	49.0 ± 7.4		
Methomyl						
Water control	99.0 ± 2.2	98.0 ± 2.7	96.0 ± 2.2	95.0 ± 3.5		
61.7 nM	100.0 ± 0	97.0 ± 4.5	94.0 ± 6.5	91.0 ± 8.9		
123.3 nM	99.0 ± 2.2	98.0 ± 2.7	97.0 ± 2.7	91.0 ± 8.9		
246.6 nM	99.0 ± 2.7	98.0 ± 7.6	97.0 ± 9.1	91.0 ± 9.1		
493.2 nM	99.0 ± 2.2	98.0 ± 2.7	95.0 ± 5.0	94.0 ± 4.2		
986.4 nM	97.0 ± 2.7	94.0 ± 4.2	87.0 ± 2.7	86.0 ± 2 2		

Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5).

^a Denotes treatment significantly different from water control.



B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 94 (2009) 114–122

Fig. 1. Whole-body AChE activity (nmol min⁻¹) of *Gammarus fossarum* measured after 24, 48 and 96 h of *in vivo* contamination with organophosphorous chlorpyrifos (A) and carbamate methomyl (B). Data are reported as mean \pm standard deviation (n = 5). *Control* = water control; *Solvent* = solvent control. *Denotes treatment significantly different from solvent control (A) and water control (B).

3.4. Behaviour alterations

Table 4 presents the values of feeding rates (FR) and locomotor activity (LA) from organisms exposed to CPE and MT expressed as a percentage of control. The feeding and locomotor behaviours were clearly affected by both CPE and MT exposure.

Table 4

118

Feeding rate and locomotor activity (% of solvent control) of *Gammarus fossarum* exposed to organophosphorous chlorpyrifos and carbamate methomyl.

Nominal concentrations	Feeding rate	Locomotor activity	
	After 48 h	After 96 h	After 96 h
Chlorpyrifos			
Water control	105.3 ± 27.8	103.2 ± 23.2	109.7 ± 17.7
Solvent control	100.0 ± 23.4	100.0 ± 25.7	100.0 ± 30.1
0.36 nM	88.1 ± 20.8	86.7 ± 4.6	109.8 ± 32.1
0.72 nM	89.1 ± 22.0	79.1 ± 17.4	97.8 ± 26.6
1.44 nM	103.3 ± 22.8	78.5 ± 14.4	77.9 ± 30.2
2.86 nM	97.8 ± 23.4	58.5 ± 9.7^{a}	33.4 ± 22.3^{a}
Methomyl			
Water control	100.0 ± 20.3	100.0 ± 23.0	100.0 ± 30.8
61.7 nM	140.1 ± 11.9	136.8 ± 9.9 ^b	102.8 ± 28.9
123.3 nM	100.5 ± 22.3	91.0 ± 22.0	143.9 ± 32.9 ^b
246.6 nM	100.0 ± 25.8	79.1 ± 11.0	107.7 ± 40.4
493.2 nM	51.4 ± 27.8 ^b	42.7 ± 17.9 ^b	96.8 ± 38.6
986.4 nM	5.0 ± 5.0^{b}	11.4 ± 3.4^{b}	60.7 ± 25.0^{b}

Data are reported as mean \pm standard deviation (n=5 for feeding rate and 18 for locomotor activity).

^a Denotes chlorpyrifos treatment significantly different from solvent control.

^b Denotes methomyl treatment significantly different from water control.

No effect of CPE on FR was recorded at 48 h of exposure. However, CPE induced a concentration-dependent decrease of the two behavioural parameters after 96 h of exposure. Significant inhibition of $41.5 \pm 9.7\%$ of the FR (p < 0.005) and $66.6 \pm 22.3\%$ of LA (p < 0.0005) compared to the solvent control was observed at the highest concentration tested, 2.86 nM.

In organisms exposed to MT, the stimulatory or hormetic effect at low concentrations, followed by a concentration–response relationship, was observed for both FR and LA. After 96 h of exposure, a significant increase of $36.8 \pm 9.9\%$ of FR (p < 0.05) and $43.9 \pm 32.9\%$ of LA (p < 0.01), compared to the control, was observed at 61.7 and 123.3 nM, respectively. Significant inhibition of $39.4 \pm 25.0\%$ of LA (p < 0.01) was observed at the highest concentration tested, 986.4 nM. The FR (p < 0.0001) was significantly inhibited by 57.3 \pm 17.9% and 88.6 \pm 3.4% at the concentrations of 493.2 and 986.4 nM. Contrary to CPE, the MT-induced effects observed after 48 and 96 h of exposure showed a similar pattern.

3.5. Relationship between AChE activity and behaviour

Fig. 2 presents the relationships between AChE activity and the behavioural parameters measured after 96 h of exposure to CPE and MT. Pesticide-induced alterations of behaviour were significantly correlated to AChE inhibitions (p < 0.05). In the case of CPE exposure, the correlation coefficients (R^2) were 0.82 and 0.97 for polynomial AChE-FR and AChE-LA regression, respectively. Given that FR inhibitions are time-dependent and clearly appeared between 48 and 96 h of exposure, the relationship between AChE and behavioural parameters were also considered for an exposure duration lasting

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 94 (2009) 114-122



Fig. 2. Relationships between *Gammarus fossarum* whole-body AChE activity (% of control) and feeding rate (A; % of control) or locomotion (B; % of control) after 96 h of exposure to five chlorpyrifos concentrations including solvent control (Φ) and six methomyl concentrations including water control (Δ). Data are reported as mean ± standard error (*n*=5 for AChE activity and feeding rate, and *n*=18 for locomotion).

The red dots (\blacklozenge ; checked by arrow on graph A) represent relationships obtained between feeding rate and AChE activity measured from exposure period from 48 and 96 h (see Sections 3 and 4). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

48–96 h (red dot in Fig. 2A). In this condition, better AChE-FR regression was observed with a R^2 of 0.99 (p<0.05). For MT exposure, polynomial regression was obtained for all concentrations, except the induction point observed for FR and LA measurement for MT concentrations of 61.7 and 123.3 nM, respectively. Similar to CPE, significant correlations were observed with a 0.97 and 0.94 R^2 for AChE-FR regression and AChE-LA regression, respectively.

4. Discussion

4.1. AChE activity

The range of whole-body AChE activity in nonexposed *G. fos-sarum* was 8.88 ± 0.49 nmol min⁻¹. This is within the range of the reference value proposed for this species (Xuereb et al., 2009). *In vivo* exposures to chlorpyrifos (CPE) and methomyl (MT) led to a concentration-dependent inhibition of this enzymatic activity.

Inhibition of AChE was observed in all MT treatments (concentrations ranged from 61.7 to 986.4 nM). Inhibition rates remained constant from 24 to 96 h of exposure. A strong effect ($66 \pm 3\%$) was observed at the highest concentration tested (986.4 nM), with a mean IC₅₀ of 441.4 (409.3–469.9) nM. In the polychaete *Nereis diversicolor* exposed to 1 μ M of the carbamate insecticide carbaryl, Scaps and Borot, 2000 also observed an AChE inhibition of approximately 35% which remained constant after 2, 4 and 8 days of exposure. Similarly, Barata et al. (2004) showed that AChE was inhibited in *Daphnia magna* almost immediately after exposure to carbofuran, with a IC₅₀-48 h of 896.3 (613.8–1309.3) nM.

In contrast, in organisms treated with CPE, AChE activity was gradually impacted during the 96-h exposure period. For example, at the 2.86-nM concentration inhibition was $19 \pm 5\%$, $33 \pm 6\%$ and $70 \pm 3\%$ of the solvent control after 24, 48 and 96 h of exposure, respectively. Some authors have reported such time-dependent relationships in the freshwater molluscs Potamopyrgus antipodarum (Gagnaire et al., 2008) and Corbicula fluminea (Cooper and Bidwell, 2006) and D. magna crustaceans (Barata et al., 2004) exposed to CPE. Similar results have also been obtained in freshwater Gammarus sp. exposed to other OPs: fenitrothion, paraxon-methyl and pirimiphos-methyl (Kuhn and Streit, 1994; Streit and Kuhn, 1994; McLoughlin et al., 2000). Kuhn and Streit (1994) have hypothesised that this phenomenon may result from a metabolic process of the parent compound in oxidised forms which are more potent AChE inhibitors than the parent molecule (Schoor and Brausch, 1980). Indeed, the thiono-type organophosphates, such as CPE, are not potent inhibitors of ChEs but require metabolic activation by monooxygenase enzymes to form the active oxon analogues (see Reddy and Rao, 1987; Jin-Clark et al., 2002). This activation may require time. This hypothesis is supported by the results of Ashauer et al. (2006), who showed that accumulated chlorpyrifos in G. fossarum is rapidly eliminated, suggesting a biotransformation capacity in this species. In addition, although the biotransformation resulting from mixed-function oxygenase is not fully described in non-target organisms (e.g., aquatic invertebrates), a comparative study has shown that the OP oxidation in oxon form is predominantly found in crustacean species compared to fish and mollusc species (Takimoto et al., 1987).

4.2. Survival

In this work, our results showed that, for CPE exposure, the detrimental effects on the survival of *G. fossarum* appeared for AChE inhibition levels greater than 50%. The 96-h LC_{50} was concomitant with inhibitions around 70%. Conversely, no significant mortality in comparison to the controls was observed in the different MT treatments, despite the 66% AChE inhibition recorded at the highest concentration tested.

Printes and Callaghan (2004) noted that in *D. magna*, using the OPs chlorpyrifos, malathion, parathion and the Cb propoxur, a 50% reduction of AChE activity was associated with detrimental effects on mobility, whereas the OP acephate inhibited AChE up to 70% with no effect on the organisms. Although it has been clearly shown in mammals that AChE inhibition leads to death by asphyxiation due to muscular tetany, the action in aquatic organisms, including fish and invertebrates, is not clearly understood since water crosses respiratory organs (i.e., gills) allowing oxygen transfer (see Barata et al., 2004). Consequently, our results reinforce the hypothesis put forward by other authors that the short-term acute toxicity caused by anti-cholinesterase insecticides might not be based on AChE inhibition but on other toxicity pathways (Schoor and Brausch, 1980; Printes and Callaghan, 2004).

Identical relationships between CPE-induced AChE inhibition and mortality have been observed in other crustacean species such as *Daphnia magna* (Schoor and Brausch, 1980; Printes and Callaghan, 2004) and *Palaemonetes pugio* (Key and Fulton, 2006). In fish species, it has been relatively well established that OP-induced inhibition levels over 70% are correlated with imminent mortality (Fulton and Key, 2001). However, some authors have shown that in aquatic invertebrates high levels of AChE inhibition are not always directly associated with toxic effects. For example, Varo et al. (2002) found 90% AChE inhibition in *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica* exposed to high CPE concentrations for 24 h (5.5 μ M), without mortality. Cooper and Bidwell (2006) and Gagnaire et al. (2008) also observed 80% inhibition without detrimental effects on survival of the freshwater molluscs *C. fluminea* and *P. antipodarum*

120

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 94 (2009) 114-122

after 96 and 168 h of exposure to CPE, respectively. As previously discussed, it would seem that CPE toxicity is mainly caused by its metabolite, CPE-oxon and results from a mode of action other than AChE inhibition. As a result, the differences in sensitivity observed between taxa might depend on metabolic pathways predominantly employed in detoxification (hydrolysis and conjugation, demethylation, or oxidation and reduction) and excretion capabilities, as has been described by Takimoto et al. (1987).

4.3. Relation between AChE inhibition and behaviour alteration

Our results show that the feeding rate and locomotor alterations were directly related to levels of AChE inhibition. Significant behaviour alterations were observed for AChE inhibitions higher than 50% for both insecticides. Our results show that for 74% and 67% of AChE inhibition induced by CPE and MT, respectively, 67% and 40% LA inhibition were observed. Similarly, when AChE activities were lower than 50% of control, deleterious effects were found on FR.

Concurrently, it is interesting to note that, for MT, a significant increase in feeding rates and locomotion was observed at the lowest concentrations tested. Some authors have reported induction of feeding rates (in *Litopenaeus vannamei*: (Comoglio et al., 2005)) or locomotor behaviour (in *Neomysis integer*: (Roast et al., 2000) and *L. vannamei* (Garcia-de la Parra et al., 2006)). Orchard et al. (2002) suggest that the increase in the feeding rate which can be observed in exposed organisms may be not due to a stimulatory effect of the chemical but rather to the need for increased energy for defence metabolism function. Likewise, hyperactivity in swimming may correspond to an avoidance response towards chemical stress (Roast et al., 2000).

Our results showed significant relationships between AChE activity levels and inhibition of behavioural parameters. For locomotor activity, a similar pattern was obtained for the two anti-cholinesterase compound families (OP and the Cb). Indeed, for AChE inhibitions ranging from 50% to 100%, the mean deviation of LA inhibition values predicted with polynomial functions obtained from CPE and MT experiments was $13 \pm 3\%$. This regression allows one to interpret AChE activities measured in this species in terms of locomotor behaviour impairment. For example, our results predict that a 60% AChE inhibition induces a 23-38% LA inhibition. On the other hand, different patterns were observed for FR experiments. This difference could be mainly explained by the specific mode of action of these two compounds. The MT-induced effects on AChE activity appeared rapidly and remained constant until the end of experiment, as compared to the CPE-induced effects which took place gradually during exposure. Consequently, when we compare FR measurement, integrating the total duration of the exposure with AChE activity observed at 96 h, we under-estimated the impact on FR and over-estimated the AChE inhibition. When the relationship was estimated again using mean AChE activity and FR inhibition observed during the last 48 h of exposure, we observed that the relationship profiles obtained with the two compounds were closer (Fig. 2). In this context, for AChE inhibitions ranging from 50% to 100%, the mean deviation of FR inhibition values predicted was $20 \pm 7\%$. Thus, if we project an AChE inhibition of 60%, a FR inhibition can be predicted with values ranging from 72% to 94%. These results clearly show that FR has more sensitive physiological parameters than LA

Relationships between AChE inhibition and impairment of physiological and behavioural processes have been studied especially in vertebrate species. In fish, AChE inhibition has been shown to modify swimming stamina (Van Dolah et al., 1997), swimming performance (Kumar and Chapman, 1998; Beauvais et al., 2000; Sismeiro-Vivas et al., 2007), food consumption (Kumar and

Chapman, 1998; Castro et al., 2004; Sismeiro-Vivas et al., 2007) and growth (Kumar and Chapman, 1998). Few data are available for invertebrates. In terrestrial arthropods, the quantitative relationships between AChE inhibition and alteration in locomotor behaviour were reported in the carabid beetle, Pterostichus cupreus (Jensen et al., 1997) and the isopod Porcellio dilatatus (Engenheiro et al., 2005). In other cases, only qualitative relationships have been proposed in various studies, showing concomitant AChE and behavioural parameter inhibitions. Cooper and Bidwell (2006) observed a reduced capacity to burrow into the substrate parallel to AChE inhibition in C. fulminea freshwater clams exposed to CPE for 96 h. Kristoff et al. (2006) reported different degrees of locomotive disorders related to the level of AChE inhibition in the freshwater oligochaete Lumbriculus variegatus after 48 h of exposure to azinphos-methyl. The links established in our study confirm that an inhibition of AChE activity causes behaviour modifications in G. fossarum. Behaviour indeed conditions the individual's ability to directly cope with its surrounding environment and ultimately to reproduce and survive (Engenheiro et al., 2005). It can be expected that changes in G. fossarum swimming activity lead to increased drift and to disruption in their reaction to escape from predators, their food scavenging and copulation behaviour. Such effects can have direct consequences on the organism and the population in question. It has also been demonstrated that in situ Gammarus feeding bioassays can be used to predict population-level consequences. Recent outcomes from model approaches, which were supported by observations on field populations, have predicted a critical threshold of 50% feeding inhibition for the Gammarus sp. population's viability (see Baird et al., 2007). Moreover, Maltby et al. (2002) showed that feeding inhibition in this species, measured during in situ bioassays, was associated with reductions in benthic macro-invertebrate diversity and detritus processing rates.

5. Conclusion

In a recent study, we have described a reliable methodology designed to control the misinterpretation risks relative to confounding factors and define reference values for basal activity (Xuereb et al., 2009).

The aim of this study was to interpret the response of this biomarker at the organism level in *G. fossarum*, notably on both feeding and locomotor behaviours, using two differently acting chemicals, the organophosphorous chlorpyrifos (CPE) and the carbamate methomyl (MT). The results showed that AChE inhibition levels about 65% do not lead to death in the short term, suggesting that the mortality observed with CPE is caused by this compound's additional modes of toxic action. On the other hand, it is clear that AChE inhibition results in impairment of both feeding and locomotor behaviours. In addition, although CPE and MT presented dissimilar modes of action, we observed that the relationships between AChE activity and behavioural parameter inhibitions were close for the two compounds. This study provides the basis to interpret the AChE inhibition as effects on relevant ecological responses such as the feeding rate and locomotor behaviour.

Acknowledgments

The authors are thankful to the French National Research Programs ECCO (Convention No. 06CV050) and ECOGER (Convention No. 20-2006), the Cluster Environnement Région Rhône-Alpes and the GIS Environalp for partial financial support. The authors also wish to thank the two anonymous reviewers for providing very helpful comments on the manuscript. B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 94 (2009) 114-122

References

- Ashauer, R., Boxall, A., Brown, C., 2006. Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 542–548.
- Baird, D.J., Brown, S.S., Lagadic, L., Liess, M., Maltby, L., Moreira-Santos, M., Schulz, R., Scott, G.I., 2007. In situ-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses. Integr. Environ. Assess. Manage. 3, 259–267.
- Barata, C., Solayan, A., Porte, C., 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to Daphnia magna. Aquat. Toxicol. 66, 125–139.
- Beauvais, S.L., Jones, S.B., Brewer, S.K., Little, E.E., 2000. Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. Environ. Toxicol. Chem. 19, 1875–1880.
- Bloor, M.C., 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*. Environ. Int. 32, 22–27.
- Borlakoglu, J.-T., Kickuth, R., 1990. Behavioral changes in *Gammarus pulex* and its significance in the toxicity assessment of very low levels of environmental pollutants. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45, 258–265.
- Castro, B.B., Sobral, O., Guilhermino, L., Ribeiro, R., 2004. An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. Ecotoxicology 13, 667–681.
- Comoglio, L., Amin, O., Roque, A., Betancourt-Lozano, M., Anguas, D., Haro, B.M., 2005. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. Ecotoxicol. Environ. Safe. 62, 66–74.
- Cooper, N.L., Bidwell, J.R., 2006. Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, Corbicula fluminea, after exposure to an organophosphate insecticide. Aquat. Toxicol. 76, 258–267.
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lurling, M., Peeters, E., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. Aquat. Toxicol. 78, 209–216.
- Diamantino, T.C., Almeida, E., Soares, A.M.V.M., Guilhermino, L., 2003. Characterization of cholinesterases from *Daphnia magna* (Straus) and their inhibition by zinc. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 219–225.Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new rapid col-
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., 1961. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88–95.
- Engenheiro, E.L., Hankard, P.K., Sousa, J.P., Lemos, M.F., Weeks, J.M., Soares, A.M.M., 2005. Influence of dimethoate on acetylcholinesterase activity and locomotor function in terrestrial isopods. Environ. Toxicol. Chem. 24, 603–609.
- function in terrestrial isopods. Environ. Toxicol. Chem. 24, 603–609.
 Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquat. Toxicol. 86, 413–425.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminantinduced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2100–2106.
- Frasco, M.F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2006. Cholinesterase from the common prawn (*Palaemon serratus*) eyes: catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. Aquat. Toxicol. 77, 412–421.
- Friberg, N., Andersen, T.H., Hansen, H.O., Iversen, T.M., Jacobsen, D., Krojgaard, L., 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.
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. Environ. Toxicol. Chem. 20, 37–45.
- Gagnaire, B., Geffard, O., Xuereb, B., Margoum, C., Garric, J., 2008. Cholinesterase activities as potential biomarkers: characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Muller 1774). Chemosphere 71, 553–560.
- Garcia-de la Parra, L.M., Bautista-Covarrubias, J.C., Rivera-de la Rosa, N., Betancourt-Lozano, M., Guilhermino, L., 2006. Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Ecotoxicol. Environ. Safe. 65, 372–380.
- Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C., Stich, K.P., 1998. New online biomonitoring system for *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea): in situ test below a copper effluent in south Sweden. Environ. Sci. Technol. 32, 150–156.
- Guilhermino, L., Lacerda, M.N., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2000. In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. Sci. Total Environ. 247, 137–141.
- Jebali, J., Banni, M., Guerbej, H., Almeida, E., Bannaoui, A., Boussetta, H., 2006. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish Seriola dumerilli. Fish Physiol. Biochem. 32, 93–98.
- Jensen, C.S., Garsdal, L., Baatrup, E., 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. Environ. Toxicol. Chem. 16, 1727–1732.
- Jifa, W., Zhiming, Y., Xiuxian, S., You, W., Xihua, C., 2005. Comparative researches on effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate upon *Lateolabrax japonicus* biomarker system. Environ. Toxicol. Pharmacol. 20, 465–470.
- Jin-Clark, Y., Lydy, M.J., Zhu, K.Y., 2002. Effects of atrazine and cyanazine on chlorpyrifos toxicity in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). Environ. Toxicol. Chem. 21, 598–603.

- Kang, J.-J., Fang, H.-W., 1997. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. Biochem. Biophys. Res. Commun. 238, 367–371.
- Key, P.B., Fulton, M.H., 2006. Correlation between 96-h mortality and 24-h acetylcholinesterase inhibition in three grass shrimp larval life stages. Ecotoxicol. Environ. Safe. 63, 389–392.
- Kristoff, G., Guerrero, N.V., de D'Angelo, A.M.P., Cochon, A.C., 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. Toxicology 222, 185–194.
- Kuhn, K., Streit, B., 1994. Detecting sublethal effects of organophosphates by measuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 53, 398–404.
- Kumar, A., Chapman, J.C., 1998. Profenofos toxicity to the eastern rainbow fish (Melanotaenia duboulayi). Environ. Toxicol. Chem. 17, 1799–1806.
- 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.
- Malbouisson, J.F.C., Young, T.W.K., Bark, A.W., 1995. Use of feeding rate and re-pairing of precopulatory *Gammarus pulex* to assess toxicity of gammahexachlorocyclohexane (Lindane). Chemosphere 30, 1573–1583.
- 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.
 Mc Carthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contam-
- Mc Carthy, J.F., Shugart, L.R., 1990. Biological markers of environmental contamination. In: Mc Carthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.), Biomarkers of Environmental Contamination. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 3–14.McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitiv-
- McLoughlin, N., Yin, D., Maltby, L., Wood, R.M., Yu, H., 2000. Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. Environ. Toxicol. Chem. 19, 2085–2092.Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2006. Effects of widely used pharmaceuti-
- Nunes, B., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2006. Effects of widely used pharmaceuticals and a detergent on oxidative stress biomarkers of the crustacean Artemia parthenogenetica. Chemosphere 62, 581–594.
- Orchard, S.J., Holdway, D.A., Barata, C., Van Dam, R.A., 2002. A rapid response toxicity test based on the feeding rate of the tropical cladoceran *Moinodaphnia macleayi*. Ecotoxicol. Environ. Safe. 53, 12–19.
- Oropesa, A.-L., Perez-Lopez, M., Hernandez, D., Garcia, J.-P., Fidalgo, L.-E., Lopez-Beceiro, A., Soler, F., 2007. Acetylcholinesterase activity in seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician coast (NW Spain). Sci. Total Environ. 372, 532–538.
- Pascoe, D., Kedwards, T.J., Maund, S.J., Muthi, E., Taylor, E.J., 1994. Laboratory and field-evaluation of a behavioral bioassay-the *Gammarus pulex* (L) precopula separation (GaPPs) test. Water Res. 28, 369-372.
- Printes, L.B., Callaghan, A., 2004. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. Environ. Toxicol. Chem. 23, 1241–1247.
- Reddy, M.S., Rao, K.R., 1987. Phosphamidon and lidane induced molt inhibition in the marine praw. *Penaeus monodon* (Fabricius). Nat. Acad. Sci. Lett.—India 10, 255–257.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 2000. Crustaceans as bioindicators. In: Gerhardt, A. (Ed.), Biomonitoring of Polluted Warter—Reviews on Actual Topics, Environmental Research Forum. Trans Tech Publications—Scitech Publications, Zürich, pp. 161–194.
- Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., 2000. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida: Mysidacea) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. Aquat. Toxicol. 47, 227–241.
- Scaps, P., Borot, O., 2000. Acetylcholinesterase activity of the polychaete Nereis diversicolor: effects of temperature and salinity. Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol. 125, 377–383.
- Schoor, P., Brausch, J., 1980. The inhibition of acetylcholinesterase activity in pink shrimp (*Penaeus duorarum*) by methyl parathion and its oxon. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 9, 599–605.
- Schulz, R., Liess, M., 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream macroinvertebrate dynamics. Aquat. Toxicol. 46, 155–176.
- Sismeiro-Vivas, J., Abrantes, N., Pereira, J.L., Castro, B.B., Goncalves, F., 2007. Short-term effects of Quirlan^(R) (chlorfenvinphos) on the behavior and acetylcholinesterase activity of *Gambusia holbrooki*. Environ. Toxicol. 22, 194–202. Streit, B., Kuhn, K., 1994. Effects of organophosphorous insecticides on
- Streit, B., Kuhn, K., 1994. Effects of organophosphorous insecticides on autochthonous and introduduced *Gamarus* species. Water Sci. Technol. 29, 233–240.
- Takimoto, Y., Ohshima, M., Miyamoto, J., 1987. Comparative metabolism of fenitrothion in aquatic organisms, III. Metabolism in the crustaceans, *Daphnia pulex* and *Palaemon paucidens*. Ecotoxicol. Environ. Safe. 13, 126–134.
- Van Dolah, R., Maier, P., Fulton, M., Scott, G., 1997. Comparison of azinphosmethyl toxicity to juvenile red drum (*Scianops ocellatus*) and the mummichog (*Fundulus heteroclitus*). Environ. Toxicol. Chem. 16, 1488–1493.
- Varo, I., Navarro, J.C., Amat, F., Guilhermino, L., 2002. Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to Artemia salina and Artemia parthenogenetica. Chemosphere 48, 563–569.
- Vindimian, E., Garric, J., Flammarion, P., Thybaud, E., Babut, M., 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. Environ. Toxicol. Chem. 18, 2386–2391.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod Gammarus pulex in a Dorset chalk stream. Freshwater Biol. 9, 263–285.

122

B. Xuereb et al. / Aquatic Toxicology 94 (2009) 114-122

- 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 survey. Aquat. Toxicol., doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.006.
- 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.
- Yuan, J., Chambers, H.W., 1996. Toxicology and biochemistry of two aliesterase inhibitors as synergists of four organophosphorus insecticides in Boll Weevils (Coleoptera: Curculionidae). Pest. Biochem. Physiol. 54, 210–219.
- Zinkl, J.G., Lockhart, W.L., Kenny, S.A., Ward, F.J., 1991. The effects of cholinesterase inhibiting insecticides on fish. In: Mineau, P. (Ed.), Cholinesterase-inhibiting Insecticides. Elsevier, New York.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

4. APPLICATION IN SITU

<u>Note n°2</u> :

Mise en évidence de la présence et de l'impact de composés anticholinestérasiques dans les milieux aquatiques : mesure de l'activité acétycholinestérase chez le gammare, *Gammarus fossarum*, exposé *in situ*.

Après avoir défini une méthodologie fiable et robuste pour mesurer et interpréter l'activité AChE chez G. fossarum (Publication n°1, 3 et 4 et Note n° 1), nous avons appliqué ce biomarqueur dans le cadre de différentes campagnes de terrain. Ces études visaient à évaluer la présense et l'impact de molécules anti-ChE dans des effluents de stations d'épurations (Beaujeu sur l'Ardière, Fontaine sur la Saône et Bourgoin sur la Bourbre) ainsi que dans un rejet minier (sur la rivière de l'Amous). Les données accumulées durant ces travaux confirment la pertinence des valeurs de références précédemment définies (Publication n°3), ainsi que la robustesse et la fiabilité de la méthologie mise en place pour mesurer l'AChE chez G. fossarum. Aucun impact délétère sur l'activité AChE n'a été observé pour les différents rejets urbains (station d'épuration) et miniers, confirmant que les composés associés à ces rejets n'ont pas ou peu de potentiel anti-ChE. En revanche, des inhibitions de l'ordre de 20 % ont été observées sur des stations prises comme référence, bien que soumises à des activités agricoles. Nos précédents travaux sur les relations entre la modulation de cette activité et les effets au niveau individuel (Publication n°4), nous permettent de conclure que les niveaux de contamination observés n'ont pas d'impact direct ni sur la locomotion, ni sur l'alimentation de cette espèce. Ces travaux sont une illustration de l'intérêt et du pouvoir de disposer de valeurs seuils définies à partir de l'étude de la variabilité naturelle du biomarqueur choisi et ainsi de pouvoir conclure sur la pertinence des stations choisies comme référence.

Mots clés : Acétylcholinestérase; Application *in situ*; *Gammarus fossarum*; Rejet minier ; Station d'épuration.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref
Mise en évidence de la présence et de l'impact de composés anticholinestérasiques dans les milieux aquatiques : mesure de l'activité acétycholinestérase chez le gammare, *Gammarus fossarum*, exposé *in situ*.

Introduction

Les réglementations nationale et européenne vont conduire dans les années qui viennent à multiplier les évaluations de risques écotoxicologiques et écologiques des milieux aquatiques, nécessitant la validation de démarche se basant sur l'utilisation d'outils pertinents et représentatifs des milieux naturels. Depuis de nombreuses années, l'étude des populations et communautés d'organismes aquatiques est une approche clef dans l'évaluation de la qualité des écosystèmes. Les mesures basées sur les communautés ont prouvé leur utilité pour décrire l'état des écosystèmes et mettre en évidence leur perturbation, mais en revanche se montrent peu pertinentes pour identifier les causes de ce stress : étape indispensable pour la mise en place d'aménagements et de procédures de restauration (Baird *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, dans le cadre de ces réglementations, il est nécessaire 1 - de pourvoir déterminer si les perturbations observées dans le milieu résultent de l'impact de polluants ou bien de stress d'origine physique (habitat) ou biologique (prédation, absence de nourriture), ceci dans un objectif de restauration, 2 – dans le cadre d'un stress toxique, de pouvoir cibler la famille et la source des polluants incriminés. Pour ce faire, il s'est avéré incontournable de réduire la complexité du système biologique observé, en revenant à un « système biologique » de niveau d'organisation moins élevé : l'organisme.

Les mesures biologiques mesurées au niveau sub-individuel (biomarqueurs) constituent les réponses biologiques les plus sensibles et précoces et sont aujourd'hui reconnues comme des outils de « screening » pertinents pour les études d'impacts environnementaux (Depledge et Fossi, 1994; Lagadic *et al.*, 1997). Les mesures de stress général (teneurs en certains métabolites clés, réserves énergétiques, osmorégulation) peuvent être utilisées comme marqueurs de l'état de santé des organismes. A l'inverse, certaines réponses plus spécifiques à un type de contamination (métallothioneine, activité cholinestérasique et cytochrome P450) peuvent renseigner sur le mode d'action des contaminants et/ou être utilisées pour diagnostiquer les causes de stress. De la même façon, la modulation de certains biomarqueurs peut se traduire par une perturbation directe (activité acetylcholinestérase, modulation de la teneur en vitellogénine, génotoxicité) ou indirecte (réallocation des réserves énergétiques) de grandes fonctions physiologiques comme le comportement, la reproduction, la croissance qui jouent un rôle clef dans la dynamique des

populations (Jensen *et al.*, 1997; Castro *et al.*, 2004; Sismeiro-Vivas *et al.*, 2007; Felten *et al.*, 2008). Une meilleure compréhension des liens existants entre ces deux niveaux d'organisation permet de développer des outils sensibles, intégrateurs, et interprétables en termes d'effets toxiques. Cependant, chez les invertébrés d'eau douce, la mise en place et l'interprétation de ces biomarqueurs dans le milieu naturel sont encore rares.

C'est dans ce contexte, qu'au cours de mes travaux de thèse, j'ai caractérisé les cholinestérases présentes chez *G. fossarum* (Publication 1), étudié l'impact de facteurs abiotiques et biotiques sur son niveau d'expression, défini des valeurs seuils et d'activité basale (Publication 3) et établi les liens existant entre la modulation de cette activité enzymatique et le comportement (alimentation et locomotion) des individus (Publication 4). Ces travaux nous ont permis de définir une méthodologie fiable et robuste pour la mesure de l'activité AChE chez cette espèce, mais également de traduire les niveaux d'activité observés chez les organismes en termes d'effets au niveau de l'individu.

But de l'étude :

Le but de cette étude était d'utiliser le biomarqueur AChE, précédemment développé chez *G. fossarum*, pour évaluer la potentielle présence et impact de composés anticholinestérasiques de rejets de stations d'épuration (STEP ; Beaujeu sur l'Ardière, Fontaine sur la Saône et Bourgoin sur la Bourbre) et miniers (Amous), se déversant dans des cours d'eau soumis à des pressions anthropiques très contrastées (Figure 1).

Des gammares (organisme mâle avec un poids compris entre 15 et 20 mg frais) ont été encagés pour une période de 2 à 3 semaines, sur des stations en amont (référence) et en aval des rejets étudiés. Les méthodologies utilisées pour l'encagement et la mesure de l'activité AChE sont détaillées dans les sections II.2.2 et II.3.1.

La rivière Amous se caractérise par une contamination spécifique en métaux (As, cd, Pb et Zn), provenant des déchets de l'ancienne mine de Carnoulès (Casiot *et al.*, 2009). Deux sites de référence (en amont du rejet = Reigous) ont été sélectionnés, l'un sur l'Amous (A1) et un second sur un tributaire (A2). Les sites à l'aval se situent à 1500 (A3) et 3000 (A4) m du rejet (confluence Amous-Reigous). Ce travail a été réalisé en Avril 2008, un suivi sur trois semaines a été réalisé avec des prélèvements toutes les semaines.



Figure 1 : Sites d'études sur lesquels les tests *in situ* ont été mis en place. A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. ● : stations d'étude ; ▲ : Rejet de station d'épuration.

L'Ardière se caractérise par une pression agricole qui résulte en grande partie d'une très forte activité liée à la vigne (Dorigo *et al.*, 2007). Sur cette rivière, c'est la STEP de Beaujeu qui a été étudiée sur une période de 3 semaines en Novembre 2007 et Juin 2008. Deux stations en amont ont été étudiées, Bj1 très en amont dans une zone non soumise à la pression viticole et Bj2 à 50 m à l'amont de la station d'épuration. Deux stations avals ont également été suivies, Bj3 et Bj4 à 20 et 200 m du rejet.

Le bassin versant de la Saône est soumis à une pression de type urbaine et industrielle, celui de la Bourbre se caractérise plus par une pression agricole de type céréalière (Réseau National de Bassin; <u>http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/index.php</u>). Sur la Saône, seule une station de référence a été mise en place, juste à l'amont proche de la STEP de Fontaine (S1). Sur ce grand système hydrique, la mise en place d'une deuxième station de référence exempte de toute contamination mais présentant les mêmes caractéristiques physico-chimiques n'a pas pu être réalisée. Deux stations à l'aval du rejet ont été étudiés (S2 et S3). Ces travaux ont été réalisés à deux périodes, en Novembre 2007 pendant 3 semaines et en Juin 2008 pour 2 semaines. Enfin, pour la STEP de Bourgoin, quatre stations ont été étudiés en Juin 2007 sur une période de trois semaines. Deux stations ont été suivies sur la Bourbre à l'amont de la

STEP, l'une proche (B2) et la seconde en tête de bassin (B1). Une troisième station en amont du rejet a été étudiée (B3), elle se trouve sur le Bion qui est la rivière dans laquelle la STEP se rejette. Enfin, une station en aval de la STEP (B4) a été étudiée, se situant à la confluence du Bion et de la Bourbre.

Pour toutes les expérimentations réalisées sur les STEP, les activités AChE ont été mesurées à la fin de la période d'exposition, aucune cinétique de mesure n'a été réalisée.

Résultats et discussion :

Variabilité des mesures sur les stations prises comme référence

Les valeurs d'activité AChE obtenues chez les organismes exposés sur les stations situées à l'amont des rejets sont présentées dans la figure 2. Toutes les valeurs sont comprises entre 6.8 ± 0.5 et 9.5 ± 0.5 n.mol.min⁻¹. Bien qu'il existe des différences significatives entre les stations, avec les valeurs plus fortes pour Bj1 et Bj2 au mois de Juin 2008 et les plus faibles pour la Bourbre en juin 2007, toutes les activités mesurées (exceptées pour B2 et B3) se trouvent entre les valeurs seuils de référence que nous avons précédemment définies pour cette espèce (Publication 3). Ces résultats montrent que ces stations constituent de bonnes références pour la mesure de cette activité enzymatique. En revanche, B2 et B3 présentent des niveaux d'activité inférieurs à la valeur seuil, mettant en évidence que ces milieux sont soumis à des composés anticholinestérasiques, avec une inhibition de 20 % pour les deux stations. Cette inhibition est confirmée par la différence observée entre les stations B2 et B3 et la station B1.

En accord avec nos précédents travaux (Publication 3), aucun effet saisonnier significatif n'a été observé entre le mois de Novembre et Juin pour les stations S1, Bj1 et Bj2 qui ont été étudiées à ces deux périodes.

Ces données montrent et confirment la pertinence des valeurs seuils de référence (inférieur : 7.4 n.mol.min⁻¹ et supérieur : 9.5 n.mol.min⁻¹) définies, ainsi que la robustesse et la fiabilité de la méthodologie mise en place pour la mesure de l'activité AChE chez cette espèce. Par conséquent, ces résultats montrent l'intérêt de notre approche, test *in situ* couplé à la mesure de l'AChE, pour évaluer la présence et l'impact de composés anti-cholinestérasique dans le milieu.

Application : modulation de l'AChE chez G. fossarum exposé dans le milieu

Présence de composés toxiques

La figure 3 illustre les niveaux d'activité AChE chez les organismes exposés aux différentes stations étudiées et soumises soit à un rejet minier (Amous), soit à des rejets de STEP (Saône, Bourbre et Ardière). Pour la STEP de Fontaine, aucun effet sur l'activité AChE du gammare n'a été observé, avec des valeurs identiques aux activités amont et comprises entre nos valeurs seuils préalablement établies.

Pour les stations de l'Ardière, une inhibition significative de 20 % a été observée sur la station Bj4 au mois de Novembre 2007. Cette inhibition ne peut être associée directement au rejet de STEP, car la station BJ3, juste à son aval, ne présente aucun effet, avec des activités AChE comprises entre nos valeurs seuils.

Les organismes exposés à la station B4 (aval de la STEP de Bourgoin) montrent une inhibition significative de leur activité AChE, avec une valeur au-dessous du seuil, mais en revanche aucune différence avec les stations situées à l'amont. Ces résultats confirment la présence de composés anticholinestérasiques dans les eaux de la Bourbre et du Bion et pas d'impact lié à la STEP vis à vis de cette activité.

Enfin, sur la rivière Amous, aucune valeur d'activité inférieure à notre seuil n'a été observée tout au long de notre expérimentation, montrant ainsi l'absence de composés anticholinestérasiques, du moins à des concentrations susceptibles d'être détectées à l'aide de la méthodologie proposée. Il est intéressant toutefois de montrer que l'on a observé une inhibition significative entre les stations amont et aval après deux et trois semaines d'exposition. Cependant, ces modulations de niveau d'AChE sont de l'ordre de celles observées pour des organismes de référence (comprises entre les valeurs seuils) et semblent liées à une augmentation de l'activité chez les organismes de référence (A1 et A2). En effet, les activités observées pour A3 et A4 après deux et trois semaines d'exposition sont similaires aux activités obtenues sur les stations références (A1 et A2) après la première semaine. Ainsi ces résultats ne permettent pas de mettre en évidence la présence et/ou une contamination de l'Amous par des composés anticholinestérasiques.

Effet sur l'organisme

Ces travaux ont montré, pour toutes les stations étudiées, que les plus fortes inhibitions d'activité AChE étaient de 20 %. Nos précédents travaux sur les relations entre la modulation de cette activité et les effets au niveau individuel (Publication 4), nous permettent de conclure

que les niveaux de contamination observés n'ont pas d'impact direct ni sur la locomotion, ni sur l'alimentation de cette espèce.

Conclusions :

Cette étude a monté que l'utilisation couplée de test *in situ* et la mesure de biomarqueur constitue un outil pertinent pour l'évaluation de la qualité des milieux. De façon générale, aucun impact n'a été observé sur l'activité AChE pour les différents rejets testés, STEP et miniers, confirmant que les composés associés à ces rejets ont pas ou peu d'activité anticholinestérasique. Les inhibitions ont été observées sur les stations soumises à des activités agricoles.

Ces travaux sont une illustration de l'intérêt et du pouvoir de disposer de valeurs seuils définies à partir de l'étude de la variabilité naturelle du biomarqueur choisi, et ainsi de pouvoir conclure sur la pertinence (véracité) des stations choisies comme référence, mais aussi à la question « cette modulation d'activité est-elle liée à la présence de polluant ou bien est-elle de l'ordre de celles observées naturellement ? ». La mise en place de valeurs seuils de référence fiables a pour objectif ultime de se détacher de la nécessité d'avoir une station de référence lorsque l'on veut évaluer la qualité biologique d'un milieu et ou d'un rejet.



Figure 2 : Activité AChE (moy ± E.T., n = 5) mesurée chez *Gammarus fossarum* exposé sur les différentes stations définies a priori comme référence (amont des rejets).

A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. Ligne bleu : valeur de référence et lignes rouges en pointillée: limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité AChE est significativement différente de son niveau de base (Publication 3).





A : Amous ; Bj : Ardière ; S : Saône et B : Bourbre. Ligne bleu : valeur de référence et lignes en pointillée rouge : limite inférieure et supérieure au-delà desquelles l'activité AChE est significativement différente de son niveau de base (Publication 3). Les points rouges représentent les stations définies a priori comme référence (Amont des rejets) et présentées sur la figure 2.

Références :

- BAIRD, D.J., BROWN, S.S., LAGADIC, L., LIESS, M., MALTBY, L., MOREIRA-SANTOS, M., SCHULZ, R. & SCOTT, G.I. (2007). In situ-based effects measures: Determining the ecological relevance of measured responses. *Integrated Environmental Assessment and Management, 3*, 259-267.
- CASTRO, B.B., SOBRAL, O., GUILHERMINO, L. & RIBEIRO, R. (2004). An in situ bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology*, 13, 667-681.
- CASIOT, C., EGAL, M., ELBAZ-POULICHET, F., BRUNEEL, O., BANCON-MONTIGNY, C., CORDIER, M-A., GOMEZ, E., ALIAUME, C. (2009). Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). Applied Geochemistry 24, 787-799.
- **DEPLEDGE, M.H. & FOSSI, M.C. (1994)**. The role of biomarkers in environmental assessment (2), invertebrates. *Ecotoxicology*, *3*, 161-172.
- DORIGO, U., LEBOULANGER, C., BERARD, A., BOUCHEZ, A., HUMBERT, J.F. & MONTUELLE, B. (2007). Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquatic Microbial Ecology*, 50, 91-102.
- LAGADIC, L., CAQUET, T., RAMADE, F. & AMIARD, J.-C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie (Masson ed.). Paris, 419 pp.
- SISMEIRO-VIVAS, J., ABRANTES, N., PEREIRA, J.L., CASTRO, B.B. & GONCALVES, F. (2007). Short-term effects of Quirlan^(R) (chlorfenvinphos) on the behavior and acetylcholinesterase activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology*, 22, 194-202.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

CHAPITRE V : DEVELOPPEMENT DE MARQUEURS DE PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES EN LIEN AVEC LA REPRODUCTION

Ce chapitre qui s'articule en deux parties, regroupe l'ensemble des travaux visant à développer des marqueurs spécifiques d'une perturbation endocrinienne en lien anec la reproduction chez *Gammarus fossarum*. Ceci a fait l'objet de publications :

- Gammarus fossarum as a freshwater organism test for evaluation of reprotoxic chemicals. (Publication n°5)
- 2- Use of vitellogenin-like gene transcript as a biomarker of endocrine disruption in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835). (Publication n°6)

La première partie présente les travaux de caractérisation du cycle de reproduction chez la femelle *G. fossarum* visant à (*i*) définir des paramètres physiologiques permettant de déterminer le statut reproducteur des organismes femelles, ce qui est crucial pour le développement de marqueurs spécifiques de perturbations endocrines de la reproduction, et (*ii*) proposer un test de reprotoxicité qui permette une meilleure compréhension du mode d'action des produits chimiques sur les différents processus physiologiques en lien avec le succès reproducteur. (Publication n°5)

La seconde partie est centrée sur le développement et l'évaluation de l'utilisation de la mesure de l'expression du gène Vtg au moyen de la procédure de RT–PCR en temps réel, chez *Gammarus fossarum* en tant que marqueur d'exposition à des composés dits perturbateurs endocriniens. (Publication n°6)

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

1. CARACTERISATION DU CYCLE DE REPRODUCTION CHEZ LA FEMELLES GAMMARUS FOSSARUM

Publication n°5:

Gammarus fossarum as a freshwater organism test for evaluation of reprotoxic chemicals

Olivier Geffard, Benoit Xuereb, Arnaud Chaumot, Alain Geffard, Sylvie Biagianti, Claire Noël, Khedidja Abbaci, Jeanne Garric, Guy Charmantier, Mireille Charmantier-Daures

Les bioessais de laboratoire, utilisant des mesures de paramètres sub-individuels et individuels, sont une des approches les plus appropriées pour évaluer et caractériser la toxicité potentielle de polluants et/ou d'échantillons environnementaux, car ils permettent de définir l'impact de la fraction bio-disponible pour les organismes. Parmi les invertébrés d'eau douce, les amphipodes sont des organismes écologiquement pertinents, couramment utilisés en écotoxicologie dans le cadre d'essais de toxicité aigue et chronique. Néanmoins, les méthodes permettant d'accomplir des tests de reprotoxicité fiables et robustes ne sont pas encore disponibles chez ces espèces. Dans cette étude, nous avons caractérisé le cycle de reproduction de Gammarus fossarum dans le but de (i) définir des paramètres physiologiques permettant de déterminer le statut reproducteur des organismes femelles, ce qui est crucial pour le développement de marqueurs spécifiques de perturbations endocrines, et (ii) proposer un test de reprotoxicité qui permette une meilleure compréhension du mode d'action des produits chimiques sur les différents processus physiologiques en lien avec le succès reproducteur (i.e. la mue, la fertilité, la fécondité, la croissance de l'ovocyte et le développement embryonnaire). Les résultats nous donnent une description fine du cycle de reproduction chez Gammarus fossarum. Comme rapporté chez d'autres espèces d'amphipodes, le cycle de mue et le cycle de reproduction des femelles G. fossarum se déroulent de manière synchrone et présentent une durée 30 jours à la température de 12 °C. Chaque stade de mue est caractérisé par un stade de développement embryonnaire et de maturation ovocytaire (i.e. structure et surface) spécifique. En se basant sur cette caractérisation du cycle de reproduction, nous avons proposé un test de reprotoxicité de 21 jours. Une très bonne reproductibilité des mesures a été obtenue au cours des différentes

expérimentations réalisées sous conditions contrôlées, pour l'ensemble des paramètres étudiés. De ce fait, une valeur de référence préliminaire a été proposée pour chacun de ces paramètres, renforçant ainsi la véracité et la pertinence de ce bioessai. Ce nouveau bioessai a été appliqué pour identifier les effets spécifiques de différents stress sur le succès reproducteur : Cd, nonylphénol et la privation alimentaire. Les mesures de croissance ovocytaire ont montré que le Cd inhibe spécifiquement la vitellogénèse secondaire. Concernant le nonylphénol, un effet spécifique sur le développement embryonnaire a été observé pour une concentration de $0.05 \ \mu g.l^{-1}$. Enfin, la privation alimentaire a conduit à un retard significatif du cycle de mue induisant ainsi une inhibition de la vitellogénèse secondaire.

Mots clés: Cycle de mue; Cycle de reproduction; *Gammarus fossarum*; Test de reprotoxicité; Perturbations endocriniennes.

Article en préparation pour Environmental Toxicology and Chemistry.

Gammarus fossarum as a freshwater organism test for evaluation of reprotoxic chemicals

Olivier Geffard^{1*}, Benoit Xuereb¹, Arnaud Chaumot¹, Alain Geffard², Sylvie Biagianti², Claire Noël¹, Khedidja Abbaci¹, Jeanne Garric¹, Guy Charmantier³, Mireille Charmantier-Daures³

¹ Cemagref, UR MALY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France.

² EA 2069 URVVC-SE, Laboratoire d'Eco-Toxicologie, UFR Sciences, Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

³ Equipe Adaptation Ecophysiologique et Ontogenèse, UMR 5119 Ecolag, Université Montpellier II, Place E. Bataillon, 34095 Montpellier cedex 05, France

* Corresponding author : Olivier Geffard, Cemagref, UR BELY, 3 bis quai Chauveau - CP 220, F-69336 Lyon, France; Telephone number: 33 4 72208788; Fax number: 33 4 78477875; email: <u>olivier.geffard@cemagref.fr</u>.

Abstract

Laboratory bio-assays, using sub-individual and individual parameter measurements, are one of the most relevant approaches to evaluate and characterize the potential toxicity of polluants and/or environmental samples. These tools allow to define the impact of bioavailable pollutants present in samples.

Among freshwater invertebrates, amphipods are relevant test organisms and are currently used in ecotoxicology for acute and chronic assays, nevertheless, reprotoxicity test methods are not yet available in these species. In this study, we characterized the reproductive cycle in Gammarus fossarum in order to i) define physiological parameters allowing to finely determine the reproductive status of females organism, that is crucial for the development of specific ED; *ii*) propose a reprotoxicity test that allow a better understanding of the mode-ofaction of chemicals on hormone-regulated processes in relation to reproductive success (moulting, fertility, fecundity, oocyte growth and embryonic development). The present results give a fine description of reproductive cycle in Gammarus fossarum. As in some amphipod, moult and reproductive cycles of G. fossarum females occur concurrently and its duration is 30 days at 12°C. Each moult stage is characterized by a specific embryonic development stage and oocyte surface. Based on results obtained from the reproductive cycle characterization, a 21 days reprotoxicity test has been proposed for this species. A very good reproductibility was obtained for all endpoints under control conditions and thorough experiments performed in this studie. Preliminary reference values or benchmark were proposed for each endpoint, leading to an accuracy and power increase of this bioassay. This

new bioassay has been applied to identify the specific impact, in relation to reproductive success, of different stressors, Cd, nonylphenol and starvation diet. Results showed that Cd specifically inhibits the secondary vitellogenesis via an inhibition of the oocyte growth. In the same way, the nonylphenol has a specific effect on embryonic development, with an increase of abnormality % from a NP concentration of 0.05 μ g/L. At last, starvation diet led to a significant delay of moult cycle which in turn induce an inhibition of the secondary vitellogenesis.

Keywords: *Gammarus fossarum*, reproductive cycle, moult cycle, reprotoxicity test, endocrine diruption

1. Introduction

Control of water pollution is mandated by the Commission of the European Communities Directives 2000/60/EC (http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/4447en.pdf). The degree of contamination has traditionally been appraised by chemicals analyses applied in sediment, waters or in biota. Nevertheless, this approach can determine the contamination levels of an area and assist in understanding the biogeochemical cycle of compounds, but it is inadequate to assess the environmental quality of area studied. Laboratory and/or *in situ* bioassays, based on sub-individual and individual responses, are relevant tool to asses the adverse biological effect of contaminant mixture and the presence and effects of compounds that have been overlooked (Narraci *et al.*, 2009).

Aquatic invertebrates such as amphipods are all over the world used as bioindicator species for marine, estuarine and freshwater biomonitoring programs, using field populations and laboratory and *in situ* bioassays, in order to assess contamination levels of aquatic system (Fialkowski *et al.*, 2009) and the impact of natural and spiked sediments (Neuparth *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005; Gale *et al.*, 2006; Roman *et al.*, 2007; Scarlett *et al.*, 2007), waters (Lawrence & Poulter, 2001; Watts *et al.*, 2001; Wilding & Maltby, 2006; Geffad *et al.*, 2007 Beketov & Liess, 2008; Alonso *et al.*, 2009; Xuereb *et al.*, 2007, Xuereb *et al.*, 2009a and 2009b) and effluents (Gross *et al.*, 2001; Schirling *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2008). Amphipods are currently used as test species because they are known be to be vulnerable to several chemicals and toxicants in the environment (Pascoe *et al.*, 1994; Neuparth *et al.*, *a.*, 2005).

2005; Mazurova *et al.*, 2008; Felten *et al.*, 2008); Moreover, they are culturable (Scarlett *et al.*, 2007) and easily usable for laboratory and field studies (Gross *et al.*, 2001; Neuparth *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2005). Finally, standard acute and chronic bioassays are available in these species (USEPA, 2001).

One of the fundamental aims of ecotoxicology is to establish how pollutants affect organism at the population level (Watt *et al.*, 2002); however, this biological level is not easily used under laboratory conditions. In this context, one of the most relevant approaches is the use of population modelling (Forbes *et al.*, 2008). This approach 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 predict population impacts (Raimondo & McKenney 2005; Widarto *et al.*, 2007).

In Europe, two closely related species, *Gammarus fossarum* and *Gammarus pulex*, are recognized as relevant test species and have been intensively used in ecotoxicology. They are widespread and common in West Paleartica, often occurring to high density and are easy to identify to species level. Data are available on the deleterious effect of sediments or pollutants on lethal and sublethal responses such as growth (Blockwell *et al.*, 1996a; Roman *et al.*, 2007) and feeding rate (Alonso *et al.*, 2009), precopulatory behavior (Pascoe *et al.*, 1994; Watts *et al.*, 2001), locomotion (De Lange *et al.*, 2006) and drift behavior (Beketov & Liess, 2008), showing the sensitivity and the ecological relevance of these approaches. On the contrary and by comparison to marine and estuarine species (Lawrence and Poulter, 2001; Scarlett *et al.*, 2007; Ringenary *et al.*, 2007) no reproductive toxicity tests are available in freshwater amphipod species for toxicity assessment of pollutants and/or environmental samples.

In addition, endocrine disrupting chemicals present in aquatic systems are currently a cause of great concern. *In situ*, the occurrence of EDs has been shown related to sewage treatment plant effluent which contain xenoestrogens and synthetic and natural hormones (Desbrow *et al.*, 1998). The mode of action and effects of these compounds related to the disruption of normal endocrine regulation, have been intensively and currently studied in fish, allowing to propose specific, sensitive and reliable biomarkers (Matthiessen, 2003; Langston *et al.*, 2005). On the contrary, despite the obvious importance of invertebrates in the aquatic ecosystems, the effects and/or risk assessment of these compounds, in particular in crustaceans, remains difficult and unclear, leading conflicting observations. As reported by

Lye et al. (2008, literature therein), in one hand some evidence suggest that crustaceans are not or at least are less vulnerable than other invertebrates to endocrine disruptions, and on the other hand, evidence is beginning to emerge of endocrine disruption effects occurring in the field. For example, as observed in several fish species, Ladewig et al. (2002) and Ford et al. (2004) found intersex organisms in freshwater and marine populations of Gammarus fossarum and Echinogammarus marinus, respectively. In the same way, Gross et al. (2001) and Schirling et al. (2005) observed abnormal structures of oocytes in G. pulex and G. fossarum organisms collected from streams known to be impacted by sewage treatment plant effluents. Finally, in the amphipod Melita plumulosa, Chung et al. (2008) recently shown that significant difference of two life-history traits (female length and fecundity) could be observed between organisms form polluted and unpolluted waterways. Up until now, any specific ED bio-molecular markers are available in crustacean currently used in aquatic ecotoxicology (LeBlanc, 2007; Verslycke et al., 2007; Rodriguez et al., 2007; Mazurova et al., 2008). This can be attributed largely to the shortage of fundamental knowledge of their endocrine systems. Basic endocrinological studies, using crustacean, such as copepods, amphipods and mysids, remain extremely limited. Consequently, most studies using these crustacean models interpret and/or propose modes of action of tested compounds on the base of the comparatively large body of information derived from studies with insects and higher crustacean such as decapod (Mazurova et al., 2008). Moreover, given the phylogenetic distance between species and the molecular divergence through animal evolution, ED biomarker available in aquatic vertebrates can not be easily and/or should not directly be applied in majority of invertebrates, because these two groups belong to two distinct ancient lineages of animals (deuterostomes vs protostomes). Consequently and as recommended by Verslycke et al. (2007), effort should be made to the development of bioassays allowing to impact assessment on various physiological process known to be an under endocrinal regulation, such as growth, moulting, embryonic development, vitellogenesis, fecundity, fertility, etc... The key to the interpretation and use of these endpoints as indicators of endocrine disruption will be to first describe what constitutes a "normal" unstressed response. While trivial, a "disruption" can only be diagnosed if the normal state is known. The thorough understanding of hormone-regulated processes in invertebrates constitutes first step to study the endocrine control in species and then develop specific ED biomarkers.

The present work focused on *Gammarus fossarum*, since this is an endemic species in Europe. The aim was to describe and characterize the relationship and chronology of ovarian

and marsupial development to moult cycle, in order to propose an accurate repro-toxicity test for this species. To do this, the objectives were two fold. First purpose was to describe the reproductive cycle of female organisms, using cellular and individual parameters as gonad histological structure, moulting stage, in vivo oocyte surface, oocyte number, embryonic development and embryo number. In G. fossarum, as in all gammarids, reproductive cycle is closely linked to moulting cycle. The process of vitellogenesis and embryonic development should be coordinated to moulting, because females mate and spawn immediately after ecdysis. Consequently, post-, inter- and premoult stages were defined and then used to chronologically describe and characterize reproductive cycle, using previously mentioned sub-individual and individual responses. Second purpose was to propose a chronic sub-lethal toxicity test in G. fossarum in order to asses pollutants impact on reproductive success, using physiological end-points directly related to endocrine regulation and playing a great role on population dynamics in this species. To achieve this, accuracy and power of this new bioassay were defined and characterized by applying it for impact assessment of different stress, chemical compounds of environmental concern and/or suspected to be ED (Cd, nonylphenol, methomyl) and starvation diet, on reproductive features in this species.

2. Material and Methods

2.1 Collection and maintenance of animals

G. fossarum were collected using a net (by kick sampling) from La Tour du Pin, upstream the Bourbre River (Middle Eastern France). This site has a good water quality according to RNB data records ("Réseau National de Bassin" - French Watershed Biomonitoring Network; <u>http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/index.php</u>), and a high density of gammarids is found. Adult organisms recovered through 2 and 2.5-mm sieves are selected for each sampling date, corresponding to female size ranged from 7.5 and 9.8 mm. Immediately after sampling, specimens were stored in plastic bottles containing ambient fresh water, and quickly transferred to the laboratory. Before all experiments, organisms were kept during an acclimatization period of 30 - 35 days, in 30 L-tanks continuously supplied with drilled groundwater (namely FOS) adjusted to the sampling site conductivity (*i.e.* 600 µS.cm⁻¹) and under constant aeration. An 8/16 h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 ± 1 °C. Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus*

glutinosa). The leaves were conditioned for at least 6 ± 1 days in water. Freeze-dried *Tubifex* worms were issued as a dietary supplement twice a week.

2.2 Reproductive cycle characterization in females

2.2.1. Characterization and duration of moult stages

Characterization and duration of moult stages of G fossarum females were determined using criteria developed by Blanchet-Tournier (1980) in the marine amphipod species Orchestia gammarelus. Moult cycle is divided in three main periods, post-, inter- and premoult stages. These phases were respectively characterized by the hardening of the new cuticule, the retraction of the epidermis from the old cuticule and finally by the secretion of the new cuticule.

For this, mating males and females (amplexus), along with females in the last part of their reproductive cycle (hatched juveniles in brood pouch and visible gonads), were individually placed in 500 mL polyethylene beakers under continuous FOS, at 12 ± 0.2 °C and fed with alder leaves weekly supplies of *Tubifex* larvae. All beakers were daily checked to determine the date of ecdysis for each female. In our experiment, we assumed that ecdysis was achieved when juveniles were found in beaker and a new batch of oocytes is observed in marsupium. One, two, four, six, eight days following the ecdysis, first and second periopod pairs (dactylopodite and protopodite) of 4 females are mounted in FOS water on a microscope slide with a coverslip, and the integumental morphogenesis of them was observed (× 200) and compared throughout the experiment.

2.2.2. Description of the reproductive cycle of G. fossarum females

To finely describe the reproductive cycle of *G. fossarum* females, some reproductive features were determined in female organisms in relation to their moult cycle, in order to characterize the change of these biological variables. Females with a 7.5-9.4 mm body size were selected. For each moult stage, 15 females were used to assess the following reproductive parameters. The number of oocytes per female was determined by *in vivo* observation of gonad under binocular microscope. In the same way, oocyte size was assessed by *in toto* microscopic observations (\times 50). Female was placed between two glass blades, and oocytes were photographed in order to measure oocyte surface growth occurring during vitellogenesis. For the number assessment of embryos per female, embryos were manually recovered from the marsupium, placed on slide with FOS water and counted under binocular

microscope. For each moult stage, development stages and the occurrence of embryos were defined using criteria proposed by Sutcliffe (1993). In addition, histological gonadic changes were assessed. For this, 4 organisms of each moult stage were randomly placed in Bouins' fluid for 48h and then rinsed and dehydrated in a graded series of ethanol. They were thereafter included in Paraplast X-tra® (Sigma-Aldrich). Serial cross-sections of 5µm were then made and coloured using Hemalun-Eosin (Martoja and Martoja, 1967). Blades were read with a Leica DM 2500® microscope.

2.3 Impact of Cd, nonylphenol, methomyl and starvation on G. fossarum reproductive cycle.

The characterization of *G. fossarum* reproductive cycle allowed us to propose a sublethal bioassays procedure (Table 1) which has been used to assess the impact of stressors (pollutants and starvation diet) on the reproductive success of this species. Toxicity tests were performed at different dates with organisms collected in March (MT and starvation diet experiments), in April (Cd) and in June 2008 (NP).

2.3.1. Chemicals

Cadmium (Cd; CdCl₂), nonylphenol (NP) and methomyl PESTANAL[®] (Riedel-de Haën) (MT) were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). All chemicals used were of the highest purity grade commercially available.

2.3.2. Exposure experiments

<u>Cadmium</u> : pre-copular pairs (n = 3) were exposed to Cd concentrations of 0 (control), 0.3, 1 and 3 µg/L. Continuous exposure to Cd was performed to avoid chemical variation (500 mL tanks were renewed 4 times a day), using methodology described by Felten *et al.* (2008). Briefly, Cd stock solution of 66 µg/L was daily prepared and used to obtain all tested exposure media. Peristaltic pumps were used to dilute stock solution (1/22) and obtain the highest tested concentration of 3 µg/L, which is used to obtain the solution of 1µg/L which is in turn diluted to obtain a Cd solution of 0.3 µg/L. The dilution factors were established by controlling the flow of FOS water and stock solution or intermediate dilution. In addition, peristaltic pumps were used to dispense each Cd solution in beakers with a constant flow of in 1.34 mL.min⁻¹.

<u>Methomyl and nonylphenol</u> : pre-copular pairs (n = 3) were exposed to concentrations of 0, 5, 20, 40 and 80 μ g/L for MT and of 0, 0.05 and 5 μ g/L for NP, using 500mL glass-beakers. MT

stock solutions were prepared in ultra pure water for concentrations 5 to 80 mg/L. NP stock solutions were prepared in acetone for concentrations of 0.01 and 0.1 g/L. The contaminated media were obtained by adding 2 mL of MT stock solution or 100 μ L of NP stock solution in 2 L of uncontaminated FOS water (previously kept to 12 ± 1 °C). Water controls, without toxicant, were included as well as a solvent control in the case of NP (the concentration of acetone being kept at 0.1 ‰ in contaminated mediums). Semi-static exposure (daily renewal) were performed because in previous studies, we showed that this methodology allows to remain a constant contamination level (Xuereb *et al.*, 2009b; Xuereb *et al.*, submitted).

<u>Starvation diet</u>: Three conditions were tested, 0, 25 and 50%. For this, leave discs were weekly placed in each beaker for 100, 50 and 25 % of time. After 21 days of exposure, 15 females of each condition were randomly selected and used for biological parameters measurements (see section 2.3.3).

2.3.3. Biological and morphological parameter measurements

<u>Reproductive success</u>: methodologies used for moulting, oocyte surface and number, embryonic number and stage development assessment are described in section 2.2.

<u>Feeding rate</u>: 15 alder leaf discs (20 mm in diameter, without major veins) per replicate were supplied (excepted for starvation diet study, see section 2.3.2). Leaf discs was numerically scanned using an Epson perfection 3490 PHOTO[®] scanner at the beginning of the experiment and after 7 days of exposure, when they were renewed. The surfaces of the discs were then measured using SigmaScan[®] Pro v5.0 imaging software (Systat Software). The FR expressed as a consumed surface per gammarid per day was calculated as follows:

$$FR = \frac{\sum_{t=1}^{N} (S_t - S_{t-1}) / (n_t + n_{t-1}/2)}{N}$$

where S is the surface of 10 discs (mm²), n is the number of living gammarids, t is the measure times and N is the total experiment duration (days).

2. 4. Statistical analysis

The normal distribution of the variables and the variance homogeneity were tested using the Shapiro-Wilk test and Hartley-Cochran-Bartlett tests, respectively. Differences between groups of gammarids were evaluated by analysis of variance (ANOVA). If *Ho* was rejected, *post hoc* comparisons were performed using Tukey's test.

3. Results

For this study, homogenous size-females were selected with values ranging between 7.5 and 9.4 mm. However, in some amphipods it was clearly establish that oocyte and embryo number are directly related to the size of female, consequently we choice to present normalised data, that is to say to divide the number of oocytes and embryos by the female size.

3.1 Characterization of G. fossarum reproductive cycle.

3.1.1 Moult cycle

Figure 1 presents integumental changes observed on the dactylopotite and protopodite during the moult cycle. Six moult stages have been defined, A and B for postmoult, C1 and C2 for intermoult and D1 and D2 for premoult. Criteria and duration of each moult stages are the following:

A: was a very rapid stage with a duration of one day. The new cuticule is fine and soft. The tissue is uniformly filled with lacunae and haemocytes.

B: this stage take place during 4 days. This stage was characterized by the hardening of the cuticule, easily observed to dactylopodite setae level.

C: this stage appeared from day 4 and is characterized by epidermal retraction. Striped pattern of tissue was well developed and central lacuna was condensed. C1 stage lasts for 9 days and was characterized by a epidermal retraction at setae level and along the protopodite. Then, at C2 stage, the new dactylopodite was retracted and epidermis is inverted at the base of it. C2 stage lasted for 8 days.

D: premoult stages were characterized by the synthesis of a new cuticule. D stages started from day 19. At D1 stage, since day 24, cuticule was observed on the new dactylopodite. From D2 stage (between day 23 and 30), new cuticule also appeared on new setae of protopodite. Under laboratory conditions (12° C and a conductivity of 600 µs.cm-1), the moult cycle duration in *G. fossarum* was roughly of 30 days.

3.1.2 Reproductive cycle

Reproductive feature changes observed in *G. fossarum* during its moult cycle are presented on the figure 2 and table 2. Due to the very short duration of the A moulting stage, postmoult stages (A and B) were grouped in an AB stage.

Oocyte surface increased significantly (p < 0.005) through the moult cycle with values of 22 000 and 164 000 μ m² for AB and D2 stages, respectively (Table 2). The highest growth of oocytes occurred during the C2 stage, with an increase of 2.7 times, as compared to oocyte surface in C1 females. For oocyte number, two groups were observed. AB and C1 females showed a mean oocyte number significantly higher (p < 0.05) than C2, D1 and D2 females, with mean normalized values of 2.4 and 1.6 respectively.

Histological gonadic changes observed for oocytes were presented in figure 2. In AB females, oocytes appear white under binocular microscope observation. They show nucleoli and a basophilic cytoplasm with very few lipid globules and yolk vesicles. Follicle cells do not evenly envelop oocytes. Oocyte of C1 females are characterized by the presence of peripheral eosin stained yolk vesicles, resulting from the start of secondary vitellogenesis. Main change was observed between C1 and C2 stage, when secondary vitellogenesis take place. Vitellogenesis develops quickly and the yolk vesicles increase in number and in size. At this stage, the oocytes are acidophil, staining red in histological sections because of the presence of eosin. Oocytes from D1 and D2 stage females showed histological organisation similar than the one observed in C1 females.

For embryo number, no significant difference was observed between all female groups (Table 2). However, each moult stage was characterized by an embryonic stage (Figure 2) with a occurrence ranging from 90 to 100% (data not shown). In AB females, stage 1 embryo was observed, corresponding to newly fertilized, oval and undifferentiated eggs. Then embryo is characterized by its comma-like shape (stage 2) which appeared during C1 moulting stage. The stage 3 was characterized by the present of cephalothorax and appendages were segmented. For the next stage (n°4), the compounds eye was full developed and clearly visible and appendages were fully developed. The last stage (n°5) corresponded to newly hatched juvenile.

3.2 Pollutant and starvation impacts on reproductive success of G. fossarum.

3.2.1 Survival

No significant increases of mortality were observed for methomyl, nonylphenol and starvation diet, with survival percentage higher than 90%. In contrast, significant (p < 0.05) mortality was observed at the highest tested Cd concentration ($3\mu g/L$), with a survival percentage of 60% after 21 days exposure.7

3.2.2 Reproductive success

<u>Reproductive cycle</u>: moulting and embryonic stages observed in females exposed to the different tested conditions were presented in table 3. In all cases (excepted for Cd exposure, where data are not available for the control), control females mainly shown a moult stage of C2 with percentages ranging from 80 to 90 %. For MT and NP exposures, no significant moult inhibitions were observed. In contrast, with Cd and starvation diet experiments, the percentages of C2 females decreased in relation to tested stress. 70% of females shown a C1 moult stage at the highest Cd concentration. In the same way, for the organisms only fed during 25% of the time, 50 % of females shown B and C1 moult stages as compared to controls.

Stage 3 embryos were observed for 90 to 100 % of control females. In the same way, for all tested conditions, 80 to 100 % of normal embryos were characterized by the stage 3.

Comparison between moult and embryonic stages observed in females exposed to Cd contamination and starvation diet confirm that under these conditions moult was delayed.

<u>Vitellogenesis</u>: oocyte surfaces observed in C2 females are presented in figure 3. In control females (solvent and solvent-free control), surface of oocytes were ranged from 92 000 and 98 000 μ m². No significant effects were obtained for females exposed to MT and NP, despite the increase of oocyte surface observed in organisms exposed to the highest NP contamination level. On contrary, significant (p <0.05) surface inhibitions were observed for Cd contamination, directly related to the contamination level of medium, with surface values of 98 000 ± 5 400 and 74 000 ± 3 600 µm2 in organisms respectively exposed to the lowest and highest Cd concentration. In the same way, for organisms fed during 25% of time oocyte surface was significantly (p < 0.05) lower than the one from control females.

<u>Gonadic maturation and embryotoxicity</u> : No significant impact was observed on oocyte number for all tested conditions (Figure 4). Normalized oocyte number observed in control females were ranged from 1.9 ± 0.2 to 2.1 ± 0.3 . In the same way, no significant difference were observed for the embryo number per female (data not shown), with values ranged from 1.5 ± 0.2 to 1.9 ± 0.1 in control organisms. On contrary, a significant increase of abnormality percentages was observed in organisms exposed to the highest Cd concentration and to the two NP concentrations tested (Figure 5). In control organisms, the percentages of abnormalities were low with values ranging from 5 ± 3 to $9\pm 2\%$ CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

3.2.3 Feeding rate

As far as pollutant exposures, significant (p < 0.05) feeding rate inhibition was only observed for Cd contamination, at the highest tested concentration (3 µg/L). Feeding rate was inhibited of 30 % as compared to controls (data not shown). For starvation diet experiment, significant inhibition of consumed food amount was only observed in organisms weekly fed during 25% of time, with an inhibition of 40 % as compared to control (data not shown).

4. Discussion

In recent decades, the development and application of bioassays has shifted from short-term assays focusing merely on mortality toward more long-term exposure in which growth and reproduction are the main endpoints; in order to improve the environmental relevance of pollutant risk assessment. Determining population-level effects is critical to assessing the risk of contaminants to long term population viability. Unfortunately, long term population field studies are typically not feasible and it is generally difficult to isolate the effects of a toxicant on a field population that is also exposed to natural environmental variations. Populations models are useful tools for linking organism-level effects with population-level responses and afford the opportunity to integrate probabilistic approaches into ecological risk assessment (Raimondo and McKenney, 2005; Widarto et al., 2007). This requires the availability of methods (bioassays) for assessing the impact of contaminants on biological variables that play a key role in population dynamics, such as survival, growth, reproduction and development. Up to date, sublethal bio-assays are available in European freshwater amphipod for assessing the impact of polluants on feeding rate, growth and locomotor and precopulatory behavior (Watts et al., 2001; Roman et al., 2007; Beketov & Liess, 2008; Alonso *et al.*, 2009), but not on reproductive success.

The occurrence of endocrine disruptors in the environment and their potential effects on aquatic invertebrate species are a cause of great concern, but they equally are the source of conflicting point of views (Lye *et al.*, 2007). As compared to aquatic vertebrates, few robust, relevant and reliable specific ED biomarkers are available in crustacean and particularly in amphipod. This result from a lack of fundamental knowledge of their endocrine systems and also the lack of information on the basic biology of processes related to the reproduction such as moult, oogenesis (vitellogenesis), fecundity and embryonic development. Nowadays, some reprotoxicity assays are mainly based on life- or partial life-cycle test, meaning that, tests are conducted using neonates (or juveniles) and for a period long enough to allow the assessment of the growth rate and then of the reproductive success (number of embryos or neonates per female) with the same individuals. Consequently, under these conditions results do not provide insight into the mechanisms of effect in various contaminants, *i.e.* whether a pollutant is having an effect on the gametogenesis, fecundity, embryonic development or on the moulting.

To our knowledge, this study is the first fine characterization of the reproductive cycle in a European freshwater amphipod and first description of a reprotoxicity test allowing to specifically assess the impact of pollutant on endocrine-regulated processes.

4.1. Reproductive cycle characterisation

According to Subramoniam (2000), the moult and reproductive cycles of G. fossarum sexually active females occur concurrently, that is to say, at the beginning of each cycle, gonadic growth (i.e. the secondary vitellogenesis) and embryonic development take place simultaneous. At last of moult cycle (i.e ecdysis), hatching occurs and neonates are released from brood pouch. Under our laboratory conditions, reproductive cycle duration (moult cycle duration, gonadic maturation and embryonic development) of G. fossarum was roughly of 30 days at 12°C. This observation is in agreement with embryonic development duration observed by Pöckl and Humpesch (1990) and Sutcliffe (1993) in this species. While the biology (population dynamics, productivity and life cycle) (Meijering, 1980, Pöckl, 1995, 2007; Sutcliffe, 1993) of gammarids have been reported and highly investigated in the field, no fine description and characterization of the moult and reproductive cycle are available for these species (i.e. variability of different moult stages, when secondary vitellogenesis or gonadic maturation take place during the intermolt....). To our knowledge, moult cycle characterization has been only performed for one gammarid species, Orchestia gammarellus (Blanchet-Tournier, 1980). In G. fossarum, post-moult stages (A and B), intermoult stages (C1 and C2) and premoult stages (D1 and D2) roughly correspond to 20, 45 and 35 % of the total moult cycle duration, respectively. Our results showed that for each moult stage, a specific embryonic development (Figure 2) and oocyte surface (Table 2) were observed. For example in C2 females, 90 % of embryos were in stage 3 (characterized by the present of cephalothorax) and the mean surface of oocytes were of $106\ 000\pm 6\ 800\ \mu\text{m}^2$. The secondary vitellogenesis mainly takes place to the C2 moult stage with an occyte surface increase of 5

times as compared to oocyte surface observed at the beginning of reproductive cycle (A-B stage). These observations were in accordance to histological gonadic changes (Figure 2), where the increase of yolk vesicle and lipid globule number mainly appeared for C2 stage. These finding are consistent with results previously obtained from our laboratory, where Xuereb et al. (submitted) shown that the highest vitellogenin gene expression is observed in C2 females. The mean number of oocytes normalized for female size (mm) decreased with moulting cycle, with the greatest decrease occurring between C1 and C2 stages, then the number of oocytes/females remained constant. These results shown that secondary vitellogenesis does not take place in all oocytes which were present in the gonads. On the contrary, the mean number of embryos normalized for female size (mm) did not change with increasing developmental stage with values ranged from 1.3 ± 0.2 to 1.6 ± 0.3 , corresponding to 11 ± 1.5 to 13 ± 2 embryos/female through reproductive cycle. It is interesting to note that the number of oocyte observed in C2, D1 and D2 females were similar to the mean number of embryos, showing that the number of oocytes could be used as a reliable indicator of the potential embryo which should be produced and/or observed in marsupium for the next reproductive cycle. In another amphipod species, such as *Echinogammarus marinus*, Ford et al. (2003) found that the embryo number naturally decreased with increasing developmental stages. These results show the need to know biological processes related to the reproduction in an organism test, before to develop and/or propose a reliable and robust repro-toxicity assay.

4.2 Methodology for a reprotoxic test in Gammarus fossarum.

Based on results obtained from the first part of our study, a reprotoxicity test was proposed in *G. fossarum* (Table 1). Test duration and methodology were chosen 1 - to be the shortest possible, in order to use it for screening studies and 2 – to allow a better mode of action assessment of tested compounds by studying *i*) biological parameters which are under the control of specific hormones and neuro-peptides, *ii*) the secondary vitellogenesis (oocyte growth), embryonic development and oocyte and *iii*) embryo number production. The duration of this new reprototoxicity test is of 21 days, corresponding to the test duration used for chronic test procedures in marine and estuarine temperate species (*e.g. Chateogammarus marinus* in Lawrence and Poulter, 2001 ; *Gammarus locusta* in Costa *et al.*, 2005; *Corophium volutator* in Scarlett *et al.*, 2007). Shorter and longer test durations are used for tropical

(*Melita plumulosa* in Mann *et al.*, 2009) and Baltic (*Monoporeia affinis* in Jacobson and Sundelin, 2006) species, respectively.

The G. fossarum reprotoxicity test spans one whole reproductive cycle to examine the effects of toxicants on reproductive success. At the beginning of the test (Day 0) females in last of the reproductive cycle (D2), characterized by hatched juveniles in brood pouch, visible gonads and guarding male, are placed in beakers filled with test solutions. This stage was chosen to be sure that the next moulting cycle, gonadic maturation and embryonic development take place in presence of contaminants. A waiting period of 4 days is necessary for moulting occurs in 100% of females (Chaumot et al., accepted). According to results obtained from the first part of this study, after a 21 day exposure, females should be in C2 stage, with embryos in stage 3 and secondary vitellogenesis should be installed. Under these conditions and by comparison with control conditions, it is possible to assess the impact of pollutant on moult cycle, embryonic development and oocyte growth (secondary vitellogenesis). Moreover, the simultaneous use of these endpoints, which are naturally synchronous, allow to identify and/or a better mode of action assessment of compounds on reproductive cycle of this species. In the same way, the first part of this study showed that the numbers of oocyte and embryo produced in C2 females were similar and could be used as a relvante indicator of fecundity and fertility. Consequently, in addition to comparison with control conditions, the comparison of these two endpoints could be used to discriminate specific impact of a pollutant on one of these two biological processes. In general, available methodologies for amphipod reprotoxicity test do not allow to discriminate or assess whether observed reproductive impairments results from a decrease of oocyte number produced, a impact on the fertility related to embryonic impairments or a delay of organism growth (Costa et al., 2005; Ringenary et al., 2007; Scarlett et al., 2007). In these studies, reproductive success is studied or expressed as the neonate number produced by survival female.

4.3 Application

4.3.1 Accuracy and power of the reprotoxicity bioassay proposed in *G. fossarum*.

The long-term nature of this test provides opportunities for systemic errors to amplify. The accuracy and relevance of a bioassay is related to the variability of endpoints values obtained for controls. Many of the commonly used amphipod species for toxicity test must be collected from field populations, because culturing protocols have not been developed. Consequently, in order to assess the accuracy and power of this new reprotoxicity test in *G. fossarum*, it is

essential to know whether tests conducted at different times of year are directly comparable or not; this may have particular relevance to the testing of field-contaminated samples.

The adult survival in control was above the US EPA's recommended protocol level of an 80% survival rate for routine amphipod bioassays. The values for the endpoints measured were similar for the three controls performed in this study (no control is available for Cd experiment) and no significant differences were observed. Concerning the moult cycle and embryonic development, results obtained from controls shown that under our laboratory conditions and after a 21 days exposure, moult stage C2 and stage 3 embryos should be observed in more than 80 % of females. In the same way, between 6 and 10 % of malformed embryos were found in controls and could be proposed as reference values. Information in reported papers about an aberrant embryonic development of amphipod is very limited (Sundelin and Erikson, 1998), but our results are in agreement with those observed by Sundelin and Erikson (1998) in the marine amphipod Monoporeia affinis. Oocyte and embryo numbers normalized for female size remain constant through experiments, with values ranged from 1.5 to 2. In the same way and in accordance to the first part of this study, mean oocyte surfaces obtained from C2 control females were ranged from 92 000 to 100 000 μ m². This study shown that for each selected endpoint, values observed with controls constitute preliminary step for the establishment of reference values in order to increase the accuracy and the power of proposed G. fossarum reprotoxicity test. In contrast, based on studies about amphipod life-cycle in field populations, some authors clearly show that reproductive features change during the year. For exemple, Gale et al. (2006) found a large variation in the fertility (eggs number/gravid female) of the amphipod Melita plumulosa for control treatments performed at different periods of the year. In the same way, Pöckl (1993) in G. fossarum and Sutcliffe (1993) in some amphipod species found that egg volume and fecundity (egg number/female) clearly vary during the year, mainly in relation to the temperature of water. The current study shows that an acclimatization period of 30 - 35 days is sufficient to limit and reduce the variation of reproductive success or feature observed in natural populations and allow to propose a robust methodology with a good reproductibility. Moreover, 12°C is the optimal temperature for G. fossarum, for which the maximal fecundity (egg number/female) is obtained (Pöckl, 1993).

4.3.2 Impact and mode of action of tested stressors on reproduction of G. fossarum

Different toxic pattern were observed for the conditions and stressors tested during this study. Biological effects observed at individual level may result *i*) from a direct impact of pollutant, i.e neurotoxicity of anti-cholinesterasic insecticides (Xuereb *et al.*, 2009b) *ii*)from an indirect effect related to energetic metabolism impairment or *iii*) to devote energy to reduce the toxic stress in the detriment of physiological functions such as the growth and the reproduction (De Coen and Janssen, 1998). Feeding is the first step to obtain energy for global metabolism of organisms. The effects of contaminants on feeding rate are already well documented and this behavioral parameter is proposed as a relevance biomarker for laboratory and *in situ* toxicity assessment of pollutants (Maltby *et al.*, 2002; Wilding and Maltby, 2006; Alonso *et al.*, 2009).

In freshwater G. fossarum, a robust, easy and reliable method is available to feeding rate assessment (Xuereb et al., 2009b), constituting a great advantage for this species and allowing to discriminate effect resulting from a direct mode of action or from a energy availability impairments via a feeding rate inhibition. In our study, a 40 % reduction of diet did not induce inhibition of oocyte number produced, but led to a significant delay of moult cycle and a secondary vitellogenesis inhibition in C2 females. Feeding rate inhibition observed for the highest Cd concentration (3µg/L) may explain reproductive impairment obtained for this concentration. These results displayed that G. fossarum is a very sensitive species toward Cd contamination, with deleterious impact on survival rate, embryonic development and feeding-rate after an exposure to environmental relevant concentrations. However, our results showed that Cd has a specific impact on the secondary vitellogenesis, leading a oocyte growth inhibition of 15 % from the Cd concentration of 1µg/L. In blue crabs Callinectes sapidus, Lee and Noone (1995) showed that Cd induces a decrease of yolk protein (lipovitellin) levels in females organisms. In the same way, Bodar et al. (1990) observed a reduced glycogen content of the storage cells (place of vitellin synthesis) in D. magna exposed to Cd. In last, in fish species, Ghosh and Thomas (1995) and Hwang et al. (2000) reported a transfert of Cd to ovaries and a reduction of vitellogenin production in organism exposed to this metal.

NP is a breakdown product the nonylphenol ethoxylates (NPE) (Naylor, 1995). NPE are commonly used in industrial, commercial and household applications due to exceptional performance as surfactant, so strong NPE quantities reach wastewater treatment plants (WTP) where they are incompletely degraded to NP (Ahel *et al.*, 1994). Concentrations of NP used in

our study were environmentally relevant, because NP concentrations have been reported between 0.7 ng.L⁻¹ and 15 µg.L⁻¹ in river water (review in Soares *et al.*, 2008). Results showed that NP has a specific effect on embryonic development of this species, with a significant increase of abnormality % from the lowest concentration (0.05 μ g/L). These results are in agreement with those obtained for the barnacle Elminius modestus (Billinghurst et al., 2001) and the copepod Eurytemora affinis (Forget-Leray et al., 2005). These studies report that NP induces drastic effects on the development of these species after exposition at environmentally relevant concentrations. It is interesting to note the oocyte surface induction (although not significant statistically) observed at the highest NP concentration. However, conflicting results are obtained from literature. Lye et al. (2007) do not observe vitellin-like protein induction in Carcinus maenas after an exposure to NP concentrations of 1.5 and 15 µg/L. On contrast, in females Neomysis integer, Ghekiere et al. (2006) found that a 96 h exposure to a NP concentration of 0.01 µg/L lead to a significant induction of vitellin levels, whereas no inductions were observed for higher concentrations. Even this current study do not permit to suspect or not NP as an ED toward G.fossarum, our results shown that NP has a specific toxicity towards embryonic development of this species.

Methomyl is a carbamate pesticide currently used in agricultural practices and known to be a specific anti-cholinesterasic compound in *G. fossarum* (Xuereb *et al.*, 2009b), leading a significant inhibition of acetylcholinesterase activity from 10 μ g/L of MT. According to our previous results, no mortality was observed for concentrations up to 80 μ g/L, *i.e.* well above concentrations found in the natural environment, moreover, no impacts were observed on all reproductive features studied.

4. Conclusions

The present study reports first data on the characterization of moult and reproductive cycle and on the proposal of a reproductive toxicity test in an European freshwater amphipod species, *Gammarus fossarum*. This study meets to a lack of tools for assessing the reprotoxicity and endocrine disruption of pollutants toward freshwater crustacean.

A well knowledge of biology and physiology of reproductive process in test species is the first step for the development of specific ED biomarker related to the reproduction (aims of our further studies), but equally to propose a relevant and reliable bio-test. Bio-test developed in this study is robust and reproductible with a very low variability of control values. Reference values (benchmarks) have been proposed for each biological responses used as toxicity indicator, thus increasing the accuracy and the power of this bio-test.

As compared to methodologies available with other crustacean species, this new reprotoxicity test allows to specifically assess the impact of pollutants on various physiological process related to reproductive success of the organisms and known to be under a specific endocrinal regulation. This new bio-test lead to a better understanding of the mode-of-action of chemical on crustacean hormone-regulated processes. In addition to various advantages to use *G. fossarum* as organism test species, with this species, it is possible to assess one of indirect impact of pollutants, corresponding to a inhibition of the feeding rate.

The present results show that Cd has a specific impact on the oocyte growth (secondary vitellogenesis) with oocyte surface values lower in organisms exposed to a environmental contamination level of 1 μ g/L. In the same, way, our results show that under environmental contamination level, NP has a specific deleterious impact on, the embryonic development on this species. On the contrary, MT known to be a specific anti-cholinesterasic compound did not induce reproductive success alterations for exposure levels up to 80 μ g/L.

Acknowledgments

The authors wish to thank the French National Research Programs PNRPE, ECCO (Convention n° 06CV050), ECOGER (Convention n° 20-2006), PIREN-Seine Research Program, the water 'Rhône-Méditerranée-Corse' water ageny, the Cluster Environnement Région Rhône-Alpes and the GIS Environalp for financial support.

References

- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment. Water Research. 28:1131-1142.
- Alonso, A., De Lange, H.J., 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.
- Billinghurst, Z., Clare, A.S., Depledge, M.H. 2001. Effects of 4-n-nonylphenol and 17β-oestradiol on early development of the barnacle Elminius modestus. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 257:255-268.
- Beketov, M.A., Liess, M. 2008. Potential of 11 Pesticides to Initiate Downstream Drift of Stream Macroinvertebrates. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 55:247-253.
- Blanchet-Tournier, M.F., 1980. Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarelus* (PALLAS) : Controles endocries et interactions. Sciences Naturelles. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Paris, p. 175.
- Blockwell, S.J., Pascoe, D., Taylor, E.J. 1996. Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.). Chemosphere. 32(9):1795-1803.
- Bodar, C.W.M., van Donselaar, E.E.G., Herwig, H.J., 1990. Cytopathological investigations of digestive tract and storage cells in *Daphnia magna* exposed to cadmium and tributyltin. Aquatic Toxicology. 17:325-338.
- Chaumot, A., Gos, P., Garric, J., Geffard, O. Additive vs non-additive genetic components in lethal cadmium tolerance of *Gammarus* (Crustacea): novel light on the assessment of the potential for adaptation to contamination. Aquatic Toxicology; Accepted.
- Chung, P.P., Hyne, R.V., Mann, R.M., Ballard, J.W.O. 2008. Genetic and life-history trait variation of the amphipod Melita plumulosa from polluted and unpolluted waterways in eastern Australia. Science of the Total Environment. 403:222-229
- Costa, F.O., Neuparth, T., Correia, A.D., Costa, M.H. 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: 93-110.
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1998. The use of biomarkers in Daphnia magna toxicity testing I. The digestive physiology of daphnids exposed to toxic stress. Hydrobiologia. 367, 199-209.
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M. 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. Aquatic Toxicology. 78:209-216
- 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. Environmental Science and Technology 32 (11):1549-1558.
- European Commission (2003) Technical guidance document on risk assessment Part II. European chemical Bureau institute of health and consumers protection. European Commission Joint Research Centre, Ispra, Itali, pp 1-203.
- European Medicines Agency (EMEA) (2006) Guideline on the environmental risk assessment of medical products for human use EMEA/CHMP/SWP/4447/00. <u>http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/4447en.pdf</u>.
- Felten, V., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., Aujoulat, F., Mons, R., Geffard, A., Rouselle, P., Garric, J., Geffard, O. 2008. Physiological and behavioral responses of *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda) exposed to Cadmium. Aquatic Toxicology. 86, 413-425.
- Fialkowski, W., Calosi, P., Danlke, S., Dietrich, A., Moore, P.G., Olenin, S., Persson, L.E., Smith, B.D., Spegys, M., 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 :39-44.
- Forbes, V. E., Calow, P. & Sibly, R. M. 2008 The extrapolation problem and how population modeling can help. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1987-1994.

- Ford, A.T., Fernandes, T.F., Rider, S.A., Read, P.A., Robinson, C.D., Davies, I.M. 2003. Measuring sublethal impacts of pollution on reproductive output of marine Crustacea. Marine Ecology Progress Series. 265:303-309.
- 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. *Marine Environmental Research*, 58:169-173.
- Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulenger, F. 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). Ecotoxicology and Environmental Safety. 60:288-294.
- Gale, S.A., King, C.K., Hyne, R.V. 2006. Chronic sublethal sediment toxicity testing using the estuarine amphipod, *Melita plumulosa* (Zeidler): evaluation using metal-spiked and field_contaminated sediments. Environmental Toxicology and Chemistry. 25(7):1887-1898.
- Geffard A, Quéau H, Dedourge O, Biagianti-Risboug S, Geffard O. 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol, 145 :632-640.
- 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.
- Ghosh, P., Thomas, P. 1995. Binding of metals to red drum vitellogenin and incorporation into oocytes. Marine Environmental Research. 39(1-4):165-168.
- Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morrit, D., 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.
- Hwang, U.G., Kagawa, N., Mugiya, Y. 2000. Aluminium and cadmium inhibit vitellogenin and its mRNA induction by estradiol-17 β in the primary culture of hepatocytes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology. 119(1):69-76.
- Jacobson, T., Sundelin, B. 2006. Reproductive effects of the endocrine disruptor fenarimol on a Baltic amphipod *Monoporeia affinis*. Environmental Toxicology and Chemistry. 25(4):1126-1131.
- Ladewig, V., Jungmann, D., Koehler, A., Schirling, M., Triebskorn, R., Nagel, R. 2002. Intersexuality in Gammarus fossarum Koch, 1835 (Amphipoda). Crustacean. 75:1289-1299.
- Langston WJ, Burt GR, Chesman BS, Vane CH. 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in aquatic environment. J Mar Biol Assoc UK 85,1-31.
- Lawrence, A.J., Poulter, C. 2001. Impact of copper, pentachlorophenol and benzo[a]pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*. Marine Ecology Progress Series. 223: 213-223.
- LeBlanc, G. 2007. Crustacean endocrine toxicology : a review. Ecotoxicology. 16:61-81.
- Lee, R.F., Noone, T., 1995. Effects of reproductive toxicants on lipovitellin in female blue crabs, *Callinectes sapidus*. Marine Environmental Research. 39 :151-154.
- Lye, C.M., Bentley, M.G., Galloway, T. 2008. Effects of 4-nonylphenol on the endocrine system of shore crab, *Carcinus maenas*. Environmental Toxicology. 23 (3):309-318
- Narraci, M., Cavallo, R.A., Acquaviva, M.I., Prato, E., Biandolino, F. 2009. A test battery approach for ecotoxicological characterization of Mar Piccolo sediments in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). Environ Monit Assess. 148 :307-314.
- Neuparth, T., Correia, A.D., Costa F.O., Lima, G., Costa, M.H. 2005. Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I. Biochemical endpoints. Marine Environmental Research. 60:69-91.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 361-368.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Spadaro, D.A., Simpson, S.L. 2009. Development and application of a rapid amphipod reproduction test for sediment-quality assessment. Environmental Toxicology and Chemistry. 28(6):1244-1254.
- Martoja, R., Martoja, M., 1967. Initiation aux techniques d'histologie animale. Masson (eds), Paris, 347 p.

Matthiessen P, 2003. Endocrine disruption in marine fish. Pure Appl Chem 75, 2249-2261.

- Mazurova, E., Hilscherova, K., Triebskorn, R., Köhler, H.R., Marsalek, B., Blaha, L. 2008. Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans : Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants. Biologia. 63(2):139-150.
- McCahon, C.P., Pascoe, D. 1988. Use of Gammarus pulex (L.) in safety evaluation tests;
- Meijering, M.P.D. 1980. Drift, upstream-migration, and population dynamics of *Gammarus fossarum* Koch 1835. Crustacean supp. 6:194-203.
- Naylor, C.G., 1995. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. Text. Chem. Color. 27.
- Pascoe, D., Kedwards, T.J., Maund, S.J., Muthi, E., Taylor, E.Y. 1994. Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay – the *Gammarus pulex* (L.) Precopula Separation (GaPPS) test. Water Research. 28(2):369-372.
- Pöckl M. 1995. Laboratory studies on growth, feeding, moulting and mortality in freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. Archiv für Hydrobiologie. 134:223-253.
- Pöckl, M. 1993. Reproductive potential and lifetime potential fecundity of the freshwater amphipods Gammarus fossarum and G. roeseli in Austrian streams and rivers. Freshwater Biology. 30: 73-91.
- Pöckl, M., Humpesch, U.H. 1990. Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. Freshwater Biology. 23: 441-455.
- Pöckl M. 2007. Strategies of a successful new invader in European fresh waters: fecundity and reproductive potential of the Ponto-Caspian amphipod *Dikerogammarus villosus* in the Austrian Danube, compared with the indigenous *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*.
- Raimondo, S. & McKenney, C. L. 2005 Projecting population-level responses of mysids exposed to an endocrine disrupting chemical. *Integrative And Comparative Biology* 45, 151-157.
- Ringenary, M.J., Molof, A.H., Tanacredi, J.T., Schreibman, P.M., Kostarelos, K. 2007. Long-term sediment bioassay of lead toxicity in two generations of the marine amphipod *Elasmopus laevis*, S.I. Smith, 1873. Environmental Toxicology and Chemistry. 26(8):1700-1710.
- Rodriguez, E.M., Medesani, D.A., Fingerman, M. 2007. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 146:661-671.
- Roman, Y.E., De Schampheleare, K.A.C., Nguyen, L.T.H., 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. 387:128-140.
- Scarlett, A., Rowland, S.J., Canty, M., Smith, E.L., Galloway, T.S. 2007. Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediments-associated contaminants using the amphipod *Corophium volutator*. Marine Environmental Research
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R., 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.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environ. Int. 34, 1033-1049.
- Sundelin, B., 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.
- Sutcliffe, D.W. 1993. Reproduction in *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda): female strategies. Freshwater Forum. 3:26-64.
- Subramoniam T. 2000. Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 125: 135-156
- USEPA, 2001. Methods for assessing the Chronic Toxicity of Marine and Estuarine Sedimentassociated Contaminants with the Amphipod *Leptocheirus plumulosus*. EPA/600/R-01/020
- Verslycke, T., Ghekiere, A., Raimondo, S., Janssen, C. 2007. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. Ecotoxicology. 16:205-219.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K. 2001. Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. Water Reseach. 35(10):2347-2352.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K. 2002. Population responses of the freshwater amphipod Gammarus pulex (L.) to an environmental estrogen, 17α-ethinylestradiol. Environ. Toxicol. Chem. 21(2):445-450.
- Widarto, T. H., Krogh, P. H. & Forbes, V. E. 2007 Nonylphenol stimulates fecundity but not population growth rate (lambda) of *Folsomia candida*. *Ecotoxicology And Environmental Safety* 67, 369-377.
- Wilding, J., Maltby, L. 2006. Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: implications for risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry. 25(7): 1795-1801.
- 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).
- Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., Geffard O. 2009a. 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., Lefèvre, E., Garric, J., Geffard O. 2009b. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquatic Toxicology, 94: 114-122.
- Xuereb, X., Bezin, L., Budzinski, H., Tutundjian, R., Garric, J., Geffard, O. Use of vitellogenin-like gene transcript as a biomarker of endocrine disruption in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835); Environmental Pollution, submitted.

Table contents

Overlying water		Natural drilled groundwater, 12 °C, conductivity $600 \pm 50 \mu$ S/cm					
Organisms		Collected from a uncontaminated site (Bourbre river, Isere)					
Acclimatization		3 weeks at 12°C					
Photoperiod		8 light and 16 dark					
Test vessel		Polypropylene for inorganic compounds and glass-beaker for					
		organic compounds; Vol : 500 mL					
Water renewal		Continuous or semi-continuous, according to tested compound					
Life stage of female		Females in last of the reproductive cycle (hatched juveniles in					
		brood pouch, visible gonads, guarding male)					
Size of females		8 – 10 mm					
Number of	test	7 mating pairs					
organisms/vessel							
Feeding		15 disc (\emptyset : 20 mm) of alder leaves/ week, for assessing feeding					
		rate.					
Aeration		Continuous					
pН		7.8 - 8.3					
conductivity		$600 \pm 50 \mu S/cm$					
Test duration		21 days; a waiting period of roughly 4 days is necessary that					
		moulting occurs in 100 % of females (Chaumot et al. accepted)					
Endpoints		Survival, moulting, fecundity, fertility, oocyte growth and					
embryonic development							

Table 1: Test conditions for the sub-lethal reprotoxicity in G. fossarum

Table 2: Oocyte surface (mean \pm SE, n = 15) and oocyte and embryo number (mean \pm SE, n = 15; normalized by the female size) in *G. fossarum* females, in relation to moult cycle. n.d. : no determined, newly hatched young was not considered, since they can freely leave the brood-pouch.

Moult stages	Oocyte surface (μm^2)	Oocyte number	Embryos number
AB	21 900 ± 1 800	2.5 ± 0.25	1.3 ± 0.18
C1	$39\ 400 \pm 4\ 500$	2.4 ± 0.43	1.4 ± 0.35
C2	$106\ 000\pm 6\ 800$	1.6 ± 0.17	1.6 ± 0.24 .
D1	$133\ 000 \pm 3\ 300$	1.6 ± 0.28	1.4 ± 0.38
D2	$164\ 000\pm 5\ 800$	1.5 ± 0.35	n.d.

Table 3 : Occurrence (%) of different moult (B, C1, C2 and D1, see detail in text) and embryonic stages (1, 2, 3 and 4, see detail in text) in *G. fossarum* exposed to cadmium (Cd; 0, 0.3, 1 and 3 μ g/L), methomyl (MT; 0, 5, 20 and 80 μ g/L) and nonlyphenol (NP; 0, solvent-0, 0.05 and 5 μ g/L); and starvation diet (100, 50 and 25% of total time). n= 15, 12, 14 and 15 for Cd, MT and NP exposure and starvation diet experiment, respectively; n.a. : no available because data have been lost.

Condition		Moult stages (%)				Embryonic development				% of desynchronization	
						(%)				(moult/embryo)	
		В	C1	C2	D1	1	2	3	4	delayed	delayed
										moult	embryos
Cd (µg/L)											
	0	n.a.	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
	0.3	0	20	80	0	0	14	86	0	7	0
	1	0	33	67	0	0	13	87	0	20	0
	3	0	67	33	0	0	13	87	0	43	0
MT (µg/L)											
	0	0	9	91	0	0	9	91	0	0	0
	5	0	9	82	9	0	9	82	9	0	0
	20	0	9	91	0	0	0	100	0	0	0
	80	0	9	73	18	0	0	90	10	0	0
NP (µg/L)											
	0	0	7	93	0	0	7	93	0	0	0
	0	0	0	100	0	0	7	93	0	0	0
	solvent										
	0.05	0	14	86	0	0	14	86	0	0	0
	5	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
Starvation											
(%)											
	100	0	15	77	8	0	0	92	8	15	0
	50	0	15	70	15	0	0	83	17	23	0
	25	23	23	47	8	0	0	85	15	54	0

Figure list



Figure 1: Integumental changes of dactylopodite and protopodite from first and second periopod pairs in *G. fossarum* during its moult cycle.



Figure 2: Gammarus fossarum. Embryonic development ; each stage is characterized using criteria defined by Sutcliffe (1993). Cross section of maturing oocyte in relation to moult cycle. Scale bars : 100μm for AB and C1 moult stages and 200 μm for C2, D1 and D2 moulting stages. FC : follicle cells; EVO : early vitellogenic oocyte; LVO : late vitellogenic oocyte; YV : yolk vesicle; LG : lipid globule.



Figure 3: Oocyte surface (μ m2, mean \pm S.E., n = 10) in *Gammarus fossarum* females after a 21 days exposure to cadmium (Cd; 0.3, 1 and 3 μ g/L), methomyl (MT; 5, 20 and 80 μ g/L) and nonylphenol (NP; 0.05 and 5 μ g/L) contamination and to starvation diet (st; with food for 50 and 25 % of exposure time). Cw: solvent-free control, Cs: solvent control. *: significantly different (p < 0.05) from the control; n.a. : no available because data have been lost.



Figure 4: Normalized oocyte number (mean \pm S D) in C2 moult stage *Gammarus fossarum* females after a 21 days exposure to cadmium (Cd; 0, 0.3, 1 and 3 µg/L), methomyl (MT; 0, 5, 20 and 80 µg/L) and nonlyphenol (NP; 0, solvent-0, 0.05 and 5 µg/L); and starvation diet (100, 50 and 25% of total time). Cw : solvent-free control, Cs: solvent control; n.a. : no available because data have been lost.



Figure 5: Normal embryo (%; mean \pm S D) in C2 moult stage *Gammarus fossarum* females after a 21 days exposure to cadmium (Cd; 0, 0.3, 1 and 3 µg/L), methomyl (MT; 0, 5, 20 and 80 µg/L) and nonlyphenol (NP; 0, solvent-0, 0.05 and 5 µg/L); and starvation diet (100, 50 and 25% of total time). Cw: solvent-free control, Cs: solvent control. *: significantly different (p < 0.05) from the control; n.a.: no available because data have been lost.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

2. DEVELOPPEMENT ET APPLICATION DE LA MESURE D'EXPRESSION DU GENE CODANT POUR LA VITELLOGENINE

Publication n°6:

Use of vitellogenin-like gene transcript as a biomarker of endocrine disruption in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835).

Benoît Xuereb, Laurent Bezin, Hélène Budzinski, Renaud Tutundjian, Jeanne Garric & Olivier Geffard.

L'induction de la synthèse de vitellogénine (Vtg) a été largement utilisée comme un biomarqueur chez le poisson afin d'évaluer l'exposition des juvéniles et les mâles adultes à des composés ostrogéniques. En revanche, son utilisation potentielle chez les invertébrés a reçu une bien moindre attention. Chez les crustacés, la synthèse Vtg semble pourtant être une réponse intéressante pour évaluer des perturbations du système endocrine, au vu du fonctionnement des voies hormonales impliquées dans sa régulation. Cependant, les études rapportant l'induction de Vtg chez les crustacés mâles sont quasi inexistantes. Dans ce contexte, nous avons étudié l'expression du gène Vtg chez l'amphipode d'eau douce, Gammarus fossarum, au moyen de la procédure de RT -PCR en temps réel. Dans un premier temps, nous avons décrit le patron d'expression de base (*i.e.* organismes non-exposés) pour les différents stades du cycle de reproduction (i.e. de mue) des femelles, ainsi que chez des mâles. Les niveaux d'expression observés chez les femelles étaient de 200 à 700 fois plus élevés que chez les mâles. Les résultats ont également montré une élévation significative de l'expression de Vtg en fin de la phase d'inter-mue et au commencement de la phase de prémue. Dans un deuxième temps, des gammares mâles ont été exposés à un mimétiqueæstrogène, le nonvlphenol (0.05, 0.5, 5 et 50 μ g.l⁻¹) et à un anti-androgène, la cyprotérone acétate (1, 10, 100 et 1000 µg.l⁻¹) durant 2, 4, 8 et 16 jours. Une induction de la transcription du gène de la Vtg a été observée dans les deux cas. Pour finir, les effets de rejet de stations d'épuration (STEP) sur l'expression du gène Vtg ont été évalués chez des organismes mâles transplantés dans le milieu dans le cadre de deux campagnes de bioessais in situ en novembre et juin 2007. Aucun effet des effluents de STEP n'a été enregistré au cours de ces deux campagnes. Néanmoins, une induction du niveau de l'expression de Vtg a été constatée chez des mâles transplantés sur un des sites de référence durant la campagne de juin 2007.

Article en préparation pour Environmental Pollution.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Use of vitellogenin-like gene transcript as a biomarker of endocrine disruption in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835).

Benoît Xuereb¹, Laurent Bezin², Hélène Budzinski³, Renaud Tutundjian¹, Jeanne Garric¹ & Olivier Geffard¹.

¹CEMAGREF, Laboratoire d'écotoxicologie, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon, CP 220, Cedex 09, France.

² Laboratoire de physiologie intégrative cellulaire et moléculaire, UMR 5123, Université de Lyon I, 69622 Villeurbanne (France).

³ Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie des Systèmes Naturels, UMR 5472, Université Bordeaux I

Corresponding authors (e-mail: xuereb@lyon.cemagref.fr, geffard@lyon.cemagref.fr).

Abstract

The induction of vitellogenin (Vtg) synthesis has been widely used as a biomarker of estrogenic exposure in male and juvenile fish, but less in invertebrates. In crustaceans, Vtg synthesis has emerged as a useful and ecologically important endpoint to assess endocrine disruptor effects according to the large number of endocrine-control pathways involved. However, studies reporting induction of Vtg in male crustaceans are lacking. In this context, using calibrated real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT PCR), we studied the expression of the Vtg gene in a freshwater amphipod, Gammarus fossarum. First, we described the basal pattern of expression in healthy organisms, males and females, at different reproductive moult stages. Females expressed from 200 to 700 times more Vtg transcripts than males. Females displayed a significant elevation of Vtg mRNA level at the end of inter-moult phase and at the beginning of pre-moult phase. Then male gammarids were exposed to nonvlphenol (0.05, 0.5, 5 and 50 μ g.L⁻¹) and to the antiandrogen cyproterone (1, 10, 100 and 1 000 μ g.L⁻¹) for 2, 4, 8 and 16 days. Both chemicals caused an induction of Vtg gene transcription. To the end, the impact of urban wastewater treatment plants (WTP) on male Vtg gene expression was assessed in organisms transplanted in the field for two in situ bioassay campaigns in November and June 2007. No effect of WTP effluents was recorded in the two campaigns. Nevertheless, induction of Vtg mRNA level was observed in males transplanted upstream of WTP effluent discharge during the June 2007 campaigns.

Keywords: Biomonitoring; Cyproterone acetate; Endocrine disruption, *Gammarus fossarum*; Nonylphenol; Vitellogenin.

1. Introduction

Organic and inorganic contaminants of natural and anthropogenic origin ultimately enter aquatic systems and may have short-term and long-term negative biological effects. Numbers of these pollutants are known to be potential endocrine disruptors (EDs) that may adversely affect health in humans, wildlife, fisheries, and their progenies, by interaction with the endocrine system (Colborn et al., 1993). *In situ*, the occurrence of endocrine-disrupting effects is often in relation to sewage treatment plant effluents that contain xenoestrogens, and synthetic or natural hormones (Desbrow et al., 1998). However, potential endocrine-disrupting effects of pollutants from industrial and agricultural sources has not been adequately studied.

Studies on ED impacts on wildlife focus particularly on the hormonal regulation related to reproductive function, because of its critical role in population dynamics. The availability and the biological effects of ED in aquatic vertebrates, notably in fishes, have been reported in numerous publications (Matthiessen, 2003; Langston et al., 2005; see cited literature). These studies have led to the development of biomarkers, such as abnormal concentrations in steroid hormones or induction of vitellogenin synthesis in male and juvenile organisms. On the contrary, despite their obvious ecological importance, relatively few studies have been conducted on invertebrates, and, consequently, few tools are available to diagnose the ED exposure and/or effects in these organisms (deFur et al., 1999; deFur, 2004; Oetken et al., 2004), in large part because of the lack of knowledge on their endocrine regulation.

The Ecdysozoa clad (*i.e.* organisms with cuticle) groups nearly 75% of animal species, including crustaceans, which are the main members of this clad in aquatic ecosystems. There is growing evidence that crustaceans may be susceptible to ED. Field studies reported abnormal sex-ratio and intersexuality frequency in natural populations exposed to pollution sources (*e.g.* Moore et Stevenson, 1991, 1994; Takahashi *et al.*, 2000; Ford *et al.*, 2004b; Ayaki *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008). Some papers have shown the deleterious effects of "vertebrate known ED" and growth regulator insecticides on the reproduction rate, sexual behaviour and sexual development of crustaceans (*e.g.* Linton *et al.*, 2009; Baldwin *et al.*, 1995; Gross *et al.*, 2001; Olmstead et LeBlanc, 2001b; Watts *et al.*, 2001; Schirling *et al.*, 2006). Although changes in these endpoints may indicate a response to ED exposure, they can also vary in response to a wide range of other stresses such as food supplies, parasite

occurrence and/or other environmental conditions. Until now, very few specific ED biomarkers related to reproductive impairment have been available in freshwater crustaceans.

Vitellogenin and vitellogenin-like proteins (Vtg) are precursor molecules of yolk proteins (*i.e.* vitellin) that provide the energy reserves needed for embryonic development in oviparous organisms and consequently have an important role in their reproduction. Vtg levels are high in sexually mature females, displaying fluctuations during gametogenesis. Conversely, the Vtg gene is generally poorly expressed in juveniles and silent in males, but may be activated in response to ED exposure. Indeed, in fish, in which Vtg production is controlled by the oestrogen receptor pathway, induction of Vtg in males or juveniles is a well-known effect of xenoestrogenic contaminants and has been extensively used as a biomarker in both laboratory and field studies (Matthiessen, 2003; Langston et al., 2005). Similarly, although relatively little is known about the endocrine system in invertebrates, studies show that Vtg is susceptible to different contaminants, including xenoestrogens, metals or complex mixtures (*e.g.* urban and industrial discharges), and could be used as a biomarker of ED exposure (reviewed in Matozzo et al., 2008).

In malacostraca crustaceans, differentiation and maintenance of male 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 tissue to testicular tissue (Charniaux-Cotton, 1954a). 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). In females, the endocrine regulation of Vtg production involves different types of hormones such as ecdysone, methyl farnesoate, monoamines and neuropeptides (Mazurová et al., 2008). Females display natural fluctuations of Vtg levels during their reproductive-moult cycle (Meusy et al., 1974; Jasmani et al., 2000; Okumura et Aida, 2000a; Jayasankar et al., 2002) or in response to environmental conditions such as food availability (Blanchet-Tournier, 1980; Wouters et al., 2001) and osmotic stress (Martin-Diaz et al., 2004). Consequently, it is more difficult to use Vtg synthesis in female crustaceans as a specific biomarker of endocrine disruption. However, as underlined by Ford et al. (2008), nearly all the studies related to Vtg measurements in crustaceans following exposure to environmental contaminants (both in the field and in the lab) mainly focused on females (e.g. Oberdorster et al., 2000; Volz et al., 2003; Gagné et Blaise, 2004; Martin-Diaz et al., 2004; Gagné et al., 2005; Ghekiere et al., 2006b; Huang et al., 2006; Poynton et al., 2007; Lee et *al.*, 2008) and less on juveniles (*e.g.* Billinghurst et al., 2000; Sanders *et al.*, 2005). Except for the work of Huang and Chen (2004) on red cherry shrimp (*Neocaridina denticulata*), no studies have reported elevated expression of *Vtg* following ED exposure in males.

Vtg production is commonly assessed at the protein level using methods based on immunological detection such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), or alkalilabile phosphates measurement (ALP), which is an indirect marker of vitellin. An alternative and complementary approach is the use of methods based on the detection of *Vtg* mRNA. These methods directly assess gene expression, which precedes protein translation. In addition, detection and quantification of *Vtg* mRNA requires very little sample material and benefits from the specificity and sensitivity of a polymerase chain reaction (PCR)-based procedure (García-Reyero *et al.*, 2004). Among these methods of *m*RNA quantification, real-time reverse transcriptase PCR (real-time RT-PCR) is the most accurate and sensitive (Larkin et al., 2003).

The aim of the present study was to develop the assessment of male *Vtg* gene expression in the amphipod crustacean *Gammarus fossarum* using real-time RT-PCR procedure, in order to propose it as a specific ED biomarker. The amphipods of the *Gammarus* genus are commonly used in freshwater risk assessment (Rinderhagen et al., 2000). Gammarids are widespread and common in the streams of Western Europe, where they are often found in high density. They are ecologically relevant species since they are an important reserve of food for macro-invertebrate fish, bird and amphibian species (Welton, 1979; Friberg *et al.*, 1994; MacNeil *et al.*, 2002) and play a major part in the leaf litter breakdown process (Maltby et al., 2002). Moreover, the use of these species is logistically valuable because they can be sampled throughout the year and easily identified, manipulated and maintained in the lab or used for *in situ* bioassays.

We constructed our scientific process in three steps. First, we described the pattern of normal Vtg gene expression in control organisms (*i.e.* in males and throughout the female reproductive moult cycle). Next, in order to determine whether male Vtg gene expression could be modulated by chemicals, we measured Vtg mRNA levels in organisms exposed to two types of "vertebrate known ED": a xenoestrogen, the nonylphenol, and an anti-androgen, cyproterone acetate. Finally, we evaluated the impact of urban wastewater treatment plants on Vtg gene expression in male organisms during two *in situ* bioassays.

2. Material and methods

2.1. Collection and maintenance of Gammarus fossarum

G. fossarum were collected using a net (by kick sampling) from La Tour du Pin, upstream from the Bourbre River (Eastern Central France, 45°34'09.6" N, 5°27'33.0" E). This site has good water quality according to RNB data records (Réseau National de Bassin [French Watershed Biomonitoring Network]; http://sierm.eaurmc.fr/eauxsuperficielles/index.php), and a high density of gammarids is found. Immediately after sampling, different classes of sizes were separated by sieving. Specimens captured through a 2- to 2.5-mm sieving fraction were stored in plastic bottles containing stream water and quickly transferred to the laboratory. Gammarids were kept during an acclimatization period of at least 10 days in 30-L tanks continuously supplied with drilled groundwater (*i.e.* 4 $L.h^{-1}$) adjusted to the sampling site conductivity (*i.e.* $600 \pm 50 \ \mu\text{S.cm}^{-1}$) and under constant aeration. An 8/16 h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at $12 \pm 1^{\circ}$ C. Organisms were fed ad libitum with alder leaves (Alnus glutinosa). Leaves were conditioned for at least 6 ± 1 days in water. Freeze-dried Tubifex worms were issued as a dietary supplement twice a week.

2.2. Experiment 1: Vitellogenin gene expression pattern in control organisms

In amphipod crustaceans, the moult and reproductive cycles of sexually active females are completely synchronized. At the beginning of each moult cycle, simultaneous gonadal growth (*i.e.* the secondary vitellogenesis) and embryo development in marsupium (Charniaux-Cotton, 1985) take place. In a previous study (Geffard et al., in submission), we described six moult stages in *G. fossarum*: two post-moult stages A and B, two inter-moult stages C1 and C2, and two pre-moult stages D1 and D2.

The *Vtg* gene expression was individually measured using the calibrated real-time RT-PCR method (see section 2.5 and 2.6) in males (n = 20) and in females for the six different moult stages (n = 10 per stage). Sex was determined by the presence of external sexual appendages: oostegites for females and penial papillae for males. The moult stages were discriminated on the basis of a comparative *in vivo* microscopic observation of the first and second pereopod article (*i.e.* dactylopodite and protopodite) integumental morphogenesis. The brood-pooch contents of females were manually evaluated. Organisms were then lightly dried, individually placed in microtubes containing RNA*later* (Sigma), frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA extraction (see section 2.4).

2.3. Experiment 2: Vitellogenin gene expression in male gammarids exposed to nonylphenol and cyproterone acetate

Sixteen-day semi-static exposure tests were performed at a temperature of $12 \pm 1^{\circ}$ C and under a photoperiod of 8/16 h light/dark. Four nominal concentrations of nonylphenol (NP: 0.05, 0.5, 5 and 50 µg.L⁻¹) and cyproterone acetate (CP: 1, 10, 100 and 1 000 µg.L⁻¹) were studied at the same time. Stock solutions were prepared in acetone at concentrations ranging from 0.001 to 1 g.L⁻¹ for NP, and from 0.02 to 20 g.L⁻¹ for CP. The contaminated media were obtained by adding 250 µL of stock solutions in 5 L of uncontaminated drilled ground water (*i.e.* 600 ± 50 µS.cm⁻¹; previously kept at $12 \pm 1^{\circ}$ C). Water controls as well as solvent controls (the concentration of acetone was kept at 0.05‰ in contaminated media) were included.

For each condition tested, four males with homogeneous weight were placed in 500mL glass beakers (n = 8). A piece of net (mesh size: 200 µm; length × width: 6 × 5 cm) was added in the vessel to provide a resting surface and avoid cannibalism. Media were renewed every 48 h, and at the same time the surviving organisms were assessed and the dead ones were removed. During the tests, organisms were fed *ad libitum* with conditioned alder leaves (*Alnus glutinosa*). Water quality parameters (pH, conductivity, temperature and dissolved oxygen) were controlled before and after the renewal of the test solutions.

After 2, 4, 8 and 16 days of exposure, for each tested condition, two replicates were removed, within which five males were randomly sampled. The organisms were rapidly rinsed in uncontaminated drilled ground water, lightly dried, individually placed in microtubes containing RNA*later*, frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until total RNA extraction (see section 2.4). However, it is important to note that although total RNAs were individually extracted, at first the calibrated real-time RT-PCR procedure (see section 2.5 and 2.6) was performed on total RNA pools for quick assessment of *Vtg* expression changes in each tested condition. Second, when expression changes were observed, the calibrated real-time RT-PCR procedure for each of five organisms sampled in the conditions.

2.4. Experiment 3: Vitellogenin gene expression in male gammarids exposed in the field

Two *in situ* bioassay campaigns were performed in 2007 in Rhône catchment areas (Fig. 1A), within an environmental risk assessment program supported by the Rhône-Méditérranée-Corse water agency, related to impacts of wastewater treatment plant (WTP) effluents on freshwater ecosystems.

The first campaign was carried out in June for four stations located in the Bourbre River basin (a Rhône River tributary), close to the WTP of the city of Bourgoin-Jallieu (78,000 population-equivalent) (Fig. 1C). The first station (B1) was positioned 200 m upstream from the confluence between the drainage canal receiving WTP effluent and the Bourbre River. Station B2 was situated in the drainage canal below the WTP effluent discharge. Stations B3 and B4 were found 200 m and 8 km downstream of the confluence between the drainage canal and the Bourbre River, respectively.

The second campaign was carried out in November, at three sites located in the Saône River (a Rhône River tributary), close to the Fontaine-sur-Saône WTP (45,000 population-equivalent) (Fig. 1B). The first station (S1) was 200 m upstream of WTP effluent discharge in the Saône River. Station S2 was located at the discharge point. Station S3 was situated 200 m downstream of the effluent discharge.

In situ bioassays were adapted from the methods described by Maltby et al. (1990b). Twenty-four hours before the beginning of the experiment, replicates of eight adult male gammarids of homogeneous size were placed in a polyvinyl-chloride cylinder (diameter \times length: 5×10 cm) capped in its ends with pieces of net (mesh size: 1 mm) and maintained in the acclimatization conditions described above (see section 2.1). Three replicates per site were deployed for 21 days. During the tests, the gammarids were fed ad libitum with conditioned alder leaves (Alnus glutinosa). Cages were fixed to holding baskets and positioned parallel to the water flow. Holding baskets were secured to the stream bed using natural rocks. At the end of the experiments, the cages were stored in plastic bottles containing stream water and quickly transferred to the laboratory. Gammarids (n = 5 and n = 10 per studied site, for the first and second campaign, respectively) were randomly sampled in different replicates. The gammarids were then rapidly rinsed in uncontaminated drilled ground water, lightly dried, individually placed in microtubes containing RNAlater and frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C until total RNA extraction (see section 2.4). Quantification of Vtg gene expression of each gammarid was assessed using the calibrated real-time RT-PCR method (see section 2.5 and 2.6).

2.4. Total RNA extraction

Gammarid whole bodies, removed from RNAlater, was ground using micro-pestle (Eppendorf), during three freezing/unfreezing cycles in liquid nitrogen, and then homogenized in 250 µL of nuclease-free ultra-pure water (Sigma). Total RNAs were extracted with 750 µL of Tri-Reagent LS (Euromedex) and isolated by adding 200 µL of chloroform (Sigma) and then centrifuged (15 min, 12,000 g, 4°C). Thus, total RNAs contained in the aqueous phase (500 μ L) were precipitated with 500 μ L of isopropanol (Sigma). After centrifugation (10 min, 12,000 g, 4°C), the RNA pellet was rinsed with ethanol 75% and dissolved in 50 µL of ultra-pure water (Sigma). To remove potential contamination with genomic DNA, the total RNA solutions were digested with TURBO DNA-free® (Ambion) for 30 min at 37°C, and purified according to the manufacturer's instructions. It should be noted that to validate the extraction procedure, total RNA integrity and the purity of test samples were previously determined with RNA-Bioanalyser[®] 2100 (Agilent). The total-RNA concentration of purified solutions was measured at 260 nm using a BioPhotometer® (Eppendorf), and stored at -80°C. The samples with a 260:280-nm ratios less than 1.8 were not used; for all others, the lack of genomic DNA contamination was verified on 50-ng aliquots of total RNAs by Vtg gene amplification in real-time PCR.

2.5. Calibrated Reverse Transcription (calibrated RT)

Messenger RNAs (*m*RNAs) contained in 1 µg of total RNAs were reverse transcribed in the presence of a synthetic external, heterologous and noncompetitive poly(A) Standard RNA (SmRNA) used to calibrate the reverse transcription (Morales and Bezin, patent WO2004.092414). First-strand complementary DNA (*c*DNA) was synthesized in a 40-µL volume: 24 µL of purified total RNA solution (adjusted to 41.7 ng.µL⁻¹) and 16 µL of reaction mixture containing 100 U of M-MLV reverse transcriptase Rnase H minus[®] (Promega), 5 X M-MLV RT reaction buffer, 0.8 mM each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, 2 µg of oligo(dT)₂₀, 80 U of RNAsin[®] (Promega), and 80 pg of calibrator SmRNA. It is important to note that all samples in the same experiment were reverse transcribed at the same time with the same reaction mixture. RT was carried out for 90 min at 42°C, and then inactivated 15 min at 70°C. Finally, *c*DNAs were diluted in 20 µL of ultra-pure water and stored in 5-µL aliquots at -25° C.

2.6. Real-time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR)

The specific forward and reverse primers were designed from the *c*DNA *Vtg* sequence of *Gammarus pulex*, which were kindly communicated to us by Sambles and colleagues (unpublished data), using "Universal Probe Library" software (Roche Diagnostics). The sequences of the primer pair used were: $Vtg_{Gf-Forward}$ 5′ TTT CGA TGG CGT GTC TTT TA 3′, $Vtg_{Gf-Reverse}$ 5′ TCC TGT TGG TGC TGA ACT TG 3′ (75 pb). PCR product identity was confirmed by sequencing on 3100-Avant Genetic Analyser (Applied Biosystems HITACHI). The primer sequences and the quantification conditions of calibrator *c*DNAs (Standard *c*DNAs) are protected by the patent WO2004.092414.

The real-time PCR *c*DNAs were performed on the LightCycler[®] System (Roche Diagnostics) using the QuantiTect SYBR[®] Green PCR Kit (Qiagen), in 20- μ L volume containing 5 μ L of *c*DNA sample, 4 μ L of ultra-pure water, 1 μ L of primers (forward and reverse; 10 μ M) and 10 μ L of QuantiTect Master Mix 2X. *c*DNAs were initially denatured at 95°C for 15 min and then amplified for 45 cycles of denaturation at 94°C for 15 s, hybridization at 58°C for 30 s and elongation at 72°C for 6 s. Following the last PCR cycle, all *c*DNAs were denatured by a rapid increase to 95°C and hybridized again for 20 s at 68°C. The melting curve was finally determined during a slow temperature elevation up to 98°C (0.1°C.s⁻¹). The melting curve analysis allowed checking the specificity of PCR products.

Ct values (*i.e.* cycle number from which fluorescence is detected above the noise threshold) were collected with Quantification software v1.0 (Roche Diagnostics) using the second derivative method. Ct values were converted into the number of *c*DNA copies using the quantification curve specific for each primer pair that had been previously established from serial dilutions of purified PCR products. For each sample, the number of *Vtg c*DNA copies was normalized according to relative efficiency of RT determined by the standard *c*DNA quantification. Finally, gene expression was expressed in the *c*DNA copy number quantified following RT of *m*RNAs contained in 1 μ g of total RNAs.

2.7 Statistical analysis

All results of Vtg gene expression are given as mean \pm standard error of the mean (SEM). The nonparametric Mann-Whitney U test was used for inter-group comparison, and the variance homogeneity was tested using the Level test. The significant *p*-level was set to 0.05. These analyses were carried out with Statistica[®] software v7.0 (Statsoft).

3. Results

3.1. Experiment 1: Vitellogenin gene expression pattern in control gammarids

The *Vtg* gene expression levels measured in different groups of control gammarids are presented in Figure 2. Significant inter-sex differences ($p < 10^{-6}$) were observed, with the mean *Vtg* gene expression in adult males (537.0 ± 167.2 cDNA copies) ranging from 190- to 660-fold lower than those recorded in different groups of females (from 99 245.0 ± 24 299.7 cDNA copies in QA to 380 255.2 ± 99 404.2 cDNA copies in QC2). In females, significant induction of *Vtg* gene expression (p < 0.05) was observed at the end of inter-moult and beginning of pre-moult stages. Indeed, mean *Vtg* gene expression of females in C_2 and D_1 reproductive-moult stages was three- to fourfold higher than those measured during the other moult stages.

3.2. Experiment 2: Vitellogenin gene expression in male gammarids exposed to nonylphenol and cyproterone acetate

The pH values, conductivity, and temperature recorded during the two experiments were as follows: 7.54–8.24, 540–633 μ S.cm⁻¹, 11.1–12.4°C, respectively. Dissolved oxygen recorded after and before the renewal of test solutions ranged from 89 to 102% and 69 to 91%, respectively. Mortality was less than 25% throughout the test period and no significant difference (*p* > 0.05) in survival was observed in relation to treatment conditions.

Figure 3 presents a rapid assessment of the *Vtg* gene expression performed from the pool of total RNAs individually extracted, for each experimental group. This screening step showed that both NP and CP induce *Vtg* gene expression. Indeed, in comparison to the respective solvent controls, the *Vtg* gene was eightfold more expressed after a 4-day exposure period in the group treated with 1 000 μ g.L¹ of CP (with 10,610 *c*DNA copies), and 14-fold more expressed in the group exposed to 0.05 μ g.L⁻¹ of NP after 16 days (with 6881 *c*DNA copies). It is interesting to note that the *Vtg* gene expression recorded in both solvent-free and solvent control groups displays a time-dependent decrease. The *Vtg* gene was on average 2.5-and fivefold more expressed after 2 days in comparison to other measure times, for solvent-free and solvent control groups, respectively.

In addition to the screening step, the *Vtg* gene expression was quantified from individual samples of extracted total RNAs for certain experimental groups (indicated by arrows on Figure 3) for statistical analysis. Figure 4 illustrates the expression levels measured

in solvent-free and solvent control groups at different exposure times. Although the expression levels measured after 2 and 16 days of exposure were on average twofold higher for solvent controls than for solvent-free controls, no significant difference was observed (p > 0.1). However, a significant decrease in *Vtg* gene expression was observed for both solvent and solvent-free controls between 2 and 16 days of exposure (p < 0.05).

The values of Vtg gene expression individually measured in gammarids exposed for 4 and 16 days to 1 000 µg.L⁻¹ of CP and 0.05 µg.L⁻¹ of NP, respectively, as well as those of corresponding solvent control are presented in Table 1. Males exposed to CP and NP exhibited a Vtg gene expression four- and ninefold higher than those maintained in control conditions. In both cases, significant heterogeneity of variances between controls and treated groups ($p < 10^{-3}$ and 0.05, respectively), underlined the higher expression variability recorded in exposed organisms. Indeed, only some treated organisms displayed a very high expression level in comparison to nontreated ones, which explains that the observed inductions were not statistically significant (p = 0.095 and 0.690, in CP and NP, respectively).

3.3. *Experiment 3: Vitellogenin gene expression in male gammarids exposed in the field* No significant mortality was recorded at the end of 21 days of *in situ* bioassay.

Figure 5 shows the *Vtg* gene expression levels in male gammarids exposed in the field for the two *in situ* bioassay campaigns. In both cases, the water treatment plant discharge did not have an impact on the males' *Vtg* gene expression. No significant differences in expression were observed for all stations taken together (p = 0.43). However, the *Vtg* gene was a mean 15-fold more expressed in gammarids transplanted in station B1 (*i.e.* site located upstream from Bourgoin-Jallieu WTP) and was significantly more variable ($p < 10^{-3}$) in comparison to gammarids from other stations. As previously observed, only some organisms at station B1 displayed abnormally high expression levels, explaining the absence of significant differences.

4. Discussion

4.1. Pattern of vitellogenin gene expression in control gammarids

In the first part of this study, *GfVtg m*RNA levels of males and sexually active females were determined and compared in order to establish a pattern of *Vtg* gene expression in control organisms.

The *GfVtg* gene was not completely silent in males, but, as expected, strong inter-sex differences in transcription levels were observed. Indeed, *GfVtg* gene expression was from 10^2 to 10^3 times greater in females. These results agree with those recently reported by Lee et al. (2008), which showed that, in copepod *Tigriopus japonicus*, females expressed 270 times more *Vtg* than males did. Previously, Sagi et al. (1999) also showed that secondary vitellogenic females exhibited levels of secondary vitellogenetic-specific proteins 10^3 times higher than in males, in crayfish *Cherax quadricarinatus*, whereas Shechter et al. (2005), using real-time PCR, detected no evident expression of the *Vtg* gene in males of this species. Similarly, Volz and Chandler (2004) observed vitellogenin protein levels tenfold higher in vitellogenic females in comparison to males, in copepod *Leptocheirus plumulosus*.

Significant differences in *GfVtg m*RNA levels were also observed in females during their reproductive moult cycle. During the post-moult stages A and B, and the first inter-moult stage C1, the transcription levels in female gammarids were relatively constant. At intermoult stage C2, *GfVtg* expression became significantly elevated and remained high during the first pre-moult stage D1, to finally return, before ecdysis (*i.e.* during stage D2), to levels close to those observed in the post-moult stage. These findings are consistent with our previous results (Geffard et al., in submission), which demonstrated that, in G. fossarum females, the strongest growth of secondary oocytes, accompanied by the accumulation of yolk globule, takes place between the end of the inter-moult stage (i.e. C2) and the beginning of the premoult period (*i.e.* D1). This indicates that the synthesis and the uptake of *GfVtg* become highly active during this molt-cycle period. Then *GfVtg* synthesis ceases and accumulation of yolk globules are completed until oviposition, which takes place after reproductive ecdysis. It is well known that the process of vitellogenesis is closely related to that of moulting in numerous crustacean groups and particularly in peracarids (e.g. amphipods, mycids and isopods) (Charniaux-Cotton, 1973; Subramoniam, 2000). Numerous studies reported similar relationships between Vtg synthesis and ovarian development (e.g. Lee et Chang, 1997; Jasmani et al., 2000; Tahara et al., 2005; Tiu et al., 2006; Okumura et al., 2007). However, a few of them demonstrated the relationship between vitellogenesis and moulting in greater detail. Our results are consistent with previously reported profiles of Vtg mRNA and/or protein titers and ovarian development during the reproductive moult cycle in the amphipod Orchestia gammarelus (Meusy et al., 1974; Blanchet-Tournier, 1980) and the decapod Macrobrachium rosenbergii (Okumura et Aida, 2000b; Jayasankar et al., 2002; Jasmani et al., 2004).

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

4.2. Vitellogenin gene expression in male gammarids exposed to nonylphenol and cyproterone acetate

Due to the lack of detailed knowledge concerning the crustacean endocrine regulation, it was difficult to select model compounds to validate a biomarker such as Vtg-induction in male organisms. Even though hormonal regulation of sexual differentiation and reproduction in crustaceans is mainly associated with the androgenic gland hormone and the sesquiterpenoid methyl farnesoate (review in LeBlanc et al., 1999), further papers have shown that vertebrate-type sex steroids may induce endocrine disruptions in crustaceans. For example, elevation of Vtg synthesis has been reported in females (Billinghurst et al., 2000; Oberdorster et al., 2000; Sanders et al., 2005; Ghekiere et al., 2006b; Huang et al., 2006), larval stages (Billinghurst et al., 2000; Sanders et al., 2005) and males (Huang et Chen, 2004) exposed to estrogenic compounds. The xenoestrogens have been shown to cause alteration of male primary and secondary sex characteristics (Brown et al., 1999b; Vandenbergh et al., 2003; Huang et Chen, 2004). In another way, administration of testosterone to decapods has been shown to stimulate hypertrophy and hyperplasia of the androgenic gland, increase testis size in males, and stimulate the conversion of ovaries to testis in females (Sarojini, 1963; Nagabushanam et Kulkarni, 1981). Finally, Wollenberger and Kusk (2006) reported the presence of previtellogenic oocytes in testis of male copepod Acartia tonsa exposed to antiandrogen cyproterone acetate.

In the present study, we chose to test the effects of a xenoestrogen, the nonylphenol (NP) and a vertebrate anti-androgen, cyproterone acetate (CP). NP is the breakdown product the most frequently used of all manufactured alkylphenol ethoxylates (around 80%), the nonylphenol ethoxylates (NPEs) (Naylor, 1995). NPEs are commonly used in industrial, commercial and household applications because of their exceptional performance as a surfactant; consequently, strong NPE quantities reach wastewater treatment plants (WTPs) where they are incompletely degraded to NP (Ahel et al., 1994). NP concentrations have been reported between 0.7 ng.L⁻¹ and 15 μ g.L⁻¹ in river water (review in Soares et al., 2008). However, concentrations as high as 180 μ g.L⁻¹ have been measured in stream water at WTP effluent discharge points (Blackburn et Waldock, 1995). The estrogenic effects of NP on male fishes, including *Vtg* synthesis induction, has been widely demonstrated (Soares et al., 2008).

CP is a synthetic derivative of progesterone. It has an anti-androgenic action in vertebrates in antagonizing the effect of dihydrotestosterone with androgen receptors, which in turn curbs the release of pituitary gland neurohormone and reduces the testosterone

biosynthesis. CP is mainly used in palliative treatment of prostate cancer, and is part in the composition of some contraceptive pills to decrease acne and hirsutism. Because of its antiandrogen effects, it is also commonly used in hormone therapy. CP is the second progestogen molecule produced in France (821.7 kg per year) and consequently presents an important predicted environmental concentration (Besse et Garric, in submission). CP has been shown to alter testicular development and gametogenesis and reduce the circulating levels of estradiol and testosterone in fishes, at concentrations in the microgram per litre range (Kiparissis et al., 2003; Sharpe et al., 2004).

Our results demonstrate that transcription levels of G. fossarum Vtg (GfVtg) can be induced in males by both xenoestrogen and anti-androgen compounds, during exposures under controlled laboratory conditions. However, although NP acted at environmentally realistic concentrations, this was not the case for CP. Measured Vtg gene expression was a mean ninefold higher in males treated with a lower concentration (0.05 μ g.L⁻¹) of NP than in controls, at the end of a 16-day exposure period. Similarly, male gammarids exposed for 4 days to a very high concentration of CP (1 000 μ g.L⁻¹) showed a mean Vtg mRNA that was fourfold higher than in controls. To our knowledge, only Sharpe et al. (2004) have studied the anti-androgenic effects on Vtg synthesis, in the fish Fundulus heteroclitus. These authors observed no modification of Vtg plasma levels in both males and females after 7 and 15 days of CP exposure (10–1 000 ng. L^{-1}). Concerning the NP effects, Ghekiere et al. (2006a) observed identical hormetic response in female mysids (Neomysis integer) at NP concentrations relatively close to those used in the present study. Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), these authors showed that exposure to NP significantly induced vitellin-protein levels for a low-exposure concentration (0.01 μ g.L⁻¹), whereas no effects were observed at higher concentrations (1 and 100 μ g.L⁻¹). Sanders et al. (2005) also showed that NP significantly enhances the vitellin-like protein synthesis in zoe larvae stages of *Palaemon elegans*, at concentrations ranging from 0.2 to 20 μ g.L⁻¹, the lowest concentration exerting the most consistent stimulatory effects. Several endocrine disruptors, particularly xenoestrogens, have unequivocally been shown to induce nonmonotonic doseresponse curves of biological effects, also called the low-dose effect (Markey et al., 2003). It has been postulated that low-dose effects are caused by a phenomenon of receptor downregulation by the ligand.

On the other hand, Billinghurst *et al.* (2001), who exposed larvae of *Balanus amphitrite* to NP $(0.01-1 \ \mu g.L^{-1})$ from the nauplius stage to the cypris stage, measured (in immunoblot assays)

an elevation of vitellin-like protein levels only at the highest tested concentration. In the same way, the results of alkali-labile phosphate assays showed a dose-dependent *Vtg*-like protein induction in crab *Carcinus aestuarii* exposed to 0.1 mg.L⁻¹ of NP (Ricciardi et al., 2008).

Interestingly, in experimental groups of treated gammarids displaying an induction, only certain organisms presented abnormally high Vtg mRNA levels. Consequently, no statistic difference was obtained. This tends to show that all the male gammarids do not display equal sensitivity toward tested contaminants. It can be hypothesized that these sensitivity differences are due to inter-individual genotypic variability, all the more so because the organisms used in this study were sampled within a wild population. On the other hand, Shechter *et al.* (2005) demonstrated that the occurrence of Vtg synthesis inductions in *C. quadricarinatus* males, following eyestalk ablation, is closely related to moult cycle. Following removal of eyestalks (performed at the end of the inter-moult phase), the authors found only a few cases of Vtg induction during the pre-moult stages, whereas all studied gammarids displayed induction in the early post-moult stages. In this study, the moult stages of male organisms had not been determined. Consequently, it can also be hypothesized that the inter-individual response variability towards contaminants results from heterogeneity of moult stage occurrence among the male organisms. However, this remains speculative and requires verification in further studies.

We noted that the *GfVtg m*RNA levels in the controls were abnormally strong at the beginning of the experiment and decreased significantly to reach values close to those previously defined in the *GfVtg* expression pattern. These differences are likely related to methodological factors such as stress induced by sampling or caused by changes in medium and food availability. Volz and Chandler (2004) observed that vitellin-protein titers in copepod males cultured in sediment were higher than in males reared in microwell volumes of seawater. The authors hypothesized that higher food diversity and quantity in laboratory sediment culture may be potentially responsible for hormonally regulated vitellogenic pathways.

4.3. Vitellogenin gene expression in male gammarids exposed in the field

Effects of WTP effluent discharges are among the best documented examples of endocrine disruption in the aquatic environment, especially concerning fishes. Several studies also reported the effects of WTP effluents on female reproduction in crustaceans. For example, differences in maturity of oocytes, larger late vitellogenesis oocytes, increasing oocyte histological abnormalities and atresia have been observed in *Gammarus* sp. collected downstream from sewage treatment plant discharge (Gross et al., 2001; Schirling et al., 2005). Gagné and Blaise (2004) reported an increase in vitellogenin-like protein levels in female brine shrimps (*Artemia franciscana*) exposed to municipal effluent extracts. Conversely, data related to WTP effluent impacts on male crustacean reproduction are nearly non-existent.

In this study, we recorded no effect of WTP effluents on male GfVtg expression during the two *in situ* bioassay campaigns. These results are coherent with those of Gross et al. (2001) who observed no histological abnormality of testis in male *Gammarus pulex* collected downstream. Jungmann et al. (2004) also showed no influence of WTP effluent on intersex occurrence in *Gammarus fossarum*. Nevertheless, we observed that the mean GfVtg mRNA level of males exposed upstream from discharge of the Bourgoin-Jallieu WTP effluent (*i.e.* Station B1) in June 2007 was 15-fold higher than those recorded for other stations. As previously (see section 4.2), this difference was not significant, because only certain gammarids had abnormally high GfVtg mRNA levels. It can be concluded that some natural factors or anthropogenic factors present in water are responsible for the Vtg induction in male *G. fossarum*. However, despite the proximity between Stations B1 and B3, only Station B1 gammarids showed high GfVtg gene expression, perhaps explained by the fact that station B3 is influenced by WTP drainage canal discharge, which certainly causes changes in water physico-chemical parameters.

5. Conclusion

The levels of basic expression of the Vgt gene measured at individuals controls allowed on one hand to verify the feature of the gene, very weakly expressed to the male and showing marked modulations which suit to the phenomena of vitellogenesis (previously described) to females. On the other hand, it allowed to define the maximum levels and the minimum of expression to the female to be able to compare them afterward with possible inductions to contaminated males. These results show that the interpretation of the synthesis of Vtg to females requires mastery and a sharp knowledge of their cycle of reproduction if we want to be able to discriminate between the natural variability of this answer of the potential impact of an ED.

Gammarid exposure of under laboratory controlled conditions showed that vertebrateknown-ED (*i.e.* estrogenic and anti-androgenic compounds) can induce the Vtg gene expression in males. These works so supply indications on the interest to develop the measure of the Vtg gene expression in male crustaceans. However, the variability observed in the exposed organisms implies to revise the employed methodology, in particular in increasing the number of replicates by condition. In the same way, future works are necessary to estimate the impact of confounding factors which can influence (i) on the basal level of Vtg gene expression in untreated males and (ii) on the sensibility of impacted ones.

Finally, the first *in situ* applications of the measure of male Vtg gene expression showed the presence of compounds able to induce endocrine disturbances in crustaceans, in the waste water of Bourbre River and that their presence is not closed to the of water-treatment plant discharges.

Acknowledgements

The authors wish to thank the French National Research Programs PNRPE (SURVAQUA; Convention n° CV05000088), ECCO (Convention no. 06CV050) and ECOGER (Convention no. 20-2006), the 'Rhône-Méditerranée-Corse' water agency, the Cluster Environnement Région Rhône-Alpes and the GIS Environalp for partial financial support. B. George and C. Moulin are acknowledged for their technical assistance. The authors also wish to thank the two anonymous reviewers for providing very helpful comments on the manuscript.

References

- Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994. Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment - I. Occurrence and transformation in sewage treatment. Water Res. 28, 1131-1142.
- 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.
- Besse, J.-P., Garric, J., in submission. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. Environ. Pollut.
- Billinghurst, Z., Clare, A.S., Depledge, M.H., 2001. Effects of 4-n-nonylphenol and 17[beta]oestradiol on early development of the barnacle *Elminius modestus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 257, 255-268.

- Billinghurst, Z., Clare, A.S., Matsumura, K., Depledge, M.H., 2000. Induction of cypris major protein in barnacle larvae by exposure to 4-n-nonylphenol and 17[beta]-oestradiol. Aquat. Toxicol. 47, 203-212.
- Blackburn, M.A., Waldock, M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. Water Res. 29, 1623-1629.
- Blanchet-Tournier, M.-F., 1980. Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarelus* (PALLAS) : Controles endocries et interactions. Sciences Naturelles. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Paris, p. 175.
- Brown, R.J., Conradi, M., Depledge, M.H., 1999. Long-term exposure to 4-nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas, 1766). Sci. Total Environ. 233, 77-88.
- Charniaux-Cotton, H., 1954. Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primères et secondères mâles. C.R. Acad. Sc. Paris 239, 780-782.
- Charniaux-Cotton, H., 1973. Description et contrôle de l'ovogénèse chez les Crustacés supérieurs. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophysiol. 13, 21-30.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S., Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ. Health Persp. 101, 11-55.
- 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. Institute for Laboratory Animal Research Journal 45, 484-493.
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M.J., 1998. Identification of oestrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. Environ. Sci. Technol. 32, 1549-1558.
- Ford, A.T., 2008. Can you feminise a crustacean? Aquat. Toxicol. 88, 316-321.
- 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.
- Friberg, N., Andersen, T.H., Hansen, H.O., Iversen, T.M., Jacobsen, D., Krojgaard, L., Larsen, S.E., 1994. The effect brown trout (*Salmo trutta* L.) on stream invertebrate drift, with specieal reference to *Gammarus pulex* (L.). Hydrobiologia 294, 105-110.
- Gagné, F., Blaise, C., 2004. Shell protein characteristics and vitellogenin-like proteins in brine shrimp *Artemia franciscana* exposed to municipal effluent and 20-hydroxyecdysone. Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol. 138, 515-522.
- 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. Environ. Res. 98, 89-99.
- García-Reyero, N., Raldúa, D., Quirós, L., Llaveria, G., Cerdà, J., Barceló, D., Grimalt, J.O., Piña, B., 2004. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. Analytical and Bioanalytical Chemistry 378, 670-675.
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., in submission. *Gammarus fossarum* as a freshwater organism test for evaluation of reprotoxic chemicals. Aquat. Toxicol.
- Ghekiere, A., Verslycke, T., Fockedey, N., Janssen, C.R., 2006a. Non-target effects of the insecticide methoprene on molting in the estuarine crustacean Neomysis integer (Crustacea: Mysidacea). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. In Press, Corrected Proof.
- Ghekiere, A., Verslycke, T., Janssen, C., 2006b. Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid Neomysis integer. Gen. Comp. Endocrinol. 147, 190.
- Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morritt, 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.

- 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., Chen, H.C., 2004. Effects of chlordane and lindane on testosterone and vitellogenin levels in green neon shrimp (*Neocaridina denticulata*). Int. J. Toxicol. 23, 91-95.
- 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. Part A 301A, 334-343.
- Jayasankar, V., Tsutsui, N., Jasmani, S., Saido-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.
- Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K.-U., Petzsch, P., Nagel, R., 2004. Intersexuality in *Gammarus fossarum* KOCH a common inducible phenomenon? Arch. Hydrobiol. 159, 511-529.
- 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.
- Langston, W.J., Burt, G.R., Chesman, B.S., Vane, C.H., 2005. Partioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in aquatic environment. J. Mar. Biol. Ass. U.K. 85, 1-31.
- Larkin, P., Knoebl, I., Denslow, N.D., 2003. Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. Comp. Biochem. Physiol. B 136, 149-161.
- LeBlanc, G.A., 2007. Crustacean endocrine toxicology: a review. Ecotoxicology 16, 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., Matsumura, F., 1999. The endocrinology of invertebrates. In: deFur, P., Crane, M., Ingersoll, C., Tattersfield, L. (Eds.). Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment. SETAC Press, Pensacola, pp. 23–106.
- Lee, F.Y., Chang, C.F., 1997. The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology 117, 433-439.
- Lee, K.-W., Hwang, D.-S., Rhee, J.-S., Ki, J.-S., Park, H.G., J.-C., R., Raisuddin, S., Lee, J.-S., 2008. Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene fron the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. B 150, 395-402.
- Linton, S., Barrow, L., Davies, C., Harman, L., Potential endocrine disruption of ovary synthesis in the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis* by the insecticide pyriproxyfen. Comp. Biochem. Physiol. A In Press, Uncorrected Proof.
- 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.
- 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.
- Maltby, L., Naylor, C., Calow, P., 1990. Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. Ecotox. Environ. Safe. 19, 292-300.
- Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M., Sonnenschein, C., 2003. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. J. Ster. Biochem. 83, 235-244.
- Martin-Diaz, M., Sales, D., 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. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 73, 870-877.
- 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. Environ. Int. 34, 531-545.
- Matthiessen, P., 2003. Endocrine disruption in marine fish. Pure. Appl. Chem. 75, 2249-2261.

- Mazurová, E., Hilscherová, K., Triebskorn, R., Köhler, H.-R., Maršálek, B., Bláha, L., 2008. Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans: Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants. Biologia 63, 139-150.
- 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. Sc. Paris 279, 587-590.
- 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.
- Nagabushanam, R., Kulkarni, G.K., 1981. Effect of exogenous testosterone on the androgenic gland and testis of a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). Aquaculture 23, 19-27.
- Naylor, C.G., 1995. Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. Text. Chem. Color. 27.
- Oberdorster, 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 lipovitellin in Crustacea. Comp. Biochem. Physiol. C 127, 199-207.
- Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., Kwang, W.J., 2004. Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. International Review of Cytology. Academic Press, pp. 1-44.
- Okumura, T., Aida, K., 2000a. 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., Aida, K., 2000b. Hemolymph vitellogenin levels and ovarian development during the reproductive and non reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. Fish. Sci. 66, 678-685.
- Okumura, T., Yamano, K., Sakiyama, K., 2007. Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation, and oviposition in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. Comp. Biochem. Physiol. A 147, 1028-1037.
- Olmstead, A.W., LeBlanc, G.L., 2001. Low exposure concentration effects of methoprene on endocrine-regulated processes in the Crustacean *Daphnia magna*. Toxicol. Sci. 62, 268-273.
- Poynton, H.C., Varshavsky, J.R., Chang, B., Cavigiolio, 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.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., Marin, M.G., 2008. Effects of 4-nonylphenol exposure in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and crabs (*Carcinus aestuarii*) with particular emphasis on vitellogenin induction. Mar. Pollut. Bull. 57, 365-372.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 2000. Crustaceans as Bioindicators. In: Gerhardt, A. (Ed.). Biomonitoring of polluted warter - Reviews on actual topics, environmental research forum. Trans Tech Publications - Scitech Publications, Zürich, pp. 161-194.
- Sagi, A., Khalaila, I., Abdu, U., Shoukrun, R., Weil, S., 1999. A newly established ELISA showing the effect of androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. Gen. Comp. Endocrinol. 115, 37-45.
- Sanders, M.B., Billinghurst, Z., Depledge, M.H., Clare, A.S., 2005. Larval development and vitellinlike protein expression in *Palaemon elegans* larvae following xeno-oestrogen exposure. Integr. Comp. Biol. 45, 51-60.
- Sarojini, S., 1963. Comparison of the effects of androgenic hormone and testosterone propionate on the female ocypod crab. Current Science 32, 411-412.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K.U., Nagel, R., Kohler, H.R., Triebskorn, R., 2006. Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). Ecotoxicology 15, 143-156.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebskorn, R., Köhler, H.-R., 2005. Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal

variability, and spatial aspects on natural populations. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 49, 53-61.

- 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., Aflalo, 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.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environ. Int. 34, 1033-1049.
- Subramoniam, T., 2000. Crustacean ecdysteriods in reproduction and embryogenesis. Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol. 125, 135-156.
- 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.
- Tahara, D., Suitoh, K., Hattori, H., 2005. Hemolymph vitellogenin levels during final maturation and post-spawning in the female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture 245, 311-319.
- 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., Hui, J.H.L., Mak, A.S.C., He, J.G., Chan, S.M., 2006. Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Aquaculture 254, 666-674.
- Vandenbergh, G.F., Adriaens, D., Verslycke, T., Janssen, C.R., 2003. Effects of 17[alpha]ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. Ecotox. Environ. Safe. 54, 216-222.
- Volz, D.C., Chandler, G.T., 2004. An enzyme-linked immunosobent assay for lipovitellin quantification in Copepods: A screening tool for endocrine toxicity. Environ. Toxicol. Chem. 23, 298-305.
- Volz, D.C., Wirth, E.F., Fulton, M.H., Scott, G.I., Strozier, E., Block, D.S., Ferry, J.L., Walse, S.S., Chandler, G.T., 2003. Effects of fipronil and chlorpyrifos on endocrine-related endpoints in female grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 497-503.
- 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.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. Freshwater Biol. 9, 263–285.
- Wollenberger, L., Kusk, K.O., 2006. Gonad histology of copepods exposed to (anti)androgens. Poster presented at: *Controversies and solutions in environmental sciences*; 16th annual meeting of the SETAC Europe. SETAC, The Hague (Netherlands), 7-11 May 2006, p. 227.
- Wouters, R., Piguave, X., Bastidas, L., Calderon, J., 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. Aquac. Res. 32, 573-582.
- 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.

Table contents

Table 1: Value distributions of Vtg gene expression from male *G. fossarum* exposed for 4 days to 1 000 μ g.L⁻¹ of cyproterone acetate and from those exposed for 16 days to 0.05 μ g.L⁻¹ of nonylphenol, and comparison with the values of respective solvent control. Data are expressed in *c*DNA copy number quantified by real-time PCR following RT of *m*RNAs contained in 1 μ g of total RNAs. CP: cyproterone acetate; NP: nonylphenol.

	Vtg gene after	expression 4 days	Vtg gene expression after 16 days		
	Solvent control	1 000 µg.L ⁻¹ of CP	Solvent control	$0.05 \ \mu g.L^{-1} \ of \ NP$	
	1 689.7	27 781.4	0.6	38 445.6	
	4 094.4	616.8	2 727.9	1 704.4	
	3 080.6	23 493.4	1 218.5	13 140.8	
	308.6	3 165.8	3 058.3	10 202.2	
	4 750.2	1 625.9	136.8	2 590.8	
Mean	2 784.7	11 336.7	1 428.4	13 216.8	
SEM	806.1	5 891.5	711.3	6 674.7	

Figure list



- Figure 1: French sites studied showing a part of Rhône River basin and station B4 (A), stations S1–S3 situated close to the Fontaine-sur-Saône WTP (B), and stations B1–B3 situated close to the Bourgoin-Jallieu WTP.
- (•): cities; (•): studied station locations; (\blacktriangle): SWTP location.



Figure 2: Gammarus fossarum Vtg gene expression levels measured in males (\Diamond) and through the reproductive-moult cycle of sexually active females (\heartsuit A-D2). A-D2 corresponds to the six moult stages characterized in *G. fossarum* (Geffard et al., in submission). Data are reported as mean \pm SEM number of *c*DNA copies quantified by real-time PCR following RT of *m*RNAs contained in 1 µg of total RNAs (n = 20 for males and 10 for the different female groups). Similar letters indicate no significant difference between data bars (p > 0.05).



Figure 3: *Vtg* gene expression screening in pooled *total*-RNA of male *G. fossarum* exposed to different concentrations of nonylphenol (**A**) and cyproterone acetate (**B**) for 2, 4, 8 and 16 days. Data are reported as a single value of *c*DNA copy number quantified by real-time PCR following RT of *m*RNAs contained in 1 μ g of pooled total RNAs. SCF: solvent-free control; SC: solvent control.

The arrows point to the experimental groups for which Vtg gene expression was secondarily measured from individually extracted total RNAs: (1) Vtg gene expression in gammarids of solvent-free and solvent control groups at different exposure times, (2) comparison of Vtg gene expression of solvent control and treatment with 0.05 µg.L⁻¹ of nonylphenol after a 16-day exposure period, and (3) comparison of Vtg gene expression of solvent control and treatment with 1 000 µg.L⁻¹ of cyproterone acetate after a 4-day exposure period.



Figure 4: *Vtg* gene expression in male *G. fossarum* maintained in solvent-free control (SFC) and solvent control (SC) conditions for 2, 4, and 16 days. Data are reported as mean \pm SEM of *c*DNA copy numbers quantified by real-time PCR following RT of *m*RNAs contained in 1 µg of total RNAs (*n* = 5). * Indicates significant differences (*p* < 0.05).



Figure 5: *Vtg* gene expression in male *G. fossarum* transplanted for 21 days at different stations close to water treatment plants at (A) Bourgoins-Jallieu in June 2007, and (B) Fontaine-sur-Saône in November 2007. Data are reported as mean \pm SEM of *c*DNA copy number quantified by real-time PCR following RT of *m*RNAs contained in 1 µg of *total*-RNAs (n = 5 and n = 10 for graph A and B, respectively).
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

Un des objectifs de cette thèse était de développer une méthodologie autour du dosage de l'activité des cholinestérases (ChE) chez *Gammarus fossarum* afin de proposer un biomarqueur d'exposition et d'effet de substances neurotoxiques suffisamment simple et robuste pour être appliqué et interprété de manière fiable dans le cadre d'études de biosurveillance de la qualité des eaux courantes.

La caractérisation biochimique et pharmacologique a montré que *G. fossarum* possède une seule isoforme de ChE présentant les propriétés d'une acétylcholinestérase (AChE) de vertébrés. D'importantes inhibitions d'activité ont été constatées chez des individus exposés *in vivo* à des concentrations d'organophosphoré environnementalement réalistes, soulignant ainsi l'intérêt d'utiliser *G. fossarum* comme organisme-test pour évaluer la présence et les effets de composés anti-ChE.

D'un point de vue méthodologique, la conservation des gammares à -80 °C permet le maintien de l'activité AChE et assure une bonne reproductibilité des mesures même après plusieurs mois de stockage. En revanche, la normalisation des valeurs d'activité enzymatique par la quantité de protéines contenues dans les extraits représente une source d'erreur qui peut conduire à une sur- ou sous-estimation des résultats. Il est donc préférable, dans le cadre d'opérations visant à évaluer la qualité du milieu, d'exprimer l'activité AChE en nmol.min⁻¹, à condition que la procédure d'extraction ait été clairement définie et scrupuleusement respectée. Les facteurs biotiques (i.e. taille et statut reproducteur) ont été montrés comme la principale source de variabilité naturelle, la saison et les principaux facteurs physicochimiques de l'eau (i.e. température, pH, conductivité) n'ayant aucune influence sur le niveau de base de l'activité AChE de G. fossarum. De ce fait, la sélection d'organismes de phénotype mâle avec un poids compris entre 15 et 20 mg (i.e. gammares standard) permet d'allier à la fois une procédure de prélèvement simple et rapide, et une méthodologie de dosage fiable et robuste pour la mesure de cette activité. Dans une perspective d'application in situ, des valeurs références de l'activité de base (i.e. une valeur moyenne ainsi qu'un seuil minimum en-dessous duquel une inhibition pourrait être attribuée à l'exposition à un composé anti-ChE) ont été définies pour cette catégorie d'organismes.

L'inhibition de l'activité AChE chez *G. fossarum* peut être interprétée non seulement comme un marqueur d'exposition mais également comme un marqueur d'effet sur le comportement. Des relations quantitatives ont été établies entre l'inhibition de l'AChE et des altérations du comportement alimentaire et locomoteur chez cette espèce. Les effets délétères sont observés au-delà de 50 % d'inhibition d'AChE, le taux d'alimentation se révélant être un

paramètre comportemental beaucoup plus sensible vis-à-vis d'une inhibition que ne l'est la locomotion. En revanche, ces travaux montre clairement que l'inhibition de l'activité AChE ne permet pas de prédire les effets à cours terme sur la survie *G. fossarum*.

Enfin, l'utilisation couplée de tests *in situ* et de la mesure d'activité AChE s'est révélée être un outil pertinent pour l'évaluation de la qualité des milieux. Aucun impact délétère sur l'activité AChE n'a été observé au cours des campagnes *in situ* menées sur les différents rejets de stations d'épuration et miniers, confirmant que les composés associés à ces pollutions n'ont pas ou peu d'activité anti-ChE. En revanche, des inhibitions de l'ordre de 20 % (*i.e.* sans conséquences pour le comportement alimentaire et locomoteur) ont été observées sur des stations de la Bourbre (Stations B2 et B3 ; Bourgoin, juin 2007) prises comme référence mais localisées à proximité de zones agricoles. Ces résultats illustrent donc l'intérêt et le pouvoir de disposer de valeurs seuils afin de s'affranchir d'un schéma classique de comparaison entre stations de référence et sites potentiellement impactés.

A ce stade de développement, la méthodologie développée autour du dosage de l'activité AChE de *G. fossarum* peut être recommandée pour les études de bio-surveillance sur la qualité des eaux courantes. Toutefois, cette méthodologie est centrée sur une catégorie standard d'organismes. Une des principales perspectives de ces travaux de recherche serait d'évaluer la représentativité de "l'organisme standard" définie dans cette étude par rapport à d'autres catégorie d'individus constituant les populations de gammares (*e.g.* les juvéniles et les femelles). Cela consisterait notamment à comparer pour ces classes d'organismes (*i*) la sensibilité vis-à-vis de différents composés et (*ii*) les relations entre l'inhibition de l'activité AChE et les effets sur le comportement. De même, il pourrait être intéressant, afin d'améliorer l'interprétation de la mesure d'AChE comme marqueur d'effets, d'élargir l'étude des relations entre l'inhibition de cette activité et les effets délétères sur d'autres réponses comportementales telles que l'esquive en présence de prédateurs ou la recherche du partenaire pour l'accouplement. Enfin, il est nécessaire de poursuivre l'application *in situ* afin de bénéficier du retour sur expériences.

Le second objectif de la thèse était de développer, chez *Gammarus fossarum*, des outils pertinents permettant de diagnostiquer une perturbation endocrinienne en lien avec la reproduction.

Dans un premier temps, les principaux processus physiologiques en lien avec le cycle de reproduction des femelles (*i.e.* cycle de mue, croissance des ovocytes et développement embryonnaire) ont été décrits de manière détaillée.

Cette description a fourni les bases pour la mise au point d'un bioessai de reprotoxicité permettant de contrôler simultanément le déroulement du cycle de mue, la maturation ovarienne, le développement embryonnaire et le taux d'alimentation. La faible variabilité des valeurs de base observée chez les individus non stressés montre l'exactitude et la répétabilité de la méthode développée. Des valeurs de référence préliminaires ont d'ailleurs été proposées pour chacune des réponses étudiées et pourront servir de contrôle de qualité pour les futurs travaux. Comparé aux méthodologies disponibles chez d'autres espèces de crustacés, ce nouveau test de reprotoxicité permet d'avoir une évaluation spécifique de l'impact des contaminants sur les différents processus physiologiques reliés au succès reproducteur de l'organisme.

En parallèle, nous avons mis au point la mesure de l'expression du gène de la vitellogénine (Vtg) et évalué son potentiel comme biomarqueur d'exposition spécifique à des perturbateurs endocriniens chez les mâles. Les niveaux d'expression de base mesurés chez des individus témoins concordent avec la fonctionnalité du gène. En effet, le gène de la Vtg s'exprime très faiblement chez le mâle en comparaison aux femelles qui présentent une augmentation marquée du niveau d'expression coïncidant avec les phénomènes de vitellogénèse observés au cours du cycle (*e.g.* accumulation de réserves dans les ovocytes associée à une forte croissance). L'exposition de gammares à des molécules modèles en laboratoire a montré que l'expression du gène de la Vtg peut-être chimiquement induite chez les mâles ce qui implique une perturbations *in situ*, aucun impact des rejets de station d'épuration sur l'expression du gène de la Vtg chez les gammares mâles n'a été enregistré. En revanche, une induction a été observée sur une station de la Bourbre (Station B2 ; Bourgoin, juin 2007) prise comme référence. Ces résultats suggèrent la présence sur cette station de composés capables d'induire des perturbations endocriniennes chez les crustacés.

A l'heure actuelle, bien que présentant un intérêt certains, les outils développés au cours de ces travaux nécessitent d'être perfectionnés. Par exemple, une meilleure compréhension des interactions qui relient le cycle de mue et la vitellogénèse chez les femelles, permettrait d'améliorer l'interprétation du test de reprotoxicité développé. Il pourrait être envisagé à ce titre d'effectuer des essais avec des hormones ou des mimétiques hormonaux spécifiques des crustacés. L'interprétation de la mesure d'expression du gène de la Vtg chez les gammares mâles est également limitée. Les variations du niveau d'expression observées chez des organismes saints soulignent la nécessité d'identifier les facteurs susceptibles de moduler cette expression en absence de toxiques. Il apparait également nécessaire de réviser la méthodologie afin de pallier aux problèmes d'interprétation liés à la variabilité de réponse interindividuelle chez les organismes exposés. Le nombre de réplicats utilisés par condition doit être revu à la hausse. Enfin, des valeurs de références doivent être définies (dans le cas de mesure de Vtg) ou validées (dans les cas des paramètres mesurés dans le cadre du bioessais) afin de fournir une interprétation fiable de ces outils lors d'une application en milieux naturels.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

- ABDU, U., DAVIS, C., KHALAILA, I. & 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*, 263-272.
- AHEL, M., GIGER, W. & KOCH, M. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment I. Occurrence and transformation in sewage treatment. *Water Research*, 28, 1131-1142.
- AIT ALLA, A., MOUNEYRAC, C., DUROU, C., MOUKRIM, A. & PELLERIN, J. (2006). Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 143*, 23-29.
- ALCARO, S., ARCONE, R., VECCHIO, I., ORTUSO, F., GALLELLI, A., PASCERI, R., PROCOPIO, A. & IANNONE, M. (2007). Molecular modelling and enzymatic studies of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase recognition with paraquat and related compounds. *SAR and QSAR in Environmental Research*, *18*, 595-602.
- ALDRIDGE, W.N. (1953). Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochemical Journal*, 53, 117-124.
- ALLEN, Y., MATTHIESSEN, P., SCOTT, A.P., HAWORTH, S., FEIST, S. & 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*, 5-20.
- AMYOT, M., PINEL-ALLOUL, B. & CAMPBELL, P. (1994). Abiotic and seasonal factors influencing trace metal levels (Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) in the freshwater amphipod *Gammarus fasciatus* in two fluvial lakes of the St Lawrence river. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 2003-2016.
- ANDERSEN, H.R., HALLING-SØRENSEN, B. & KUSK, K.O. (1999). A parameter for detecting estrogenic exposure in the copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology And Environmental, Safety, 44*, 56-61.
- ANDERSEN, H.R., WOLLENBERGER, L., HALLING-SØRENSEN, 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.
- ASHAUER, R., BOXALL, A. & BROWN, C. (2006). Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *51*, 542-548.
- AUTTARAT, J., PHIRIYANGKUL, P. & UTARABHAND, P. (2006). Characterization of vitellin from the ovaries of the banana shrimp *Litopenaeus merguiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 143*, 27-36.

- AVARRE, J.C., MICHELIS, R., TIETZ, A. & 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, 355-364.
- AYAKI, T., KAWAUCHINO, Y., NISHIMURA, C., ISHIBASHI, H. & ARIZONO, K. (2005). Sexual disruption in the freshwater crab (*Geothelphusa dehaani*). *Integrative and Comparative Biology*, 45, 39-42.
- **BADIOU, A. & BELZUNCES, L.P. (2008)**. Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids ? A study case with deltamethrin. *Chemico-Biological Interactions, 175*, 406-409.
- **BAER, K.N. & 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, 66*, 214-221.
- BAIRD, D.J., BROWN, S.S., LAGADIC, L., LIESS, M., MALTBY, L., MOREIRA-SANTOS, M., SCHULZ, R. & SCOTT, G.I. (2007). In situ-based effects measures: Determining the ecological relevance of measured responses. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 3, 259-267.
- BALDWIN, W.S., BAILEY, R., LONG, K.E. & KLAINE, S. (2001). Incomplete ecdysis is an indicator of ecdysteroid exposure in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1564-1569.
- BALDWIN, W.S., GRAHAM, S.E., SHEA, D. & LEBLANC, G.A. (1997). Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 1905-1911.
- 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. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 945-952.
- BARATA, C., DAMASIO, J., LOPEZ, M.A., KUSTER, M., DE ALDA, M.L., BARCELO, D., RIVA, M.C. & RALDUA, D. (2007). Combined use of biomarkers and in situ bioassays in *Daphnia magna* to monitor environmental hazards of pesticides in the field. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 370-379.
- BARKI, A., KARPLUS, I., MANOR, R. & SAGI, A. (2006). Intersexuality and behavior in crayfish: The de-masculinization effects of androgenic gland ablation. *Hormones And Behavior*, 50, 322-331.
- **BARNARD, J.L. & BARNARD, C.M. (1983)**. Freshwater Amphipoda of the world- I. Evolutionary patterns. Virginia: Hayfield associates (ed.), 357 p. pp.

- BASLOW, M.H. & NIGRELLI, R.F. (1964). The effect of thermal acclimation on brain cholinesterase activity of the killifsh, *Fundulus heteroclitus*. *Zoologica*, 49, 41-51.
- **BEAUVAIS, S.L., JONES, S.B., BREWER, S.K. & LITTLE, E.E. (2000)**. Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 1875-1880.
- **BEJARANO, A.C. & CHANDLER, G.T. (2003)**. Reproductive and developmental effects of atrazine on the estuarine meiobenthic copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Environmental Toxicology and Chemistry, 22*, 3009-3016.
- **BESSE, J.-P. & GARRIC, J. (in submission)**. Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environmental Pollution*.
- BILLINGHURST, Z., CLARE, A.S. & DEPLEDGE, M.H. (2001). Effects of 4-nnonylphenol and 17[beta]-oestradiol on early development of the barnacle *Elminius modestus*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 257, 255-268.
- BILLINGHURST, Z., CLARE, A.S., MATSUMURA, K. & 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, 203-212.
- BLACKBURN, M.A. & WALDOCK, M.J. (1995). Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*, 29, 1623-1629.
- BLANCHET-TOURNIER, M.-F. (1980). Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode Orchestia gammarelus (PALLAS) : Controles endocries et interactions. Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), Paris, 175 pp.
- **BLOCKWELL, S.J., MAUND, S.J. & PASCOE, D. (1999)**. Effects of the organochlorine insecticide lindane (γ-C6H6Cl6) on the population responses of the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *18*, 1264-1269.
- BLOCKWELL, S.J., PASCOE, D. & TAYLOR, E.J. (1996a). Effects of lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L). *Chemosphere*, *32*, 1795-1803.
- BLOCKWELL, S.J., TAYLOR, E.J., JONES, I. & PASCOE, D. (1998). The influence of freshwater polluants and interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Amphipoda). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 34, 41-47.
- BLOCKWELL, S.J., TAYLOR, E.J., PHILLIPS, D.R., TURNER, M. & 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. & 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*, 22-27.
- BOCCHETTI, R., VIRNO LAMBERTI, C., PISANELLI, B., RAZZETTI, E.M., MAGGI, C., CATALANO, B., SESTA, G., MARTUCCIO, G., GABELLINI, M. & REGOLI, F. (2008). Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus* galloprovincialis, from Adriatic sea. *Marine Environmental Research*, 66, 24-26.
- **BOCQUENÉ, G. (1996)**. L'acétylcholinestérase, marqueur de neurotoxicité. Application à la surveillance des effets biologiques des polluants chez les organismes marins. Ecole Pratique des Hautes Etude, 250 pp.
- **BOCQUENÉ, G. (1997)**. Cholinesterase activity in the common scallop and the queen scallop from the Bay of Brest (France): a tool for the detection of effects of organophosphorous and carbamate insecticides. *Annales de l'Institut Oceanographique*, 73, 59-68.
- **BOCQUENÉ, G. & GALGANI, F. (1998)**. Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences, 22*, 1-12.
- BOCQUENE, G., GALGANI, F. & TRUQUET, P. (1990). Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 30, 75-89.
- **BOCQUENÉ, G., ROIG, A. & FOURNIER, D. (1997)**. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*) Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. *FEBS Letters, 407, 261-266.*
- **BONACCI, S., CORSI, I. & FOCARDI, S. (2008)**. Cholinesterase activities in the scallop *Pecten jacobaeus*: Characterization and effects of exposure to aquatic contaminants. *Science of the Total Environment, 392*, 99-109.
- **BORLAKOGLU, J.-T. & 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*, 258-265.
- BRAUN, G. & MULLONEY, B. (1994). Acetylcholinesterase activity in neurons of crayfish abdominal ganglia. *The Journal of Comparative Neurology*, 350, 272-280.
- **BREITHOLTZ, M. & BENGTSSON, B.E. (2001)**. Oestrogens have no hormonal effect on the development and reproduction of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Marine Pollution Bulletin, 42*, 879-886.
- **BREITHOLTZ, M. & WOLLENBERGER, L. (2003)**. Effects of three PBDEs on development, reproduction and population growth rate of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes. Aquatic Toxicology, 64,* 85-96.

- BREITHOLTZ, M., WOLLENBERGER, L. & DINAN, L. (2003). Effects of four synthetic musks on the life cycle of the harpacticoid copepod *Nitocra spinipes*. *Aquatic Toxicology*, 63, 103-118.
- BROOKS, S. & MILLS, L. (2003). The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology, 135, 527-537.
- BROWN, R.J., CONRADI, M. & DEPLEDGE, M.H. (1999). Long-term exposure to 4nonylphenol affects sexual differentiation and growth of the amphipod *Corophium volutator* (Pallas,1766). *Science of the Total Environment, 233*, 77-88.
- BROWN, R.J., GALLOWAY, T.S., LOWE, D., BROWNE, M.A., DISSANAYAKE, A., JONES, M.B. & DEPLEDGE, M.H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66, 267-278.
- BROWN, R.J., RUNDLE, S.D., HUTCHINSON, T.H., WILLIAMS, T.D. & JONES, M.B. (2003). A copepod lifecycle test and growth model for interpreting the effects of lindane. *Aquatic Toxicology* 63, 1-11.
- **BUCHWALTER, D.B., SANDAHL, J.F., JENKINS, J.J. & CURTIS, L.R. (2004)**. Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in determining the differential toxicity of chlorpyrifos to second to fourth instar *Chironomous riparius* (Meigen). *Aquatic Toxicology, 66*, 149-157.
- BURGEOT, T., BOCQUENE, G., PORTE, C., DIMEET, J. & SANTELLA, R.M. (1996). Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean sea. *Marine Ecology-Progress Series*, 131, 125-141.
- BURTON, G.A. (1992). Sediment toxicity assessment: Lewis Publishers, 211 pp.
- BYARD, E.H. (1975). The female specific protein and reproduction in the lobster, Homarus americanus. University of Western Ontario, London, Ontario
- CAILLEAUD, K., MAILLET, G., BUDZINSKI, H., SOUISSI, S. & FORGET-LERAY, J. (2007). Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative Biochemistry* and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 147, 841-849.
- CAMPBELL, C.M. & IDLER, D.R. (1980). Characterization of an estradiol-induced protein from rainbow trout serum as vitellogenin by the composition and radioimmunological cross reactivity to ovarian yolk fractions. *Biological Reproduction, 22*, 605-617.
- CARY, T.L., CHANDLER, G.T., VOLZ, D.C., WALSE, S.S. & FERRY, J.L. (2004). Phenylpyrazole insecticide fipronil induces male infertility in the estuarine meiobenthic crustacean *Amphiascus tenuiremis*. *Environmental Science and Technology* 38, 522-528.

- CASIOT, C., EGAL, M., ELBAZ-POULICHET, F., BRUNEEL, O., BANCON-MONTIGNY, C., CORDIER, M.-A., GOMEZ, E. & ALIAUME, C. (2009). Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France) ; preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). . *Applied Geochemistry*, 24, 787-799.
- CASTRO, B.B., SOBRAL, O., GUILHERMINO, L. & RIBEIRO, R. (2004). An *in situ* bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology*, 13, 667-681.
- CELESTIAL, D.M. & MCKENNEY, C.L. (1994). The influence of an insect growthregulator on the larval development of the mud crab *Rhithropanopeus harrisii*. *Environmental Pollution 85*, 169-173.
- CHANDLER, G.T., CARY, T.L., VOLZ, D.C., WALSE, S.S., FERRY, J.L. & 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, 117-124.
- CHARNIAUX-COTTON, H. (1954a). Découverte chez un Crustacé Amphipode (*Orchestia gammarella*) d'une glande endocrine responsable de la différenciation des caractères sexuels primères et secondères mâles. *Compte Rendu de l'Académie des Science de Paris, 239*, 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. (1957). Croissance, régénération et déterminisme endocrinien des caractères sexuels d'Orchestia gammarella (Pallas) Crustacé Amphipode. Annales des sciences Naturelles, Zoologie, 11, 411-559.
- CHARNIAUX-COTTON, H. (1965). Hormonal control of sex differentiation in invertebrates. In R. L. Dehaan & H. Ursprung (Eds.), *Organogenesis* (pp. 701-740). New York: Holt, Rinehart, and Winston.
- CHARNIAUX-COTTON, H. (1973). Description et contrôle de l'ovogénèse chez les Crustacés supérieurs. Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysiologie, 13, 21-30.
- CHARNIAUX-COTTON, H. & PAYEN, G. (1988). Crustacean reproduction. In H. Laufer & R. G. H. Downer (Eds.), *Endocrinologie of selected invertebrate types* (Vol. 2, pp. 279-303). New York: Liss, A.R. .

- CHEVREUX, E. & FAGE, L. (1970). Faune de France, Tome 9 : Amphipodes. Nendeln (Liechtenstein), 488 pp.
- CHU, K.H., WONG, C.K. & 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, 173-178.
- CLARE, A.S., RITTSCHOF, D. & COSTLOW, J.D. (1992). Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH-5849 on larval crustaceans. *Journal of Experimental Zoology*, 262, 436-440.
- CLÉMENT, C.Y., BRADBROOK, D.A., LAFONT, R. & DINAN, L. (1993). Assessment of a microplate-based bioassay for the detection of ecdysteroid-like or antiecdysteroid activities. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 23, 187-193.
- COLBORN, T., VOM SAAL, F.S. & SOTO, A.M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101, 11-55.
- COLD, A. & FORBES, V.E. (2004). Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. Aquatic Toxicology, 67, 287-299.
- COOKE, I.M. & SULLIVAN, R.E. (1982). Hormones and neurosecretion. In H. Atwood & D. Sandeman (Eds.), *The Biology of Crustacea* (Vol. 3, pp. 206-291). New York: Academic Press.
- COOPER, N.L. & BIDWELL, J.R. (2006). Cholinesterase inhibition and impacts on behavior of the Asian clam, *Corbicula fluminea*, after exposure to an organophosphate insecticide. *Aquatic Toxicology*, *76*, 258-267.
- 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. & VAN DEN BELT, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253-260.
- CRANE, M., ATTWOOD, C., SHEAHAN, D. & MORRIS, S. (1999). Toxicity and bioaivalability of the organophosphorus insecticide pirimiphos methyl to the frechwater ampipod *Gammarus pulex* L. in laboratory and mesocosm systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1456-1461.
- CRANE, M., DELANEY, P., WATSON, S., PARKER, P. & WALKER, C. (1995). The effect of malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) below wetercress beds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14, 1181-1188.
- CRIPE, G.M., MCKENNEY, C.L., HOGLUND, M.D. & HARRIS, P.S. (2003). Effects of fenoxycarb exposure on complete larval development of the xanthid crab, *Rhithropanopeus harrisii. Environmental Pollution, 125*, 295-299.

- CUNHA, I., GARCÍA, L.M. & GUILHERMINO, L. (2005). Sea-urchin (*Paracentrotus lividus*) glutathione S-transferases and cholinesterase activities as biomarkers of environmental contamination. *Journal of Environmental Monitoring*, 7, 288-294.
- CUNHA, I., MANGAS-RAMIREZ, E. & GUILHERMINO, L. (2007). Effects of copper and cadmium on cholinesterase and glutathione S-transferase activities of two marine gastropods (*Monodonta lineata* and *Nucella lapillus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 145, 648-657.
- **DAVIDSON, G.W., WILKENS, J.L. & LOVELL, P. (1998)**. Neural control of the lateral abdominal arterial valves in the lobster *Homarus americanus*. *The Biological Bulletin, 194*, 72-82.
- DAVIES, P.E., COOK, L.S.J. & GOENARSO, D. (1994). Sublethal responses to pesticides of several species of australian freshwater fish and crustaceans and raimbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13, 1341-1354.
- DE LANGE, H.J., NOORDOVEN, W., MURK, A.J., LURLING, M. & PEETERS, E. (2006). Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 78, 209-216.
- **DEFUR, P., CRANE, M., INGERSOLL, C. & TATTERSFIELD, L. (1999)**. Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment. Pensacola: SETAC Press, 303 pp.
- **DEFUR, P.L. (2004)**. Use of invertebrates in testing for endocrine disruptors. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 45, 484-493.
- DEN BESTEN, P.J., POSTMA, J.F., DE VALK, S., DUBBELDAM, M., EVERAARTS, J.M., GARRIGUES, P., BARTH, H., WALKER, C.H. & NARBONNE, J.-F. (2001a). Environmental monitoring in the north sea by combining biomarker studies in the sea star Asterias Rubens with sediment quality assessment based on sea urchin bioassays. In Biomarkers in Marine Organisms (pp. 279-330). Amsterdam: Elsevier Science.
- DEN BESTEN, P.J., VALK, S., VAN WEERLEE, E., NOLTING, R.F., POSTMA, J.F.
 & EVERAARTS, J.M. (2001b). Bioaccumulation and biomarkers in the sea star Asterias rubens (Echinodermata: Asteroidea): a North Sea field study. Marine Environmental Research, 51, 365-387.
- **DEPLEDGE, M.H. & FOSSI, M.C. (1994)**. The role of biomarkers in environmental assessment (2), invertebrates. *Ecotoxicology*, *3*, 161-172.
- DESBROW, C., ROUTLEDGE, E.J., BRIGHTY, G.C., SUMPTER, J.P. & WALDOCK, M.J. (1998). Identification of oestrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science & Technology*, 32, 1549-1558.
- DIAMANTINO, T.C., ALMEIDA, E., SOARES, A.M.V.M. & GUILHERMINO, L. (2003). Characterization of Cholinesterases from *Daphnia magna* (Straus) and Their

Inhibition by Zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71, 219-225.

- DINAN, L., BOURNE, P., WHITING, P., DHADIALLA, T.S. & HUTCHINSON, T.H. (2001). Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B-II cell in vitro assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 2038-2046.
- **DODSON, S.I., MERRITT, C.M., SHANNAHAN, J.P. & SHULTS, C.M. (1999)**. Low exposure concentrations of atrazine increase male production in *Daphnia pulicaria*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *18*, 1568-1573.
- **DONAHUE, J.K. (1940)**. Occurrence of estrogens in the ovaries of certain invertebrates. *Endocrinology*, 27, 149-152.
- DORIGO, U., LEBOULANGER, C., BERARD, A., BOUCHEZ, A., HUMBERT, J.F. & MONTUELLE, B. (2007). Lotic biofilm community structure and pesticide tolerance along a contamination gradient in a vineyard area. *Aquatic Microbial Ecology*, 50, 91-102.
- DRACH, P. (1939). Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés Décapodes. Annales de l'Institut Oceanographique, 19, 103-391.
- DUROU, C., POIRIER, L., AMIARD, J.-C., BUDZINSKI, H., GNASSIA-BARELLI, M., LEMENACH, K., PELUHET, L., MOUNEYRAC, C., ROMÉO, M. & AMIARD-TRIQUET, C. (2007). Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis* diversicolor. Environmental Pollution, 148, 445-458.
- EGGERS, T.O. & MARTENS, A. (2001). Bestimmungsschlüssel der Süßwasser-Amphipoda (Crustacea) Deutschlands. *Lauterbornia*, 42, 1-68.
- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V. & FEATHERSTONE, R.M. (1961). A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- ENGENHEIRO, E.L., HANKARD, P.K., SOUSA, J.P., LEMOS, M.F., WEEKS, J.M. & SOARES, A.M.M. (2005). Influence of dimethoate on acetylcholinesterase activity and locomotor function in terrestrial isopods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 603-609.
- ESCARTIN, E. & PORTE, C. (1996). Acetylcholinesterase Inhibition in the Crayfish *Procambarus clarkii* Exposed to Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 34*, 160-164.
- ETO, M. (1974). Organophosphorous pesticides: organic and biochemical chemistry. Cleveland: C. R. C. Press, 387 p. pp.
- **EUROPEAN-COMMISSION. (1999)**. Community strategy for endocrine disrupters A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and

wildlife. Paper presented at the Communication from the commission to the Council and the European Parliament, Brussels (Belgium).

- FABIAN, R. & SEYFARTH, E.-A. (1997). Acethylcholine and histamine are transmitter candidates in identifiable mechanosensitive neurons of the spider *Cupiennus salei* : An immunocytochemical study. *Cell and Tissue Research*, 287, 413-423.
- **FELTEN, V. (2003)**. Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophisiologie de Gammarus fossarum Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda): Approche intégrée à différents niveaux d'organisation. <u>Université de</u> <u>Metz</u>, 339 pp.
- FELTEN, V., CHARMANTIER, G., MONS, R., GEFFARD, A., ROUSSELLE, P., COQUERY, M., GARRIC, J. & GEFFARD, O. (2008). Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea : Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 86, 413-425.
- **FELTEN, V. & GUEROLD, F. (2001)**. Hyperventilation and loss of hemolymph Na⁺ and Cl⁻ in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* exposed to acid stress : a preliminary study. *Dis. Aquat. Org.*, 45, 77-80.
- **FELTEN, V. & GUEROLD, F. (2006)**. Short-term physiological responses to a severe acid stress in three macroinvertebrate species: A comparative study. *Chemosphere, 63*, 1427-1435.
- FÉRÉZOU, J.-P., BARBIER, M. & BERREUR-BONNENFANT, J. (1978). Biosynthèse de la farnésylacétone-(*E*,*E*) par les glandes androgènes du crabe *Carcinus maenas*. *Helvetica Chimica Acta*, *61*, 669-674.
- **FERRARI, A., VENTURINO, A. & PECHEN DE D'ANGELO, A.M. (2004)**. Time course of brain cholinesterase inhibition and recovery following acute and subacute azinphosmethyl, parathion and carbaryl exposure in the goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety, 57*, 420-425.
- FIALKOWSKI, W., FIALKOWSKA, E., SMITH, B.D. & RAINBOW, P.S. (2003). Biomonitoring surview of trace metal pollution in streams of catchment draining zinc and lead mining area of upper silesia, Poland using the amphipod *Gammarus fossarum*. *International Review of Hydrobiology*, 88, 187-200.
- FINGERMAN, M. (1992). Glands and secretion. In Harrison F.W. & H. A.G. (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates* (Vol. 10 : Decapod Crustacea, pp. 345-394). New York: Wiley-Liss.
- FINGERMAN, M. (1997). Crustacean endocrinology: A retrospective, prospective, and introspective analysis. *Physiological Zoology*, 70, 257-269.
- FINGERMAN, M., JACKSON, N.C. & NAGABHUSHANAM, R. (1998). Hormonallyregulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 120*, 343-350.

- FINGERMAN, M., NAGABHUSHANAM, R. & SAROJINI, R. (1993). Vertebrate-Type Hormones in Crustaceans - Localization, Identification and Functional-Significance. *Zoological Science*, 10, 13-29.
- FLAMMARION, P. (2002). Ecotoxicologie aquatique : intérêts et limites des variables biologiques. *Environnement, Risques et Santé, 1*, 289-298.
- FLAMMARION, P., DEVAUX, A., NEHLS, S., MIGEON, B., NOURY, P. & GARRIC, J. (2002a). Multibiomarker Responses in Fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51, 145-152.
- FLAMMARION, P., NOURY, P. & GARRIC, J. (2002b). The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution*, 120, 325-332.
- FORBES, V.E., PALMQVIST, A. & BACH, L. (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 272-280.
- FORD, A.T. (2008). Can you feminise a crustacean? Aquatic Toxicology, 88, 316-321.
- FORD, A.T. & FERNANDES, T.F. (2005). Better the devil you know? A precautionary approach to using amphipode and daphnids in endocrine disruptor studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 1019-1021.
- FORD, A.T., FERNANDES, T.F., READ, P.A., ROBINSON, C.D. & DAVIES, I.M. (2004a). The costs of intersexuality: a crustacean perspective. *Marine Biology*, 145, 951-957.
- FORD, A.T., FERNANDES, T.F., RIDER, S.A., READ, P.A., ROBINSON, C.D. & DAVIES, I.M. (2004b). Endocrine disruption in a marine amphipod? Field observations of intersexuality and de-masculinisation. *Marine Environmental Research*, 58, 169-173.
- FORGET, J. (1998). Neurotoxic impact of contaminans on the acethylcholinesterase activity of the marine copepod Tigriopus brevicornis (Müller). <u>University of Paris</u>, VI, 180 pp.
- FORGET, J., BELIAEFF, B. & BOCQUENÉ, G. (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (Tigriopus brevicornis) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, *62*, 195-204.
- FORGET, J. & BOCQUENE, G. (1999). Partial purification and enzymatic characterization of acetylcholinesterase from the intertidal marine copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 123, 345-350.
- FORGET, J., LIVET, S. & LEBOULENGER, F. (2002). Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 132*, 85-92.

- FORROW, D.M. & 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, 2100-2106.
- FRASCO, M.F., COLLETIER, J.P., WEIK, M., CARVALHO, F., GUILHERMINO, L., STOJAN, J. & FOURNIER, D. (2007). Mechanisms of cholinesterase inhibition by inorganic mercury. *FEBS Journal*, 274, 1849-1861.
- **FRASCO, M.F., FOURNIER, D., CARVALHO, F. & GUILHERMINO, L. (2006)**. Cholinesterase from the common prawn (Palaemon serratus) eyes: Catalytic properties and sensitivity to organophosphate and carbamate compounds. *Aquatic Toxicology*, 77, 412-421.
- FRIBERG, N., ANDERSEN, T.H., HANSEN, H.O., IVERSEN, T.M., JACOBSEN, D., KROJGAARD, L. & LARSEN, S.E. (1994). The effect brown trout (Salmo trutta L.) on stream invertebrate drift, with specieal reference to Gammarus pulex (L.). Hydrobiologia, 294, 105-110.
- **FULTON, M.H. & KEY, P.B. (2001)**. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 37-45.
- GAGNÉ, F. & 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, Part C: Toxicology & Pharmacology, 138*, 515-522.
- 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.
- GAGNÉ, F., CEJKA, P., ANDRÉ, C., HAUSLER, R. & BLAISE, C. (2007). Neurotoxicological effects of a primary and ozonated treated wastewater on freshwater mussels exposed to an experimental flow-through system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 146, 460-470.
- GARCIA-DE LA PARRA, L.M., BAUTISTA-COVARRUBIAS, J.C., RIVERA-DE LA ROSA, N., BETANCOURT-LOZANO, M. & GUILHERMINO, L. (2006). Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 372-380.
- GARCÍA-REYERO, N., RALDÚA, D., QUIRÓS, L., LLAVERIA, G., CERDÀ, J., BARCELÓ, D., GRIMALT, J.O. & PIÑA, B. (2004). Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 670-675.

- **GEFFARD, O. (2001)**. Toxicité potentielle des sediments marins et estuariens contaminés: Evaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sedimentaires. Université Bourdeaux 1, 351 pp.
- **GERHARDT, A. (1995)**. Monitoring behavioral responses to metals in *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea) with impedance conversion. *Environment Sciences and Pollution Reserches*, 2, 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*, 63-70.
- GERHARDT, A., CARLSSON, A., RESSEMANN, C. & 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*, 150-156.
- GHEKIERE, A., VERSLYCKE, T., DE SMET, L., VAN BEEUMEN, J. & JANSSEN, C.R. (2004). Purification and characterization of vitellin from the estuarine mysid Neomysis integer (Crustacea; Mysidacea). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 138, 427-433.
- GHEKIERE, A., VERSLYCKE, T., FOCKEDEY, N. & JANSSEN, C.R. (2006a). Nontarget effects of the insecticide methoprene on molting in the estuarine crustacean Neomysis integer (Crustacea: Mysidacea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 332, 226-234.
- GHEKIERE, A., VERSLYCKE, T. & JANSSEN, C. (2006b). Effects of methoprene, nonylphenol, and estrone on the vitellogenesis of the mysid Neomysis integer. *General and Comparative Endocrinology*, 147, 190.
- GRECO, L.S.L., SANCHEZ, M.V., NICOLOSO, G.L., MEDESANI, D.A. & 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.
- GROSS, M.Y., MAYCOCK, D.S., THORNDYKE, M.C., MORRITT, D. & CRANE, M. (2001). Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1792-1797.
- GUILHERMINO, L., LACERDA, M.N., NOGUEIRA, A.J.A. & SOARES, A.M.V.M. (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *The Science of The Total Environment, 247*, 137-141.
- GUILHERMINO, L., LOPES, M.C., CARVALHO, A.P. & SOARED, A.M.V.M. (1996). Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna. Chemosphere*, *32*, 727-738.

- GUILLETTE, L.J., JR., CRAINE, D.A., ROONEY, A.A. & PICKFORD, D.B. (1995). Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environmental Health Perspectives*, 103, 157-164.
- GUILLETTE, L.J., JR., GROSS, T.S., MASSON, G.R., MATTER, J.M., PERCIVAL, H.F. & WOODWARD, A.R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives*, 102, 680-688.
- HABIG, C., GIULIO, R.T.D. & ABOU-DONIA, M.B. (1988). Comparative properties of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue crab (*Callinectes sapidus*) acetylcholinesterases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 91, 293-300.
- HALL, J.C. & KANKEL, D.R. (1976). Genetics of acetylcholinesterase in Drosophila melanogaster. Genetics, 83, 517-535.
- HAMZA-CHAFFAI, A., ROMEO, M., GNASSIA-BARELLI, M. & EL ABED, A. (1998). Effect of copper and lindane on some biomarkers measured in the clam *Ruditapes decussatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, V61, 397-404.
- HANDY, R.D. & DEPLEDGE, M.H. (2000). Physiological responces : Their measurment and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology*, *8*, 329-349.
- HANNAM, M.L., HAGGER, J.A., JONES, M.B. & GALLOWAY, T.S. (2008). Characterisation of esterases as potential biomarkers of pesticide exposure in the lugworm *Arenicola marina* (Annelida: Polychaeta). *Environmental Pollution*, 152, 342-350.
- HANSTRÖM, M. (1926). Vergleichende anatomie des nervensystems der wirbellosen tiere. Berlin: Springer
- 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.
- HOFFMAN, D.J., RATTNER, B.A., BURTON, G.A.J. & CAIRNS, J.J. (2003). Handbook of ecotoxicology, 2nd edition. Boca Raton (Florida): CRC Press
- HOGAN, J.W. (1970). Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *5*, 347-353.
- HOGUET, J. & KEY, P.B. (2007). Activities of biomarkers in multiple life stages of the model crustacean, *Palaemonetes pugio. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 353, 235-244.

- HOMOLA, E. & CHANG, E.S. (1997). Methyl farnesoate: Crustacean juvenile hormone in search of functions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 117*, 347-356.
- 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. & 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, 91-95.
- HUTCHINSON, T.H., POUNDS, N.A., HAMPEL, M. & WILLIAMS, T.D. (1999). Lifecycle studies with marine copepods (*Tisbe battagliai*) exposed to 20-hydroxyecdysone and diethylstilbestrol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 2914-2920.
- JANER, G. & PORTE, C. (2007). Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology*, *16*, 145-160.
- JASMANI, S., KAWAZOE, I., SHIH, T.W., SUZUKI, Y. & AIDA, K. (2000). Hemolymph vitellogenin levels during ovarian development in the kuruma prawn *Penaeus japonicus. Fisheries Science, 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*. *Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative Experimental Biology*, 301, 334-343.
- JAYASANKAR, V., JASMANI, S., TSUTSUI, N., AIDA, K. & WILDER, M.N. (2006). Dynamics of vitellogenin synthesis in juvenile giant freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii. Journal of Experimental Zoology Part A-Comparative Experimental Biology, 305, 440-448.
- JAYASANKAR, V., TSUTSUI, N., JASMANI, S., SAIDO-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*. *Journal of Experimental Zoology, 293*, 675-682.
- JEMEC, A., DROBNE, D., TISLER, T., TREBSE, P., ROS, M. & SEPCIC, K. (2007). The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 144*, 303-309.
- JENSEN, C.S., GARSDAL, L. & BAATRUP, E. (1997). Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. a linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *16*, 1727-1732.

- JETT, D.A., NAVOA, R.V. & LYONS, M.A. (1999). Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity in vitro. *Toxicology Letters*, 105, 223-229.
- JOHNSON, C.D., RAND, J.B., HERMAN, R.K., STERN, B.D. & RUSSELL, R.L. (1988). The acetylcholinesterase genes of *C. elegans*: Identification of a third gene (ace-3) and mosaic mapping of a synthetic lethal phenotype. *Neuron*, *1*, 165-173.
- JUNGMANN, D., LADEWIG, V., LUDWICHOWSKI, K.-U., PETZSCH, P. & NAGEL, R. (2004). Intersexuality in *Gammarus fossarum* KOCH - a common inducible phenomenon? *Archiv für Hydrobiologie*, 159, 511-529.
- KANG, J.-J. & FANG, H.-W. (1997). Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 238, 367-371.
- KARAMAN, G.S. & 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, 1-97.
- **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.
- **KEDWARDS, T.J., BLOCKWELL, S.J., TAYLOR, E.J. & 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.
- KEY, P., FULTON, M., HARMAN-FETCHO, J.A. & MCCONNELL, L.L. (2003). Acetylcholinestérase activity in grass shrimp and aqueous pesticide levels from South Florida drainage canals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45, 371-377.
- **KEY, P.B. & FULTON, M.H. (2002)**. Characterization of cholinesterase activity in tissues of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72, 186-192.
- KIDD, K.A., BLANCHFIELD, P.J., MILLS, K.H., PALACE, V.P., EVANS, R.E., LAZORCHAK, J.M. & FLICK, W. (2007). Collapse of fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of National Academy of Sciences of the* United States of America, 104, 8897-8901.
- 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*). Aquatic Toxicology, 63, 391-403.
- KLAVERKAMP, J., DUANGSAWASDI, M., MACDONALD, W. & MAJEWSKI, H. (1977). An evaluation of fenitrothion toxicity in four life stage of rainbow trout, *Salmo*

gairdneri. In F. L. Mayer & J. L. Hamelink (Eds.), Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (pp. 231-240).

- KNOWLES, C.O., MCKEE, M.J. & PALAWSKI, D.U. (1987). Chronic effects of di-2ethylhexyl phthalate on biochemical- composition, survival and reproduction of Daphnia magna. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, 201-208.
- KREUTZWEISER, D.P., CAPELL, S.S., WAINIOKEIZER, K.L. & EICHENBERG, D.C. (1994). Toxicity of a new molt-inducing insecticide (RH-5992) to aquatic macroinvertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety 28*, 14-24.
- KRISTOFF, G., GUERRERO, N.V., DE D'ANGELO, A.M.P. & COCHON, A.C. (2006). Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. *Toxicology*, 222, 185-194.
- KUHN, K. & STREIT, B. (1994). Detecting sublethal effects of organophosphates by meusuring acetylcholinesterase activity in *Gammarus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53, 398-404.
- KUMAR, A. & CHAPMAN, J.C. (1998). Profenofos toxicity to the eastern rainbow fish (Melanotaenia duboulayi). Environmental Toxicology and Chemistry, 17, 1799-1806.
- KUSK, K.O. & PETERSEN, S. (1997). Acute and chronic toxicity of tributyltin and linear alkylbenzene sulfonate to the marine copepod *Acartia tonsa*. *Environmental Toxicology and Chemistry 16*, 1629-1633.
- KUTLU, M., DÜZEN, A., BAYÇU, C. & ÖZATA, A. (2002). A transmission electron microscope nvestigation of the effect of lead acetate on the hepatopancreatic ceca of *Gamarus pulex. Environmental Toxicology and Pharmacology, 12*, 181-187.
- LACHAISE, F., LE ROUX, A., HUBERT, M. & LAFONT, R. (1993). The molting activity of crustaceans: Localization, activity, and endocrine control. *Journal of Crustacean Biology*, 13, 198-234.
- LAFONT, R. & MATHIEU, M. (2007). Steroids in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology*, *16*, 109-130.
- LAGADIC, L., CAQUET, T., RAMADE, F. & AMIARD, J.-C. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie (Masson ed.). Paris, 419 pp.
- LANGSTON, W.J., BURT, G.R., CHESMAN, B.S. & VANE, C.H. (2005). Partioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in aquatic environment. *Journal of Marine Biology Assessment of U.K.*, 85, 1-31.
- LARKIN, P., KNOEBL, I. & DENSLOW, N.D. (2003). Differential gene expression analysis in fish exposed to endocrine disrupting compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 136, 149-161.

- LAU, P.S., WONG, H.L. & GARRIGUES, P. (2004). Seasonal variation in antioxidative responses and acetylcholinesterase activity in *Perna viridis* in eastern oceanic and western estuarine waters of Hong Kong. *Continental Shelf Research*, 24, 1969-1987.
- LAUFER, H. & DOWNER, R.G.H. (1988). Endocrinology of selected invertebrate types (Vol. 2). New York: Liss, A. R., 522 pp.
- LAUFER, H., LANDAU, M., HOMOLA, E. & BORST, D.W. (1987). Methyl farnesoate, its site of synthesis and regulation of secretion in a juvenile crustacean. *Insect Biochemistery*, 17, 1129-1131.
- LE ROUX, M.-L. (1933). Recherches sur la sexualité des gammariens. Faculté des Sciences de l'Université de Paris, Paris, 136 pp.
- LEBLANC, G.A. (2007). Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology*, 16, 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. & MATSUMURA, F. (1999). The endocrinology of invertebrates. In P. deFur, M. Crane, C. Ingersoll & L. Tattersfield (Eds.), *Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment* (pp. 23–106). Pensacola: SETAC Press.
- LEBLANC, G.A. & MCLACHLAN, J.B. (1999). Molt-independent growth inhibition of Daphnia magna by a vertebrate antiandrogen. Environmental Toxicology and Chemistry, 18, 1450-1455.
- LEBLANC, G.A., MU, X.Y. & RIDER, C.V. (2000). Embryotoxicity of the alkylphenol degradation product 4- nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives*, 108, 1133-1138.
- LEE, F.Y. & CHANG, C.F. (1997). The concentrations of vitellogenin (vitellin) and protein in hemolymph, ovary and hepatopancreas in different ovarian stages of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Physiology, 117*, 433-439.
- LEE, K.-W., HWANG, D.-S., RHEE, J.-S., KI, J.-S., PARK, H.G., J.-C., R., RAISUDDIN, S. & LEE, J.-S. (2008). Molecular cloning, phylogenetic analysis and developmental expression of a vitellogenin (Vg) gene fron the intertidal copepod, *Tigriopus japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 150, 395-402.
- LEE, R.F. & NOONE, T. (1995). Effect of reproductive toxicants on lipovitellin in female blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental 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, Part C: Toxicology & Pharmacology, 140*, 408-421.

- LI, M.-H. (2008a). Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian. *Chemosphere*, 70, 1796-1803.
- LI, M.-H. (2008b). Effects of nonylphenol on cholinesterase and carboxylesterase activities in male guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 781-786.
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 154,* 289-297.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- LUNDEBYE, A.K., CURTIS, T.M., BRAVEN, J. & DEPLEDGE, M.H. (1997). Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Aquatic Toxicology*, 40, 23-36.
- 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.
- 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 Research*, 36, 75-84.
- MACNEIL, C., ELWOOD, R.W. & DICK, J.T.A. (2000). Factors influencing the importance of *Gammarus sp.* (Crustacea Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv für Hydrobiologie, 149*, 87-107.
- MALBOUISSON, J.F.C., YOUNG, T.W.K. & BARK, A.W. (1995). Use of feeding rate and re-pairing of precopulatory *Gammarus pulex* to assess toxicity of gammahexachlorocyclohexane (Lindane). *Chemosphere*, 30, 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. & 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, 361-368.

- MALTBY, L. & CRANE, M. (1994). Responses of *Gammarus pulex* (Amphipoda; Crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution*, *84*, 45-52.
- MALTBY, L., NAYLOR, C. & CALOW, P. (1990a). Effect of stress on a freshwater benthic detritivore: Scope for growth in *Gammarus pulex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19, 285-291.
- MALTBY, L., NAYLOR, C. & CALOW, P. (1990b). Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 19, 292-300.
- MANZO, L., CASTOLDI, A.F., COCCINI, T. & PROCKOP, L.D. (2001). Assessing effects of neurotoxic pollutants by biochemical markers. *Environmental Research*, *85*, 31-36.
- MARCIAL, H.S., HAGIWARA, A. & SNELL, T.W. (2003). Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *22*, 3025-3030.
- MARKEY, C.M., RUBIN, B.S., SOTO, A.M. & SONNENSCHEIN, C. (2003). Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 83, 235-244.
- MARKOV, G.V., PARIS, M., BERTRAND, S. & LAUDET, V. (2008). The evolution of the ligand/receptor couple: a long road from comparative endocrinology to comparative genomics. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 293, 5-16.
- MARTIN-DIAZ, M., SALES, D. & 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. & 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.
- MARTIN, J.W. & DAVIS, G.E. (2001). An updated classification of the recent Crustacea. Sciences Series, Naural History Museum of Los Angeles Country (Vol. 39). Los Angeles, 124 pp.
- MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale (Masson et Cie ed.). Paris, 345 pp.
- MASSOULIÉ, J., PEZZEMENTI, L., BON, S., KREJCI, E. & VALLETTE, F.-M. (1993). Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progress in Neurobiology*, 41, 31-91.

- 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.
- MATOZZO, V., TOMEI, A. & MARIN, M.G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Marine Pollution Bulletin, 50*, 1686-1693.
- MATOZZO, V., TOMEI, A. & MARIN, M.G. (2006). Effects of 4-nonylphenol (xenoestrogen) and chlorpyrifos (organophosphorus pesticide) on acetylcholinesterase activity in the clam Tapes philippinarum. *Fresenius Environmental Bulletin*, 15, 710-714.
- MATTHIESSEN, P. (2003). Endocrine disruption in marine fish. Pure. Appl. Chem., 75, 2249-2261.
- MATTHIESSEN, P., REYNOLDSON, T., BILLINGHURST, Z., BRASSARD, D., CAMERON, P., CHANDLER, T., DAVIES, I., HORIGUCHI, T., MOUNT, D., OEHLMANN, J., POTTINGER, T., SIBLEY, P., THOMPSON, H. & VETHAAK, A. (1999). Field assessment for endocrine disruption in invertebrates. In P. deFur, M. Crane, C. Ingersoll & L. Tattersfield (Eds.), *Endocrine disruption in invertebrates: Endocrinology, testing and assessment* (pp. 199-270). Pensacola: SETAC Press.
- MATTHIESSEN, P., SHEAHAN, D., HARRISON, R., KIRBY, M., RYCROFT, R., TURNBULL, A., VOLKNER, C. & WILLIAMS, R. (1995). Use of a *Gammarus pulex* bioassay to measure the effects of transient carbofuran runoff from farmland. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 111-119.
- MAYCOCK, D.S., PRENNER, M.M., KHEIR, R., MORRIS, S., CALLAGHAN, A., WHITEHOUSE, P., MORRITT, S. & CRANE, M. (2003). Incorporation of in situ and biomarker assays in higher-tier assessment of the aquatic toxicity of insecticides. *Water Research*, 37, 4180-4190.
- MAZUROVÁ, E., HILSCHEROVÁ, K., TRIEBSKORN, R., KÖHLER, H.-R., MARŠÁLEK, B. & BLÁHA, L. (2008). Endocrine regulation of the reproduction in crustaceans: Identification of potential targets for toxicants and environmental contaminants. *Biologia*, 63, 139-150.
- MC CARTHY, J.F. & SHUGART, L.R. (1990). Biological markers of environmental contamination. In J. F. Mc Carthy & L. R. Shugart (Eds.), *Biomarkers of environmental contamination* (pp. 3-14). Boca Raton: Lewis Publishers.
- MCCAHON, C.P. & PASCOE, D. (1988). Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere*, 17, 2471-2480.
- MCCAULEY, D.J., DEGRAEVE, G.M. & LINTON, T.K. (2000). Sediment quality guidelines and assessment : overview and research needs. *Environmental Science and Policy*, *3*, 133-144.

- MCKENNEY, C.L. & 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, Part C: Pharmacology Toxicology & Endocrinology, 105*, 239-245.
- MCKENNEY, C.L. & CELESTIAL, D.M. (1996a). 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. & HOGLUND, 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, 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, 97-105.
- MCKENNEY, J.C.L. & CELESTIAL, D.M. (1996b). 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, J.C.L. & MATTHEWS, E. (1990). Influence of an insect growth regulator on the larval development of an estuarine shrimp. *Environmental Pollution*, 64, 169.
- MCLOUGHLIN, N., YIN, D., MALTBY, L., WOOD, R.M. & YU, H. (2000). Evaluation of sensitivity and specificity of two crustacean biochemical biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, 2085-2092.
- MENEZES, S., SOARES, A., GUILHERMINO, L. & 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, 114-122.
- 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. *Compte Rendu de l'Académie des Science de Paris, 279*, 587-590.
- MILANESI, L., MONJE, P. & BOLAND, R. (2001). Presence of estrogens and estrogen receptor-like proteins in *Solanum glaucophyllum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289, 1175-1179.
- MONSERRAT, J.M. & BIANCHINI, A. (1998). Some kinetic and toxicological characteristics of thoracic ganglia cholinesterase of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 120*, 193-199.

- MONSERRAT, J.M. & BIANCHINI, A. (2000). Methodological and biological aspects to be considered in acetylcholinesterase reactivation assays using 2-PAM. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 9, 39-47.
- MONSERRAT, J.M., BIANCHINI, A. & BAINY, A.C.D. (2002). Kinetic and toxicological characteristics of acetylcholinesterase from the gills of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and other aquatic species. *Marine Environmental Research*, 54, 781-785.
- MOORE, C.G. & STEVENSON, J.M. (1991). The occurrence of intersexuality in harpacticoid copepods and its relationship with pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 22, 72-74.
- MOORE, C.G. & STEVENSON, J.M. (1994). Intersexuality in benthic harpacticoid copepods in the Firth of Forth, Scotland. *Journal of Natural Histories, 28*, 1213-1230.
- **MORA, P. (1998)**. Caractérisation des cholinestérases de trois mollusques bivalves: Mytilus edulis, Mytilus Galloprovincialis et Corbicula fulminea. Contribution au developpement d'un biomarqueur de contamination des milieux marins et dulçaquicoles. Université de Bordeaux I, 260 pp.
- MORA, P., FOURNIER, D. & NARBONNE, J.-F. (1999). Cholinesterases from the marine mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and *M. edulis* L. and from the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* Muller. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 122*, 353-361.
- MOREIRA, S.M. & GUILHERMINO, L. (2005). The use of mytilus galloprovincialis acetylcholinesterase and glutathione S-trasferases activities as biomarkers of environmental contamination along the Northwest Portuguese coast. *Environmental Monitoring and Assessment, 105*, 309-325.
- MOREIRA, S.M., MOREIRA-SANTOS, M., RIBEIRO, R. & GUILHERMINO, L. (2004). The `Coral Bulker' fuel oil spill on the north coast of Portugal: Spatial and temporal biomarker responses in *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicology*, 13, 619-630.
- MU, X.Y. & LEBLANC, G.A. (2002a). Developmental toxicity of testosterone in the crustacean *Daphnia magna* involves anti-ecdysteroidal activity. *General and Comparative Endocrinology*, 129, 127-133.
- MU, X.Y. & LEBLANC, G.A. (2002b). Environmental anti-ecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology*, 292, 287-292.
- MU, X.Y. & 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*, 1085-1091.

- MURRAY, M. & BUTLER, A.M. (1994). Hepatic biotransformation of parathion: rôle of cytochrome P450 in NADPH- and NADH- mediated microsomal oxidation *in vitro*. *Chemical Research and Toxicology*, *7*, 792-799.
- NAGABUSHANAM, R. & KULKARNI, G.K. (1981). Effect of exogenous testosterone on the androgenic gland and testis of a marine penaeid prawn, *Parapenaeopsis hardwickii* (Miers) (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). *Aquaculture*, 23, 19-27.
- 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.
- NAKATSUJI, T. & SONOBE, H. (2004). Regulation of ecdysteroid secretion from the Yorgan by molt-inhibiting hormone in the American crayfish, *Procambarus clarkii*. *General and Comparative Endocrinology*, 135, 358-364.
- NATES, S.F. & MCKENNEY, C.L. (2000). Growth, lipid class and fatty acid composition in juvenile mud crabs (*Rhithropanopeus harrisii*) following larval exposure to fenoxycarb, insect juvenile hormone analog. *Comparative Biochemistry and Physiology CToxicology & Pharmacology 127*, 317-325.
- NAYLOR, C., MALTBY, L. & CALOW, P. (1989). Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia*, 188/189, 517-523.
- NAYLOR, C.G. (1995). Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *Textile Chemist and Colorist, 27.*
- NEBEKER, A.V. & SCHUYTEMA, 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, 441-446.
- NEMCSOK, J.G., NEMETH, A., BUZAS, Z.S. & BOROSS, L. (1984). Effects of copper, zinc and paraquat on acethylcholinesterase activity in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology*, *5*, 23-31.
- **OBERDORSTER, 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 lipovitellin in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 127*, 199-207.
- **ODA, S., TATARAZAKO, N., WATANABE, H., MORITA, M. & IGUCHI, T. (2005)**. Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere, 61*, 1168-1174.
- OEHLMANN, J., DI BENEDETTO, P., TILLMANN, M., DUFT, M., OETKEN, M. & SCHULTE-OEHLMANN, U. (2007). Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance. *Ecotoxicology*, *16*, 29-43.

- OETKEN, M., BACHMANN, J., SCHULTE-OEHLMANN, U., OEHLMANN, J. & KWANG, W.J. (2004). Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. In *International Review of Cytology* (Vol. 236, pp. 1-44): Academic Press.
- OHIRA, T., OKUMURA, T., SUZUKI, M., YAJIMA, Y., TSUTSUI, N., WILDER, M.N.
 & NAGASAWA, H. (2006). Production and characterization of recombinant vitellogenesis-inhibiting hormone from the American lobster *Homarus americanus*. *Peptides, 27*, 1251-1258.
- **OKUMURA, T. & AIDA, K. (2000a)**. Fluctuations in hemolymph ecdysteroid levels during the reproductive and non-reproductive molt cycles in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fisheries Science*, *66*, 876-883.
- **OKUMURA, T. & AIDA, K. (2000b)**. 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.
- **OKUMURA, T., YAMANO, K. & SAKIYAMA, K. (2007)**. Vitellogenin gene expression and hemolymph vitellogenin during vitellogenesis, final maturation, and oviposition in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 147*, 1028-1037.
- OKUNO, A., KATAYAMA, H. & NAGASAWA, H. (2000). Partial characterization of vitellin and localization of vitellogenin production in the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry & Molecular Biology, 126*, 397-407.
- **OLMSTEAD, A.W. & 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. & LEBLANC, G.A. (2001b)**. Low exposure concentration effects of methoprene on endocrine- regulated processes in the crustacean *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences, 62*, 268-273.
- **OLMSTEAD, A.W. & LEBLANC, G.A. (2002)**. The juvenoid hormone methyl farnesoate is a sex determinant in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology, 293,* 736-739.
- **OLMSTEAD, A.W. & LEBLANC, G.A. (2003)**. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives, 11*, 919-924.
- **OLMSTEAD, A.W. & LEBLANC, G.A. (2007)**. The environmental endocrine basis of gynandromorphism (Intersex) in a Crustacean. *International Journal of Biological Sciences, 3*, 77-84.
- OROPESA, A.-L., PEREZ-LOPEZ, M., HERNANDEZ, D., GARCIA, J.-P., FIDALGO, L.-E., LOPEZ-BECEIRO, A. & SOLER, F. (2007). Acetylcholinesterase activity in

seabirds affected by the Prestige oil spill on the Galician coast (NW Spain). Science of the Total Environment, 372, 532-538.

- OWEN, R., BUXTON, L., SARKIS, S., TOASPERN, M., KNAP, A. & DEPLEDGE, M. (2002). An evaluation of hemolymph cholinesterase activities in the tropical scallop, *Euvola (Pecten) ziczac*, for the rapid assessment of pesticide exposure. *Marine Pollution Bulletin, 44*, 1010-1017.
- PARKS, L.G. & LEBLANC, G.A. (1996). Reductions in steroid hormone biotransformation/elimination as a biomarker of pentachlorophenol chronic toxicity. *Aquatic Toxicology*, *34*, 291-303.
- PARNES, S., MILLS, E., SEGALL, C., RAVIV, S., DAVIS, C. & SAGI, A. (2004). Reproductive readiness of the shrimp *Litopenaeus vannamei* grown in a brackish water system. *Aquaculture*, 236, 593-606.
- PASCOE, D., KIDWARDS, T.J., MAUND, S.J., MUTHI, E. & TAYLOR, E.J. (1994). Laboratory and field evaluation of a behavioural bioassay--The *Gammarus pulex* (L.) precopula separation (GaPPS) test. *Water Research*, *28*, 369-372.
- PATHIRATNE, A., CHANDRASEKERA, L.W.H.U. & DE SERAM, P.K.C. (2008). Effects of biological and technical factors on brain and muscle cholinesterase in Nile tilapia, Oreochromis niloticus: Implications for biomonitoring neurotoxic contaminations. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 54, 309-317.
- PAYEN, G.G. & COSTLOW, J.D. (1977). Effects of a juvenile hormone mimic on male and female gametogenesis of the mud-crab *Rhithropanopeus harrisii* (Gould) (Brachyura: Xanthidae). *The Biological Bulletin*, 152, 199-208.
- PAYNE, J.F., MATHIEU, A., MELVIN, W. & FANCEY, L.L. (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 225-231.
- PAYNE, J.F., MELVIN, W., MATHIEU, A. & FANCEY, L.L. (1994). Biomarkers of stress in urban rivers: mixed-function oxygenase and acetylcholinesterase effects in brown trout in rivers in St. John's, ewfoundland. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1947, 1-23.
- PÉREZ, E., BLASCO, J. & SOLÉ, M. (2004). Biomarker responses to pollution in two invertebrate species: Scorbicularia plana and Nereis diversicolor from the Cadiz bay (SW Spain). Marine Environmental Research, 58, 275-279.
- **PFEIFER, S., SCHIEDEK, D. & DIPPNER, J.W. (2005)**. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp* from the south-westem Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 320*, 93-103.

- PFEIFFER, C.L. & GLANTZ, R.M. (1989). Cholinergic synapses and the organization of contrast detection in the crayfish optic lobe. *Journal of Neuroscience*, *9*, 1872-1882.
- PHILLIPS, T.A., SUMMERFELT, R.C. & ATCHISON, G.J. (2002). Environmental, biological, and methodological factors affecting cholinesterase activity in Walleye (*Stizostedion vitreum*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 43, 75-80.
- PHILLIPS, T.A., SUMMERFELT, R.C. & ATCHISON, G.J. (2006). Environmental, biological, and methodological factors affecting cholinesterase activity in Walleye (*Stizostedion vitreum*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 43, 75-80.
- PLENET, S. (1995). Fresh water amphipods as biomonitors of metal pollution in surface and interstitial aquatic systems. *Freshwater Biology*, *33*, 127-137.
- PÖCKL, M. & HUMPESCH, U.H. (1990). Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Freshwater Biology*, 23, 441-455.
- POYNTON, H.C., VARSHAVSKY, J.R., CHANG, B., CAVIGIOLIO, 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. Environmental Science & Technology, 41, 1044-1050.
- PRINCIPATO, G.B., TALESA, V., GIOVANNINI, E., PASCOLINI, R. & ROSI, G. (1988). Characterization of the soluble cholinesterase from Squilla mantis. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Comparative Pharmacology, 90, 413-416.
- **PRINTES, L.B. & CALLAGHAN, A. (2003)**. Intraclonal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: The implications for its applicability as a biomarker. *Environmental Toxicology and Chemistry, 22*, 2042-2047.
- **PRINTES, L.B. & CALLAGHAN, A. (2004)**. A comparative study on the relationship between acetylcholinesterase activity and acute toxicity in *Daphnia magna* exposed to anticholinesterase insecticides. *Environmental Toxicology and Chemistry, 23*, 1241-1247.
- QUINTANEIRO, C., MONTEIRO, M., PASTORINHO, R., SOARES, A.M.V.M., NOGUEIRA, A.J.A., MORGADO, F. & GUILHERMINO, L. (2006). Environmental pollution and natural populations: A biomarkers case study from the Iberian Atlantic coast. *Marine Pollution Bulletin, 52*, 1406-1413.
- **RADENAC, G., BOCQUENE, G., FICHET, D. & MIRAMAND, P. (1998)**. Contamination of a dredged-material disposal site (La Rochelle Bay, France). The use of the acetylcholinesterase activity of *Mytilus edulis* (L.) as a biomarker of pesticides: the need for a critical approach. *Biomarkers*, *3*, 305-315.

- **RAMADE, F. (1998)**. *Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau*: Ediscience Paris, 785 pp.
- RANK, J., LEHTONEN, K.K., STRAND, J. & LAURSEN, M. (2007). DNA damage, acetylcholinesterase activity and lysosomal stability in native and transplanted mussels (*Mytilus edulis*) in areas close to coastal chemical dumping sites in Denmark. *Aquatic Toxicology*, 84, 50-61.
- **RAO, V.J. (2004)**. Effects of monocrotophos and its analogs in acetylcholinesterase activity's inhibition and its pattern of recovery on euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 59*, 217-222.
- **REDDY, M.S. & RAO, K.R. (1987)**. Phosphamidon and lindane induced molt inhibition in the marine prawn, *Penaeus monodon* (Fabricius). *National Academy Science Letters-India, 10*, 255-257.
- **REDDY, P.M. & PHILIP, G.H. (1994)**. In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, Cyprinus carpio exposed to technical grade cypermethrin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *52*, 619-626.
- **REDDY, P.R., NAGARAJU, G.P.C. & 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*, 511-515.
- **REDDY, P.S., BHAGYALAKSHMI, A. & 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.
- **RICCIARDI, F., BINELLI, A. & PROVINI, A. (2006)**. Use of two biomarkers (CYP450 and acetylcholinesterase) in zebra mussel for the biomonitoring of Lake Maggiore (northern Italy). *Ecotoxicology and Environmental Safety, 63*, 406-412.
- **RICCIARDI, F., MATOZZO, V. & 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*, 365-372.
- RICE, D.C. (1999). Behavioral toxicology of environmental contaminants-An overview. In R. J. M. Niesink, R. M. A. Jaspers, L. M. W. Kornet, J. M. van Ree & H. A. Tilson (Eds.), *Introduction to neurobehavioral toxicology: Food and environment* (pp. 311-312). New York: CRC Press.
- RIDER, C.V., GORR, T.A., OLMSTEAD, A.W., WASILAK, B.A. & 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.
- RINDERHAGEN, M., RITTERHOFF, J. & ZAUKE, G.-P. (2000). Crustaceans as Bioindicators. In A. Gerhardt (Ed.), *Biomonitoring of Polluted Warter - Reviews on Actual Topics, Environmental Research Forum* (Vol. 9, pp. 161-194). Zürich: Trans Tech Publications - Scitech Publications.
- **ROBILLARD, S., BEAUCHAMP, G. & LAULIER, M. (2003)**. The role of abiotic factors and pesticide levels on enzymatic activity in the freshwater mussel *Anodonta cygnea* at three different exposure sites. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 135*, 49-59.
- RODRIGUEZ-FUENTES, G., ARMSTRONG, J. & SCHLENK, D. (2008). Charaterization of muscle cholinesterases from two demersal flatfish collected near a municipal wastewater outfall in Southern California. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 69*, 466-471.
- RODRIGUEZ, E.M., GRECO, L.S.L., 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. *General and Comparative Endocrinology*, 125, 34-40.
- **RODRÍGUEZ, E.M., MEDESANI, D.A. & FINGERMAN, M. (2007)**. Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular & Integrative Physiology, 146,* 661-671.
- ROMAN, Y.E., DE SCHAMPHELAERE, K.A.C., NGUYEN, L.T.H. & JANSSEN, C.R. (2007). Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratoryformulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Science* of The Total Environment, 387, 128-140.
- **ROUX, L.A. (1970)**. Les gammares du groupe *pulex*. Essai de systématique biologique. I. -Etude Morphologique et Morphométrique. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale, 111*, 313-356.
- SAGI, A. & AFLALO, E.D. (2005). The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man): a biotechnological perspective. *Aquaculture Research*, *36*, 231-237.
- SAGI, A., HOMOLA, E. & LAUFER, H. (1993). Distinct reproductive types of male spider crabs *Libinia emarginata* differ in circulating and synthesizing methyl farnesoate. *The Biological Bulletin, 185*, 168-173.
- SAGI, A., KHALAILA, I., ABDU, U., SHOUKRUN, R. & WEIL, S. (1999). A newly established ELISA showing the effect of androgenic gland on secondary-vitellogenic-specific protein in the hemolymph of the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 115, 37-45.
- SANDERS, M.B., BILLINGHURST, Z., DEPLEDGE, M.H. & CLARE, A.S. (2005). Larval development and vitellin-like protein expression in *Palaemon elegans* larvae following xeno-oestrogen exposure. *Integrative and Comparative Biology*, 45, 51-60.
- SAROJINI, S. (1963). Comparison of the effects of androgenic hormone and testosterone propionate on the female ocypod crab. *Current Science*, *32*, 411-412.

- SCAPS, P. & BOROT, O. (2000). Acetylcholinesterase activity of the polychaete Nereis diversicolor: effects of temperature and salinity. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology Toxicology & Endocrinology, 125, 377-383.
- SCHIRLING, M., JUNGMANN, D., LADEWIG, V., LUDWICHOWSKI, K.U., NAGEL, R., KOHLER, H.R. & TRIEBSKORN, R. (2006). Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossarum* (Amphipoda). *Ecotoxicology*, 15, 143-156.
- SCHIRLING, M., JUNGMANN, D., LADEWIG, V., NAGEL, R., TRIEBSKORN, R. & 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.
- SCHOOR, P. & BRAUSCH, J. (1980). The inhibition of acetylcholinesterase activity in pink shrimp (*Penaeus duorarum*) by methyl parathion and its oxon. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 9, 599-605.
- SCHULTZ, R. & LIESS, M. (1999). Validity and ecological relevance of an active in situ bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*. *Environmental Toxicology* and Chemistry, 18, 2243-2250.
- 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. *Aquatic Toxicology*, 67, 203-215.
- SHECHTER, A., AFLALO, E.D., DAVIS, C. & SAGI, A. (2005). Expression of the reproductive female-specific vitellogenin gene in endocrinologically induced male and intersex *Cherax quadricarinatus* crayfish. *Biology of Reproduction, 73*, 72-79.
- SHEEHAN, D. & POWER, A. (1999). Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 123*, 193-199.
- SHUGART, L.R., MC CARTHY, J.F. & HALBROOK, R.S. (1992). Biological markers of environmental and ecological contaminations. An overview. *Risk Analysis*, 12, 353-360.
- SISMEIRO-VIVAS, J., ABRANTES, N., PEREIRA, J.L., CASTRO, B.B. & GONCALVES, F. (2007). Short-term effects of Quirlan^(R) (chlorfenvinphos) on the behavior and acetylcholinesterase activity of *Gambusia holbrooki*. *Environmental Toxicology*, 22, 194-202.
- SNYDER, M.J. & 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*, 177-190.

- SOARES, A., GUIEYSSE, B., JEFFERSON, B., CARTMELL, E. & LESTER, J.N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 34, 1033-1049.
- SOETAERT, A., VANDENBROUCK, T., VAN DER VEN, K., MARAS, M., VAN REMORTEL, P., BLUST, R. & DE COEN, W.M. (2007). Molecular responses during cadmium-induced stress in *Daphnia magna*: Integration of differential gene expression with higher-level effects. *Aquatic Toxicology*, 83, 212-222.
- SOLÉ, M., GARCIA-DE LA PARRA, L.M., ALEJANDRE-GRIMALDO, S. & SARDA,
 F. (2006). Esterase activities and lipid peroxidation levels in offshore commercial species of the NW Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin, 52*, 1708-1716.
- STAMLER, C.J., BASU, N. & CHAN, H.M. (2005). Biochemical markers of neurotoxicity in wildlife and human populations: considerations for method development. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 68, 1413-1429.
- STREIT, B. & KUHN, K. (1994). Effects of organophosphorous insecticides on autochthonous and introduduced *Gamarus* species. *Water Science and Technology*, 29, 233-240.
- STURM, A., DA SILVA DE ASSIS, H.C. & HANSEN, P.-D. (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzomological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47, 389-398.
- SUBRAMONIAM, T. (2000). Crustacean ecdysteriods in reproduction and embryogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology, 125, 135-156.
- SUMPTER, J.P. & JOBLING, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103, 173-178.
- SUNDELIN, B., RYK, C. & MALMBERG, G. (2000). Effects on the sexual maturation of the sediment-living amphipod *Monoporeia affinis*. *Environmental Toxicology*, 15, 518-526.
- SUTCLIFFE, D.W. (1993). Reproduction in *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda): female strategies. *Freshwater Forum*, *3*, 26-64.
- SUZUKI, S., YAMASAKI, K. & KATAKURA, Y. (1990). Vitellogenin synthesis in andrectomized males of the terrestrial isopod, *Armadillidium vulgare* (Malacostracan Crustacea). *General and Comparative Endocrinology*, 77, 283-291.
- SZEGLETES, T., BALINT, T., SZEGLETES, Z. & NEMCSOK, J. (1995). In vivo effects of deltamethrin exposure on activity and distribution of molecular forms of carp AChE. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *31*, 258-263.
- **TACHET, H., BOURNAUD, M., RICHOUX, P. & USSEGLIO-POLATERA. (2000)**. Invertébrés d'eau douce : Systématiques, biologie, écologie. Paris, 588 pp.

- TAHARA, D., SUITOH, K. & HATTORI, H. (2005). Hemolymph vitellogenin levels during final maturation and post-spawning in the female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Aquaculture*, 245, 311-319.
- **TAKAHASHI, T., ARAKI, A., NOMURA, Y., KOGA, M. & ARIZONO, K. (2000)**. The occurrence of dual-gender imposex in japanese freshwater crab. *Journal of Health Science, 46*, 376-379.
- **TAKIMOTO, Y., OHSHIMA, M. & MIYAMOTO, J. (1987)**. Comparative metabolism of fenitrothion in aquatic organisms, III. Metabolism in the crustaceans, *Daphnia pulex* and *Palaemon paucidens*. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 13*, 126-134.
- TALESA, V., CONTENTI, S., MANGIABENE, C., PASCOLINI, R., ROSI, G. & PRINCIPATO, G.B. (1990). Propionylcholinesterase from Murex Brandaris: comparison with other invertebrate cholinesterases. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 96, 39-43.
- TALESA, V., CONTENTI, S., PRINCIPATO, G.B., PASCOLINI, R., GIOVANNINI, E. & ROSI, G. (1992). Cholinesterases from Maia verrucosa and Palinurus vulgaris: A comparative study. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 101, 499-503.
- TALESA, V., ROMANI, R., ANTOGNELLI, C., GIOVANNINI, E. & ROSI, G. (2001). Soluble and membrane-bound acetylcholinesterases in *Mytilus galloprovincialis* (Pelecypoda: Filibranchia) from the northern Adriatic sea. *Chemico-Biological Interactions, 134*, 151-166.
- **TATARAZAKO, N., ODA, S., WATANABE, H., MORITA, M. & IGUCHI, T. (2003)**. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere, 53*, 827-833.
- 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.
- **TATZAKI, K. & TATZAKI, Y. (1997)**. Neural control of the pyloric region in the foregut of the shrimp *Penaeus* (Decapoda: Penaeidae). *Journal of Comparative Physiology. A, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 181*, 367-382.
- TAYLOR, E.J., JONES, D.P.W., MAUND, S.J. & PASCOE, D. (1993). A new method for measuring the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Chemosphere*, *26*, 1375-1381.
- **TESTER, P.A. & COSTLOW, J.D. (1981)**. Effect of insect growth-regulator dimilin (TH-6040) on fecundity and egg viability of the marine copepod *Acartia tonsa*. *Marine Ecology- Progress Series, 5*, 297-302.
- TIU, S.H.K., HUI, J.H.L., MAK, A.S.C., HE, J.G. & CHAN, S.M. (2006). Equal contribution of hepatopancreas and ovary to the production of vitellogenin (PmVg1) transcripts in the tiger shrimp, *Penaeus monodon. Aquaculture, 254*, 666-674.

- 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.
- TOPPARI, J., LARSEN, J.C., CHRISTIANSEN, P., SUMPTER, J.P. & SKAKKEBAEK, N.E. (1996). Male reproductive health and environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives*, 104, 741-803.
- **TRAYLER, K.M. & DAVIS, J.A. (1996)**. Sensitivity of *Daphnia carinata* Sensu Lato to the insect growth regulator, pyriproxyfen. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 33*, 154-156.
- **TRUHAUT, R. (1977)**. Ecotoxicology: objectives, principles, and perspectives. *Ecotoxicology and Environment Safety, 1*, 151-173.
- TSANG, W.S., QUACKENBUSH, L.S., CHOW, B.K., TIU, S.H., HE, J.G. & 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*, 99-109.
- **TSUKIMURA, B. (2001)**. Crustacean vitellogenesis: Its role in oocyte development. *American Zoologist, 41*, 465-476.
- **TSUTSUI, N., KATAYAMA, H., OHIRA, T., NAGASAWA, H., WILDER, M.N. & AIDA, K. (2005)**. The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology, 144*, 232-239.
- TSUTSUI, N., SAIDO-SAKANAKA, H., YANG, W.J., JAYASANKAR, V., JASMANI,
 S., OKUNO, A., OHIRA, T., OKUMURA, T., AIDA, K. & 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 Exerimental Biology*, 301, 802-814.
- **TUBERTY, S.R. & MCKENNEY, C.L. (2005)**. Ecdysteroid responses of estuarine crustaceans exposed through complete larval development to juvenile hormone agonist insecticides. *Integrative and Comparative Biology, 45*, 106-117.
- **TYLER, C.R., JOBLING, S. & SUMPTER, J.P. (1998)**. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Criticals Reviews in Toxicology, 28*, 319-361.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J. & VERMEULEN, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57-149.
- VAN DOLAH, R., MAIER, P., FULTON, M. & SCOTT, G. (1997). Comparison of azinphosmethyl toxicity to juvenile red drum (*Scianops ocellatus*) and the

mummichog (Fundulus heteroclitus). Environmental Toxicology and Chemistry, 16, 1488-1493.

- VAN HERP, F. (1998). Molecular, cytological and physiological aspects of the crustacean hyperglycemic hormone family. In G. M. Coast & S. G. Webster (Eds.), *Recent Advances in Arthropod Endocrinology* (pp. 53–70). Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- VANDENBERGH, G.F., ADRIAENS, D., VERSLYCKE, T. & JANSSEN, C.R. (2003). Effects of 17[alpha]-ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *54*, 216-222.
- VARO, I., NAVARRO, J.C., AMAT, F. & GUILHERMINO, L. (2002). Characterisation of cholinesterases and evaluation of the inhibitory potential of chlorpyrifos and dichlorvos to *Artemia salina* and *Artemia parthenogenetica*. *Chemosphere, 48*, 563-569.
- VILLATE, F., MARCEL, V., ESTRADA-MONDACA, S. & FOURNIER, D. (1998). Engineering sensitive acetylcholinetserase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosensors & Bioelectronics*, 13, 157-164.
- VINCENT, S.G.P., KELLER, R. & SUBRAMONIAM, T. (2001). Development of vitellogenin-ELISA, an in vivo bioassay, and identification of two vitellogenesisinhibiting hormones of the tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Marine Biotechnology*, *3*, 561-571.
- VINDIMIAN, E. (2001). La surveillance biologique des impacts toxiques dans l'environnement. *Cellular and Molecular Biology*, 47, 67-69.
- VIOQUE-FERNÁNDEZ, A., DE ALMEIDA, E.A. & LÓPEZ-BAREA, J. (2007). Esterases as pesticide biomarkers in crayfish (*Procambarus clarkii*, Crustacea): Tissue distribution, sensitivity to model compounds and recovery from inactivation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 145, 404-412.
- VOLZ, D.C. & CHANDLER, G.T. (2004). An enzyme-linked immunosobent assay for lipovitellin quantification in Copepods: A screening tool for endocrine toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 298-305.
- VOLZ, D.C., KAWAGUCHI, T. & 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.
- VOLZ, D.C., WIRTH, E.F., FULTON, M.H., SCOTT, G.I., STROZIER, E., BLOCK, D.S., FERRY, J.L., WALSE, S.S. & CHANDLER, G.T. (2003). Effects of fipronil and chlorpyrifos on endocrine-related endpoints in female grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 71, 497-503.
- WALDAY, P. & FONNUM, F. (1989). A comparative pharmacological characterization of cholinesterases in salmon (Salmo solar) brain and sealice (Lepeophtheirus

salmonis). Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 92, 197-199.

- WANG, H.Y., OLMSTEAD, A.W., LI, H. & LEBLANC, G.A. (2005). The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, *74*, 193-204.
- WATTS, M.M., PASCOE, D. & CARROLL, K. (2001). Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. *Water Research*, 35, 2347-2352.
- WATTS, M.M., PASCOE, D. & CARROLL, K. (2002). Population reponses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17alpha-ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 445-450.
- WELTON, J.S. (1979). Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biology*, *9*, 263–285.
- **WOLLENBERGER, L. (2005)**. Toxicity tests with crustaceans for detecting sublethal effects of potentieal endocrine disrupting chemicals. <u>Technical University of Denmark</u>, Lyngby
- WOLLENBERGER, L., BREITHOLTZ, M., KUSK, K.O. & 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, 53-64.
- WOLLENBERGER, L., DINAN, L. & BREITHOLTZ, M. (2005). Brominated flame retardants: activities in a crustacean development test and in an ecdysteroid screening assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 400-407.
- WOLLENBERGER, L. & KUSK, K.O. (2006). Gonad histology of copepods exposed to (anti)androgens. Paper presented at the Poster presented at: Controversies and solutions in environmental sciences; 16th annual meeting of the SETAC Europe.,
- WOUTERS, R., PIGUAVE, X., BASTIDAS, L., CALDERON, J. & 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, 573-582.
- WU, W.Z., LI, W., XU, Y. & WANG, J.W. (2001). Long-term toxic impact of 2,3,7,8tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the reproduction, sexual differentiation, and development of different life stages of *Gobiocypris rarus* and *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48, 293-300.
- YANG, G., KILLE, P. & FORD, A.T. (2008). Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates ? *Aquatic Toxicology*, 88, 81-87.
- YANG, W.J., OHIRA, T., TSUTSUI, N., SUBRAMONIAM, T., HUONG, D.T.T., AIDA, K. & WILDER, M.N. (2000). Determination of amino acid sequence and site of

mRNA expression of four vitellins in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Experimental Zoology, 287, 413-422.

- YANO, I. (1985). Induced ovarian maturation and spawning in greasyback shrimp *Metapenaeus ensis*, by progesterone. *Aquaculture*, 47, 223-229.
- YANO, I. (1987). Effect of 17-a-OH-progesterone on vitellogenin secretion in kuruma prawn, *Penaeus japonicus. Aquaculture, 61*, 46-57.
- **YING, G.-G. (2006)**. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International, 32*, 417-431.
- 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 Environmental Safety*, 61, 98-104.
- **ZHANG, L., GIBBLE, R. & 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*, 330-337.
- ZHANG, Q., ZHOU, Q., WANG, J., SUN, S., HUA, T. & REN, L. (2008). Influences of Cu or Cd on the neurotoxicity induced by petroleum hydrocarbons in ragworm *Perinereis aibuhitensis. Journal of Environmental Sciences*, 20, 364-371.
- ZOU, E. & FINGERMAN, M. (1997a). 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, 596-602.
- ZOU, E.M. & FINGERMAN, M. (1997b). Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. Ecotoxicology And Environmental Safety, 38, 281-285.
- ZULKOSKY, A.M., FERGUSON, P.L. & MCELROY, A.E. (2002). Effects of sewageimpacted sediment on reproduction in the benthic crustacean *Leptocheirus plumulosus*. *Marine Environmental Research*, 54, 615-619.

BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

PUBLICATIONS:

- Publications parues dans des journaux references:
- GAGNAIRE B., GEFFARD O., XUEREB B., MARGOUM C., & GARRIC J. (2008). Cholinesterase activities as potential biomarkers : characterization in two freshwater snails, *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca, Hydrobiidae, Smith 1889) and *Valvata piscinalis* (Mollusca, Valvatidae, Müller 1774). *Chemosphere* 71, 553-560.
- 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.
- XUEREB B., CHAUMOT A., MONS R., GARRIC J., GEFFARD O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicologie*, 93: 225-233.
- **XUEREB B.**, LEFEVRE E., GARRIC J., GEFFARD O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94: 114-122.
 - Publications en préparations :
- GEFFARD O., **XUEREB B.**, CHAUMOT A., GEFFARD A., BIAGIANTI S., NOEL C., ABBACI K., GARRIC J., CHARMANTIER G., CHARMENTIER-DAURES M. *Gammarus fossarum* as a freshwater organism test for evaluation of reprotoxic chemicals (en préparation pour *Environmental Toxicology and Chemistry*).
- XUEREB B., BEZIN L., BUDZINSKI, TUTUNDJIAN R., GARRIC J., GEFFARD O. Use of vitellogenin-like gene transcript as a biomarker of endocrine disruption in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) (en préparation pour *Environmental Pollution*).

PARTICIPATIONS ACTIVES A DES CONGRES ET SEMINAIRES :

- Communications orales :

- XUEREB B., FELTEN V., MONS R., GARRIC J. & GEFFARD, O.. Mesure de l'activité cholinestérasique chez l'amphipode Gammarus pulex : caractérisation, développement et validation. A.F.L. – 50^{ième} congrès annuel, 13-15 novembre 2007, Toulouse (France).
- XUEREB B., GARRIC J. & GEFFARD O.. Cholinesterase activity as potential biomarker in Gammarus Pulex: characterization, interpretation and predictive value. SETAC Europe – 19th annual metting: "Linking genomics and/or biomarkers to ecological relevant parameters", 25-29 May 2008, Warsaw (Poland).

- Posters :

- XUEREB B., FELTEN V., MONS R., GARRIC J. & GEFFARD O.. Characterization of cholinesterase activites in Gammarus pulex (Crustacean, Amphipoda). SETAC Europe – 18th annual metting: "Diagnostic approaches in ecological biomonitoring", 20-24 May 2007, Porto (Portugal).
- XUEREB B., FELTEN V., MONS R., GARRIC J. & GEFFARD O.. Acetylcholinesterase activity in Gammarus pulex (Crustacean, Amphipoda): Methological and field studies.
 SETAC Europe 18th annual metting: "Diagnostic approaches in ecological biomonitoring", 20-24 May 2007, Porto (Portugal).
- XUEREB B., BEZIN L., SAMBLES C., KILLE P., GARRIC J. & GEFFARD O.. Use of vitellogenin mRNA as a biomarker of endocrine disruption in Gammarus pulex (Crustacea, Amphipoda). SETAC Europe – 19th annual metting: "Endocrine disruption", 25-29 May 2008, Warsaw (Poland).
- GEFFARD O., XUEREB B., BEZIN L., ABBACI K., GARRIC J.. Development of a tool for evaluating reproductive effects in *Gammarus pulex*. SETAC Europe – 19th annual metting: "Linking genomics and/or biomarkers to ecological relevant parameters", 25-29 May 2008, Warsaw (Poland).

ANNEXES

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

				ANNEXE	1:			
Références		Kusk et Petersen, 1997	Tester et Costlow, 1981	Andersen et al., 2001	Wollenberger, 2005	Wollenberger et al., 2003	Wollenberger et al., 2005	Wollenberger, 2005
Effets et concentrations		Inhibition du développement larvaire, EC10=1 $\mathrm{ng/L},$ EC50=3 $\mathrm{ng/L}$	Réduction de la viabilité des œufs, altération du dévelopement embryo-larvaire, 1-10 $\mu g/L$; Reduction de la fécondité, 100 $\mu g/L$	Inhibition du développement larvaire, EC10 (μ g/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 (μ g/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) (l)	Stimulation du développement larvaire, 6-16 μ g/L (a) ; inhibition du développement larvaire, EC10 (μ g/L) : 166 (b), 3 (c), 0.1 (d), 80 (e), 630 (f), 20 (g), 1 650 (h), 700 (i), EC50 (μ g/L) : 226 (b), 27 (c), 2 (d), 156 (e), 3 530 (f), 30 (g), 1 980 (h), 3 600 (i)	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)	Inhibition du développement larvaire, EC10 (μ g/L) : 4.6 (a), 2.4 (b), 0.39 (c), 0.02 (d), 270 (e), 13 (f), EC50 (μ g/L) : 12.8 (a), 12.5 (b), 4.2 (c), 11.2 (d), 811 (e), 125 (f)	Reduction du nombre d'œufs produits par femelles, EC10 ($\mu g/L$) : 100 (a), 3 (b), 270 (c), 42 (d), 30 (e), 460 (f), 265 (g), 734 (h), 21 (i), 112 (j), EC50 ($\mu g/L$) : 650 (a), 980
Composés/sites		TBT	Diflubenzuron	17B-oestradiol (a), oestrone (b), testostérone (c), JH-III (d), flutamide (e), tamoxifène (f), hydroxyflutamide (g), EE2 (h), 4-OP (i), BPA (j), NPEO (k), DEHP (l)	PoA (a), methoprene (b), fenoxycarb (c), <i>p.p</i> ⁻ DDE (d), CPA (e), vinclozin (f), DES (g), ICI 182 (h), NP-acetate (i)	Muscs de synthése : kétone (a), galaxolide (b), tonalide (c), celestolide (d)	BDE-28 (a), BDE-47 (b), BDE-99 (c), BDE-100 (d), TBP (e), TBBPA (f)	20-HE (a), JH-III (b), 17B-oestradiol (c), progesterone (d), testosterone (e), methyl-testosterone (f), NPEO (g), DCA (i), BPA (h), TBBPA (i)
Espèces	Copépodes	Acartia tonsa (œufs-juvéniles)	Acartia tonsa	Acartia tonsa (œufs-juvéniles)	Acartia tonsa (œufs-juvéniles)	Acartia tonsa (œufs-juvéniles)	Acartia tonsa (œufs-juvéniles)	Acartia tonsa (adulte)

Liste non-exhaustive d'étude de laboratoire rapportant les effets de perturbatuers endocriniens chez les crustacés

Acartia tonsa (œufs-adultes)	17B-oestradiol (a), BPA (b)	Accélération de la maturation sexuelle des femelles, 23 $\mu g/L$ (a), 20 mg/L (b)	Andersen et al., 1999
<i>Amphiascus tenuiremis</i> (cycle de vie)	Fipronil	Forte inhibition de la reproduction, et retard du développement embryo-larvaire, 0.22 $\mu g/L$	Cary et al., 2004 Chandler et al., 2004
<i>Amphiascus tenuiremis</i> (multigénération)	Atrazine	declin de la reproduction en génération F1, 25 et 250 $\mu g/L$	Bejarano et Chandler, 2003
Bryocamptus zschokkei (cycle de vie)	Lindane	Retard du développement embryo-larvaire, 100 μ g/L ; Réduction du nombre d'œufs produits par femelles et de la viabité des progénitures, 32 μ g/L	Brown et al., 2003
Eurytemora affinis	17B-oestradiol (a), BaP (b), 4-NP (c), DEHP (d), atrazine (e)	Inhibition du développement larvaire, pas d'influence sur la fécondité, 6 μ g/L (a), 12 μ g/L (b), 7 μ g/L (c), 109 μ g/L (d), 25 μ g/L (e)	Forget-Leray et al., 2005
<i>Nitocra spinipes</i> (juveniles-adultes)	DES	Reduction du % de femelles gravides, 30 $\mu g/L$	Breitholtz et Bengtsson, 2001
<i>Nitocra spinipes</i> (cycle de vie)	BDE-47 (a), BDE-99 (b)	Inhibition du développement larvaire, 13 μ g/L (a) et 30 μ g/L (b)	Breitholtz et Wollenberger, 2003
Nitocra spinipes (cycle de vie)	Muscs de synthése : kétone (a), galaxolide (b), tonalide (c)	Inhibition du développement larvaire, 30 μg/L (a), 20 μg/L (b), 100 μg/L (c)	Breitholtz et al., 2003
Tisbe battagliai (cycle de vie)	20-HE (a), DES (b)	Reduction de la reproduction, 27 μ g/L (a) ; femelles sexuellement inactives, 86.5 μ g/L (a) et 100 μ g/L (b)	Hutchinson et al., 1999
Tigriopus japonicus (multigénération)	17B-oestradiol (a), BPA (b), 4-NP (c), <i>p-t-</i> OP (d)	Retard dans le déroulement du stade larvair 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 et al., 2003
<u>Cladocères</u>			
<i>Cerodaphnia dubia</i> (adultes)	Styrène (a), a-ecdysone (b), B- ecdysone (c), cyasterone (d), Poa (e), oestrone (f), testotérone (g), NP (h), BAP (i)	Dimminution de la reproduction, 0.04-1.7 μ g/L (a), 0.1 μ g/L (b), 0.36 μ g/L (c), 0.26 μ g/L (d), 1.05 μ g/L (e), > 10 000 μ g/L (f), 2 800 μ g/L (g), 280 μ g/L (h), 4 000 μ g/L (i)	Tatarazako et al., 2002
<i>Daphnia carnita</i> (cycle de vie)	Pyriproxifène	Arrêt de la croissance et reduction de la reproduction (80%) , 0.01 µg/L	Trayler et Davis, 1996

<i>Daphnia magna</i> Metoxychlor <i>Daphnia magna</i> 20-HE (a), P (multigénéation)			Parks et LeBlanc, 1996
<i>Daphnia magna</i> 20-HE (a), P (multigénéation)	υr	Réduction de la fréquence des mues, 1 µg/L	Baer et Owens, 1999
	PoA (b)	Observation d'exuviations incomplètes, $31-125 \mu g/L(a)$; Observation d'exuviations incomplètes et reduction de la fécondité en génération F1, $1.6-13 \mu g/L(b)$	Baldwin et al., 2001
Daphnia magna 4-NP (adultes)		Reduction de la féconité, 100 µg/L	Baldwin et al., 1997
<i>Daphnia magna</i> DES (multigénération)		Reduction de la fréquence des mues en génération F0, et diminution de la fécondité en génération F1, 500 μ g/L	Baldwin et al., 1995
Daphnia magna DEHP (adultes)		Reduction de la féconité, 800 µg/L	Knowles et al., 1987
Daphnia magna Cyprotérone (néonates-adultes)	e acétate	Reduction de la croissance (independemment de la mue), 0.5-2 mg/L ; reduction de la fréquence des mue, 2 mg/L ; reduction de la taille des pontes (due à une réduction de la taille des organismes), 1 et 2 mg/L	LeBlanc et McLachlan, 1999
<i>Daphnia magna</i> 4-NP (a), tes (néonates-adultes- embryons)	stostérone (b)	A normalité du développement embryonnaire, 100 et 200 $\mu g/L$ (a), 1 200 - 5 800 $\mu g/L$ (b) ; augmentation de la fécondité, 100 et 200 $\mu g/L$ (a)	LeBlanc et al., 2000
Daphnia magna Fénarimol (a (ontogénèse)	a), testostérone (b)	Anormalité du développement embryonnaire, 1 300 μg/L (a), 3 500 μg/L (b)	Mu et LeBlanc, 2004
<i>Daphnia magna</i> Fénarimol (néonates-adultes- embryons)		Retard de mue, anormalité du développement embryo- larvaire et reduction de la fécondité (corrélée à une diminution des concentrations d'ecdysone in vivo), 30- 1000 µg/L	Mu et LeBlanc, 2002 b
Daphnia magna Testostérone (néonates-adultes- embryons)	υ	Reduction de la fécondité, 2 300 mg/L ; Retard de mue, anormalité du développement embryo-larvaire, 7 200 $_{\mu g/L}$	Mu et LeBlanc, 2002 a

<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes)	Methoprène	Réduction des taux de croissance et de fécondité, retard de mauration sexuelle, 1.6-16 μg/L ; Réducion de la fréquence des mue, 0.06 μg/L	Olmstead et LeBlanc, 2001
<i>Daphnia magna</i> (néonates-adultes)	Methoprène	Stimulation de la production de mâles, 62-50 μ g/L	Olmstead et LeBlanc, 2001
Daphnia magna	Méthyle farnésoate (a), pyriproxifène (b)	Stimulation de la production de mâles, 0.8-800 nM (a), 0.3 nM (b)	Olmstead et LeBlanc, 2003
Daphnia magna	Pyriproxifène (a), fénoxycarbe (b), méthyle farnésoate (c), JH- III (d), méthoprène (e)	Réduction de la reproduction, sexe ratio dominé par les mâles, 0.33 μg/L (a, b), 3.7 μg/L (c), 330 μg/L (d), 1 300 μg/L (e)	Tatarazako et al., 2003
Daphnia magna	TCDD	Réduction de la fécondité, 0.1-1 ng/L	Wu et al., 2001
<i>Daphnia magna</i> (cycle de vie)	4-NP	Arrêt du développement embryo-larvaire, 800-1 000 $\mu g/L$; malformation des néonates, 50-200 $\mu g/L$; diminution de la fécondité, 12-50 $\mu g/L$	Zhang et al., 2003
<i>Daphnia magna</i> (juvéniles)	Endosulfane (a), DES (b)	Inhibition de la mue, 1 000-1 500 $\mu g/L$ (a), 100-200 $\mu g/L$ (b)	Zou et Fingerman, 1997
Daphnia magna	PCB 29 (a), aroclore 1242 (b), DEP (c)	Prolongation des périodes d'inter mue, 200 $\mu g/L$ (a), 50-100 $\mu g/L$ (b), 22 400 $\mu g/L$ (c)	Zou et Fingerman, 1997
Daphnia pulex	Diuron	Diminution de la reproduction, $LOEC = 7 700 \mu g/L$	Nebeker et Schuytema, 1998
Daphnia pulicaria (adultes)	Atrazine	Augmentation de la production de mâles, 0.5-10 $\mu g/L$	Dodson et al., 1999
Moina macrocopa (néo) adultes)	lates- (S)-méthoprène	Réduction de la fécondité, 50-500 µg/L	Chu et al., 1997
Cyrripèdes			
Balanus amphitrite (larves cyprides)	17B-oestradiol (a), 4-NP (b)	Inhibition de la fixation des larves, 0.01-10 $\mu g/L$ (a, b)	Billinghurst et al., 1998
Balanus amphitrite (larves cyprides)	RH 5849	Induction de la fixation et de la métamorphose des larves, $10\ 000\ \mu g/L$	Clare et al., 1992
Elminus modestus (la	ves) 17B-oestradiol (a), 4-NP (b)	Réduction de la croissance, 10 μ g/L (a); inhibition du développement larvaire, 0.1-10 μ g/L (b)	Billinghurst et al., 2001

Amphipodes			
Corophium volutator	4-NP	Réduction de la croissance, augmentation de la fertilité des femelles, >10 $\mu g/L$	Brown et al., 1999
<i>Gammarus pulex</i> (juvéniles)	Lindane	Réduction de la croissance (du poids), 6.1 µg/L	Blockwell et al., 1996
<i>Hyalella azteca</i> (adultes)	Lindane	Réduction de la croissance et de la taille des populations, réduction du nombre de femelles gravides, 13.5 μ g/L	Blockwell et al., 1999
<i>Leptocheirus plumulosus</i> (juvéniles- adultes)	Sédiments contaminés	Diminution de la reproduction	Zulkosky et al., 2002
Monoporeia affinis	Sédiments contaminés (métaux, PCBs, HAPs)	Retard ou arrêt de la maturation sexuelle	Sundelin et al., 2000
<u>Mycidacés</u>			
<i>Mysidopsis bahia</i> (cycle de vie)	Méthoprène	Réduction de la reproduction, 2 μ g/L; réduction de la croissance (du poids), 62 μ g/L	McKenney et Celestial, 1996
<u>Décapodes</u>			
<i>Chasmagnathus granulata</i> (juvéniles)	Cadmium	Réduction de la fréquence des mues, 10-50 µg/L	Greco et al., 2001
Homarus americanus (larves)	Heptachlore	Réduction de la fréquence des mues (liée à une perturbation des concentrations d'ecdysteroïdes), 0.5 mg/organisme (poids 30 g)	Snyder et Mulder, 2001
Oziotelphusa senex senex (adultes)	Lindane	Inhibition de la mue, 1 $\mu g/L$	Reddy et al., 1982
Palaemonetes pugio (larves)	Méthoprène	Inhibition de la métamorphose, 100-1 000 μg/L	Kreutzweiser et al., 1994
Penaeus monodon	Lindane, phosphamidon	Inhibition de la mue	Reddy et Rao, 1987
Rhithropanopeus harrisii	Fenoxycarbe	Inhibition du développement, 48 $\mu g/L$; inhibition de la croissance, 100 000 $\mu g/L$	Cripe et al., 2003 Nates et McKenney, 2000
Rhithropanopeus harrisii	RH 5849	Accélération de la mue, 100-1 000 µg/L	Clare et al., 1992
Rhithropanopeus harrisii	(S)-méthoprène	Inhibititon du développement larvaire, 100 $\mu g/L$	Celestial et McKenney, 1994

<i>Uca pugilator</i> (adultes)	Aroclore 1242 (a), OCDF (b)	Inhibititon de la mue, 8 μ g/L (a), 1.6 η g/L (b)	Fingerman et Fingerman, 1997
Uca pugilator (juvéniles)	Diflubezuron	Réduction de la fréquence de mue, 20-200 µg/L	Cunningham et Myers, 1987
20-HE : 20-Hydroxyecdys	one ; 4-OP : 4-Octylphénol ; BaP :	Benzo(a)pyrène ; BDE : Brominated diphenyl ether	: ; BPA : Bisphénol A ; CPA :
Cyprotérone acétate ; DC	A: 3,4 Dichloroaniline; DEHP:	Di(2-éthylhexyl)phthalate ; DEP : Diéthyl phthala	tte; DES: Diéthylstilbestrol;
DES: Diéthylstilbestrol;	EE2: 17α – Ethinylestradiol; H	IAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques ;	ICI : Industries Chimiques
Impériales ; JH-III : Hori	mone Juvénile III ; NP: Nonylphér	nol ; NPEO: Nonyphénol éthoxylate ; OCDF: O	octachlorodibenzofuran ; p,p'-
DDE : 1,1-Dichloro-2,2-b	vis(4-chlorophényl)éthylène; PCB:	Polychlorinated biphényl; PoA: Ponasterone A	; RH: Rohm et Haas Co.;
TBBPA : Tétrabromobispl	hénol A; TBP:2,4,6-Tribromoph	nénol; TCDD: 2, 3, 7, 8-Tétrachlorodibenzo-p-dixi	n.

CemOA : archive ouverte d'Irstea / Cemagref

<u>Résumé</u>

L'émergence de programmes et directives, visant à mieux évaluer l'état écologique des milieux aquatiques et à mieux les protéger par une meilleure gestion des nouvelles molécules mises sur le marché, ont conduit au développement d'outils capables d'établir un diagnostic précis de la qualité biologique des écosystèmes. Parmi les différents outils développés, les biomarqueurs sont considérés comme toxicologiquement pertinents et capables de détecter précocement l'exposition et/ou les effets d'une contamination. Dans ce contexte, nos travaux ont eu pour objectifs de développer des biomarqueurs spécifiques de l'impact de composés neurotoxiques (*i.e.* l'activité des cholinestérases) et de perturbations endocriniennes en lien avec la reproduction (*i.e.* la synthèse de vitellogénine) chez une espèce de crustacé d'intérêt écotoxicologique, l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*.

Les résultats de nos travaux ont permis de mettre en évidence que *G. fossarum* ne possède qu'une isoforme de type acétylcholinestérase (AChE), avec une forte sensibilité pour le chlorpyrifos (CI_{50} -96h = 0.35 µg.l⁻¹), un des organophosphorés les plus utilisés et rejetés dans le milieu. Les facteurs biotiques (*i.e.* taille et statut reproducteur) ont été montrés comme la principale source de variabilité naturelle de l'activité AChE chez cette espèce. De ce fait, la sélection d'organismes de phénotype mâle avec un poids de 15-20 mg a permis de proposer une méthodologie de dosage fiable et robuste pour la mesure de cette activité. Un suivi de 13 mois nous a permis de définir, pour cette activité, une valeur de référence (8.4 nmol.min⁻¹) et une valeur seuil (7.4 nmol.min⁻¹) audessous de laquelle l'activité est significativement inhibée et reflète une exposition à des composés anti-ChE. Nos travaux sur l'AChE, ont également permis de montrer qu'il n'existe aucune relation entre l'inhibition de cette activité enzymatique et la mortalité. En revanche, une relation directe a été observée entre l'activité AChE et le comportement alimentaire et locomoteur, et ceci aussi bien avec l'organophosphoré le chlorpyrifos qu'avec le carbamate le méthomyle. Enfin, l'utilisation couplée de tests *in situ* et de la mesure de l'activité AChE s'est révélée être un outil pertinent pour l'évaluation d'une contamination et de l'impact des milieux liés à la présence de composés anti-cholinestérasiques.

La description des processus physiologiques, liés au cycle de reproduction des femelles (*i.e.* cycle de mue, croissance des ovocytes et développement embryonnaire), a apporté les bases pour le développement de l'expression de la Vtg comme biomarqueur. Cela nous a également permis de développer un bioessai de reprotoxicité reproductible et robuste avec une très faible variabilité des valeurs de base observées chez les individus non impactés. Les niveaux d'expression du gène Vtg observés chez les femelles étaient de 200 à 700 fois plus élevés que chez les mâles. Les femelles présentent une importante élévation de la synthèse de Vtg au cours de leur cycle de reproduction, concordante avec la mise en place de la vitellogénèse secondaire. L'induction de l'expression du gène Vtg a été observée chez des mâles exposés, en laboratoire, à des perturbateurs endocriniens modèles et chez des individus exposés in situ, dans des milieux soumis à une pression anthropique.

Mots clés : Acetycholinestérase; Biomarqueur; Bio-test; Comportement; Cycle de reproduction et de mue; *Gammarus fossarum*; Milieu dulçaquicole; Neurotoxicité; Perturbation endocrinienne; Reprotoxicité; Valeur de référence; Valeurs seuils; Vitéllogénine.

Abstract

Programs and directives, aiming at a better assessment of ecological condition of water environments and at improving their protection through a better management of new launched molecules came out. They implied the development of tools which enable to make precise diagnosis for biologic quality of ecosystem. Among these tools, biomarkers are considered as toxicologically relevant and competent for early detection of contamination exposure and/or effects. In that context, our works aimed at developing specific biomarkers for neurotoxic compound impacts (*i.e.* cholinesterase activity) and endocrine disruptions linked to reproduction (*i.e.* vitellogenine synthesis) in freshwater amphipod Gammarus fossarum which is an ecotoxicologically interesting crustacean species.

The results of our works allowed to highlight that *G. fossarum* owns only an isoforme of type acetylcholinesterase (AChE), with a strong sensibility toward chlorpyrifos (CI_{50} -96h = 0.35 µg.l⁻¹), one of the organophosphate the most used and thrown back in the environment. Biotic factors (*i.e.* size and the reproductive status) have been shown as the main source of natural variability of the activity AChE in this species. Therefore, the selection of organisms with male phenotype and a body-weight of 15-20 mg allowed to propose a methodology of reliable and strong dosage for the measure of this activity. A follow-up study of 13 months allowed us to define, for this activity, a reference value (8.4 n.mol.min⁻¹) and a value threshold (7.4 n.mol.min⁻¹) below which the activity is significantly inhibited and reflects an exposure to anti-ChE compound. Our works on the AChE, also demonstrated that there is no relation between the inhibition of this enzymatic activity and the mortality. On the other hand, a direct relation was observed between the activity AChE and the feeding and locomotor behaviours, and this as well with the organophosphate, chlorpyrifos as with the carbamate, methomyl. Finally, the coupled use of *in situ* bioassays and measure of the activity AChE showed to be a relevant tool for the environmental assessment of anti-ChE compound impact.

The description of the physiological processes, bound to the reproduction cycle of females (*i.e.* moult cycle, oocyte growth and embryonic development), brought bases for the development of the Vtg gene expression as biomarker. It also allowed to develop a robust and reproducible reprotoxicity-test displaying a very weak variability of the basic values observed in the non-impacted organisms. Females present an important rise of the Vtg synthesis during their reproduction cycle, corresponding with the implementation of the secondary vitellogenesis process. The induction of the Vtg gene expression was observed in males exposed in laboratory to model endocrine disrupters and in organisms exposed *in situ*, in areas subjected to an anthropological pressure.

Keywords : Acetylcholinesterase; Biomarker; Bio-test; Behaviour; Endocrine disruption; Freshwater environment; *Gammarus fossarum*; Moult and reproductive cycle; Neurotoxicity; Reference value; Threshold value; Reprotoxicity; Vitellogenin.