

**UNIVERSITE DE NANTES**  
**FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

**ACTIVITÉ VITELLOGÉNIQUE ET STÉROÏDIENNE CHEZ *MYA ARENARIA***  
**(MOLLUSQUE BIVALVE) DURANT LA GAMÉTOGENÈSE**  
**ET EN RÉPONSE À UNE EXPOSITION AU 17 $\beta$ -ŒSTRADIOL**

**THESE DE DOCTORAT**

**Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIE**  
**Discipline OCEANOGRAPHIE**  
**Spécialité ECOTOXICOLOGIE**

*présentée*  
*et soutenue publiquement par*

**SOPHIE GAUTHIER-CLERC**

le 30 octobre 2003, devant le jury ci-dessous

***Président***        **Mme AUDET Céline, Professeure, Université du Québec à Rimouski**

***Rapporteurs***    **Mme AUDET Céline, Professeure, Université du Québec à Rimouski**  
**M. LÉBOULENGER François, Professeur, Université du Havre**

***Examineurs***    **Mme PELLERIN Jocelyne, Professeure, Université du Québec à Rimouski**  
**M. AMIARD Jean-Claude, Directeur de Recherche CNRS, Université de Nantes**

***Directeurs de thèse***  
**Mme PELLERIN Jocelyne et M. AMIARD Jean-Claude**

## TABLE DES MATIÈRES

<u>REMERCIEMENTS</u> .....	vi
<u>RÉSUMÉ</u> .....	viii
<u>Liste des tableaux</u> .....	xi
<u>Liste des figures</u> .....	xiii
<u>Liste des abréviations</u> .....	xvii
<u>AVANT-PROPOS</u> .....	1
<u>INTRODUCTION GÉNÉRALE</u> .....	2
<u>CHAPITRE 1 PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS</u> .....	7
1.1. <u>PROBLÉMATIQUE</u> .....	8
1.1.1. <u>Mya arenaria : mollusque bivalve endobenthique</u> .....	8
1.1.1.1. <u>Présentation générale</u> .....	8
1.1.1.2. <u>Constat d'une perturbation de la vitellogenèse chez Mya arenaria</u> <u>?</u> .....	11
1.1.1.3. <u>Autres perturbations observées chez Mya arenaria et</u> <u>potentiellement liées à une perturbation endocrinienne</u> .....	14
1.2. <u>OBJECTIFS</u> .....	15
<u>CHAPITRE II REVUE DE LITTÉRATURE</u> .....	18
2.1. <u>ACTIVITÉ ENDOCRINIENNE ET VITELLOGÉNIQUE CHEZ LES</u> <u>BIVALVES</u> .....	19

2.1.1.	<u>Les neurotransmetteurs</u> .....	19
2.1.1.1.	<u>Lieu de synthèse et nature</u> .....	19
2.1.1.2.	<u>Implication dans la multiplication des gamètes</u> .....	21
2.1.1.3.	<u>Implication dans la vitellogenèse</u> .....	23
2.1.1.4.	<u>Implication dans la régulation des réserves énergétiques pour soutenir l'effort de reproduction: contrôle endocrinien du métabolisme du glycogène</u> .....	23
2.1.1.5.	<u>Implication dans la régulation de la ponte</u> .....	24
2.1.2.	<u>Les hormones stéroïdiennes</u> .....	25
2.1.2.1.	<u>Mise en évidence de la stéroïdogenèse chez les bivalves</u> .....	25
2.1.2.2.	<u>Implication dans le contrôle endocrinien de la reproduction des bivalves</u> .....	32
2.1.3.	<u>Les prostaglandines</u> .....	35
2.1.4.	<u>Résumé des régulations hormonales identifiées chez les bivalves au cours de la reproduction</u> .....	37
2.1.5.	<u>La vitellogenèse chez les bivalves</u> .....	39
2.1.5.1.	<u>Le déroulement de la vitellogenèse</u> .....	39
2.1.5.2.	<u>Présence de vitellines chez les bivalves</u> .....	41
2.1.5.3.	<u>Contrôle endocrinien de la synthèse de vitellines chez les bivalves</u> ..	45
2.2.	<u>LES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS</u> .....	46
2.2.1.	<u>Définition et risques associés</u> .....	46
2.2.2.	<u>Le cas des xéno-œstrogènes</u> .....	52
2.2.2.1.	<u>Identification et mode d'action</u> .....	52
2.2.2.2.	<u>Leur présence en milieu aquatique</u> .....	56
2.2.2.3.	<u>Utilisation de la vitellogénine et des protéines apparentées aux vitellines comme biomarqueur d'exposition aux xénoœstrogènes</u> .....	58
2.2.2.4.	<u>Les autres effets observés dans le cas d'exposition aux xéno- œstrogènes</u> .....	64
2.3.	<u>LES PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ LES INVERTÉBRÉS</u> .....	65

<b><u>CHAPITRE III</u></b>	<b><u>LA VITELLOGENÈSE CHEZ <i>MYA ARENARIA</i></u></b>	<b>74</b>
<b><u>3.1.</u></b>	<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>75</b>
<b><u>3.2.</u></b>	<b><u>MATÉRIEL ET MÉTHODE</u></b>	<b>76</b>
<b><u>3.2.1.</u></b>	<b><u>Échantillonnage des myes</u></b>	<b>76</b>
<b><u>3.2.1.1.</u></b>	<b><u>Le site d'échantillonnage</u></b>	<b>76</b>
<b><u>3.2.1.2.</u></b>	<b><u>Fréquence d'échantillonnage et sélection des myes</u></b>	<b>76</b>
<b><u>3.2.2.</u></b>	<b><u>Étude histologique de la gonade</u></b>	<b>79</b>
<b><u>3.2.2.1.</u></b>	<b><u>Préparation des coupes histologiques</u></b>	<b>79</b>
<b><u>3.2.2.2.</u></b>	<b><u>Examen histologique de la gonade et de la croissance des ovocytes</u></b>	<b>79</b>
<b><u>3.2.3.</u></b>	<b><u>Dosages biochimiques pour déterminer l'activité synthétique de la gonade</u></b>	<b>81</b>
<b><u>3.2.3.1.</u></b>	<b><u>Dosage des protéines</u></b>	<b>81</b>
<b><u>3.2.3.2.</u></b>	<b><u>Dosage des acides nucléiques</u></b>	<b>81</b>
<b><u>3.2.4.</u></b>	<b><u>Immunoréactivité des vitellines de <i>Mya arenaria</i> avec l'anticorps de <i>Patinopecten yessoensis</i> et dosage semi-quantitatif par ELISA</u></b>	<b>82</b>
<b><u>3.2.5.</u></b>	<b><u>Vers une caractérisation des vitellines de <i>Mya arenaria</i></u></b>	<b>85</b>
<b><u>3.2.6.</u></b>	<b><u>Traitement des données</u></b>	<b>86</b>
<b><u>3.3.</u></b>	<b><u>RÉSULTATS ET DISCUSSION</u></b>	<b>87</b>
<b><u>3.3.1.</u></b>	<b><u>Description de la croissance des ovocytes durant la vitellogenèse</u></b>	<b>87</b>
<b><u>3.3.2.</u></b>	<b><u>Déroulement de la gamétogenèse de mai à novembre 1999</u></b>	<b>90</b>
<b><u>3.3.3.</u></b>	<b><u>Variation de l'activité synthétique de la gonade durant le processus de maturation sexuelle</u></b>	<b>91</b>
<b><u>3.3.4.</u></b>	<b><u>Potentiel d'immunoréactivité des vitellines de <i>Mya arenaria</i> avec l'antisérum anti-FSP de <i>P. yessoensis</i></u></b>	<b>96</b>
<b><u>3.3.5.</u></b>	<b><u>Premier pas vers une caractérisation de vitellines chez <i>Mya arenaria</i></u></b>	<b>100</b>
<b><u>3.4.</u></b>	<b><u>CONCLUSION</u></b>	<b>104</b>

<b><u>CHAPITRE IV</u></b>	<b><u>ACTIVITÉ STÉROÏDIENNE CHEZ MYA ARENARIA</u></b>	
<b><u>DURANT LA GAMÉTOGÈSE</u></b>		<b>106</b>
4.1.	<u>INTRODUCTION</u>	107
4.2.	<u>MATÉRIEL ET MÉTHODE</u>	110
4.2.1.	<u>Échantillonnage des myes</u>	110
4.2.2.	<u>Étude histologique de la gonade des mâles</u>	110
4.2.3.	<u>Dosages biochimiques pour décrire l'activité synthétique de la gonade des mâles</u>	112
4.2.4.	<u>Dosages du 17<math>\beta</math>-œstradiol et de la testostérone</u>	112
4.2.4.1.	<u>Extraction des stéroïdes</u>	112
4.2.4.2.	<u>Dosage par ELISA du 17<math>\beta</math>-œstradiol et de la testostérone</u>	113
4.2.5.	<u>Traitement de données</u>	113
4.3.	<u>RÉSULTATS ET DISCUSSION</u>	114
4.3.1.	<u>Redéfinition des stades de maturité de la gonade mâle chez <i>Mya arenaria</i></u>	114
4.3.2.	<u>Description de la gamétogenèse chez les mâles <i>Mya arenaria</i> et de l'activité synthétique de la gonade</u>	117
3.1.1.1.	<u>Déroulement de la gamétogenèse chez les mâles de mai à novembre 1999</u>	117
4.3.2.1.	<u>Variation de l'activité synthétique de la gonade mâle durant la gamétogenèse</u>	119
4.3.3.	<u>Concentrations en 17<math>\beta</math>-œstradiol et en testostérone dans les gonades de mâles et de femelles durant la gamétogenèse</u>	126
4.4.	<u>CONCLUSION</u>	137
<b><u>CHAPITRE V</u></b>	<b><u>EFFETS DE L'EXPOSITION <i>IN VIVO</i> DE MYA ARENARIA</u></b>	
<b><u>AU 17<math>\beta</math>-ŒSTRADIOL SUR L'ACTIVITÉ VITELLOGÉNIQUE ET LA</u></b>	<b><u>MOBILISATION DES RÉSERVES EN GLYCOGÈNE.</u></b>	<b>140</b>
5.1.	<u>INTRODUCTION</u>	141

<u>5.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE</u> .....	143
<u>5.2.1. Protocole d'exposition des myes au 17<math>\beta</math>-œstradiol</u> .....	143
<u>5.2.1.1. Échantillonnage des myes</u> .....	144
<u>5.2.1.2. Mode d'administration et durée de l'exposition au 17<math>\beta</math>-œstradiol</u> ..	145
<u>5.2.1.3. Prélèvements biologiques réalisés au terme des 48 h d'exposition</u> <u>au 17<math>\beta</math>-œstradiol</u> .....	146
<u>5.2.2. Sexage par un examen histologique</u> .....	147
<u>5.2.3. Dosages biochimiques réalisés pour la gonade</u> .....	147
<u>5.2.3.1. Évaluation de l'activité synthétique des gonades</u> .....	147
<u>5.2.3.2. Évaluation de la mobilisation du glycogène</u> .....	147
<u>5.2.3.3. Évaluation de l'immunoréactivité des gonades avec l'antisérum</u> <u>anti-FSP de pétoncle</u> .....	150
<u>5.2.4. Évaluation de l'immunocompétence des myes</u> .....	150
<u>5.2.4.1. Viabilité des hémocytes</u> .....	150
<u>5.2.4.2. Évaluation de la capacité phagocytaire des hémocytes</u> .....	151
<u>5.2.5. Traitements statistiques des données</u> .....	151
<u>5.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION</u> .....	152
<u>5.3.1. Immunocompétence des myes exposées au 17<math>\beta</math>-œstradiol</u> .....	152
<u>5.3.2. Effets de l'exposition des myes au 17<math>\beta</math>-œstradiol sur la mobilisation</u> <u>du glycogène et la synthèse de protéines de type vitelline dans la</u> <u>gonade</u> .....	153
<u>5.3.3. Effet de l'exposition des myes au 17<math>\beta</math>-œstradiol sur l'activité</u> <u>synthétique de la gonade</u> .....	160
<u>5.4. CONCLUSION</u> .....	162
 <u>CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES</u> .....	 165
 <u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u> .....	 175
 <u>ANNEXES</u> .....	 212

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Madame la Professeure-Chercheure Jocelyne Pellerin et Monsieur le Docteur Jean-Claude Amiard pour avoir accepté de co-diriger ce travail de thèse. Grâce à la confiance et au soutien que vous m'avez toujours témoignés Jocelyne, mais aussi grâce à votre constante disponibilité et à vos encouragements, ces années passées à Rimouski n'ont fait qu'alimenter mon goût pour la recherche. Grâce à vous, j'aurai aussi compris qu'il est important et particulièrement stimulant d'entretenir des liens avec d'autres équipes de recherches pour valoriser nos travaux de recherche, enrichir notre champ expertise et développer notre problématique de recherche.

J'exprime, non sans un certain plaisir, toute ma reconnaissance à Madame la Professeure-Chercheure Céline Audet de l'ISMER-UQAR d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi qu'à Monsieur le Professeur François Leboulenger de l'Université du Havre pour avoir accepté de juger ce travail malgré ses nombreuses occupations.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères au Professeur Makoto Osada de l'Université de Tohoku pour nous avoir fourni l'antisérum produit contre la vitelline de pétoncle ainsi qu'au Docteur François Gagné du Centre Saint-Laurent de Environnement Canada pour son aide lors de l'utilisation de l'antisérum pour les dosages par ELISA. Je tiens également à remercier chaleureusement le Docteur Michel Fournier et son équipe de l'INRS-Santé Institut Armand-Frappier, pour avoir évalué l'immunocompétence des myes exposées aux différentes doses de  $17\beta$ -œstradiol et

présentée au chapitre 5. Enfin, je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Docteur Robert Roy ainsi qu'à Domyrick Maltais de l'Institut Maurice-Lamontage de Pêches et Océans Canada, pour avoir accepté avec enthousiasme de réaliser l'exposition des myes au  $17\beta$ -œstradiol présentée en annexe 1 et pour avoir fait les premiers pas vers l'isolement de la vitelline de *Mya arenaria*.

Je n'oublierai pas de saluer toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à l'ISMER durant ce doctorat: étudiants et amis, professeurs, techniciens et secrétaires. Merci de votre bonne humeur, de votre soutien et de votre amitié. Je désire également remercier l'Institut des Sciences de la Mer de Rimouski et le groupement inter-institutionnel Québec-Océan pour leur soutien financier durant ce doctorat.

Enfin, je tiens à remercier mes parents pour la confiance qu'ils m'ont toujours accordée ainsi que pour leur soutien qui malgré la distance était toujours palpable. Vous avez toujours respecté mes choix même si certains n'étaient pas toujours faciles à accepter mais vous ne pouviez me donner une plus belle preuve d'amour et de confiance.



## RÉSUMÉ

Les connaissances actuelles sur le processus vitellogénique et l'activité stéroïdienne des bivalves sont restreintes. Un nombre croissant d'études montre cependant que des protéines de type vitelline sont présentes et inductibles par les œstrogènes chez certains bivalves et que les hormones stéroïdiennes sont effectivement présentes chez les bivalves. Notre étude avait donc pour but d'apporter de nouvelles connaissances sur le processus vitellogénique chez *Mya arenaria*, sur la présence de testostérone et de  $17\beta$ -œstradiol dans la gonade et sur l'effet d'une exposition au  $17\beta$ -œstradiol sur la mobilisation des réserves énergétiques et la synthèse de protéines de type vitelline dans la gonade. *Mya arenaria* est une espèce indicatrice de choix en écotoxicologie et ces nouvelles connaissances seront indispensables dans la perspective d'un développement de biomarqueur chez la mye dans la problématique des perturbateurs endocriniens, en particulier des protéines de type vitelline comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes au même titre que la vitellogénine déjà utilisée depuis de nombreuses années chez les vertébrés ovipares. Notre étude a permis de décrire durant la gamétogenèse une séquence vitellogénique chez les femelles. L'accroissement du diamètre moyen des ovocytes est représentatif de l'avancement du processus vitellogénique et représente une façon efficace de rendre compte de l'état de maturité de la gonade. L'activité synthétique de la gonade (concentrations en ADN et en ARN) est également représentative de l'état de maturité de la gonade chez les femelles comme chez les mâles pour lesquels nous avons également redéfini le développement de la gonade de manière plus précise. L'utilisation d'un antisérum spécifique à des protéines spécifiques aux femelles (ou FSP) de pétoncle *Patinopecten yessoensis* nous a

permis de constater une réaction croisée avec la gonade de femelles *Mya arenaria*. Cet antisérum reconnaît un ou plusieurs précurseurs de protéine(s) de type vitelline chez *Mya arenaria*, présents au début de la vitellogenèse (stade indifférent et pré-vitellogénique). La synthèse de vitelline(s) chez *Mya arenaria* relèverait donc d'un processus hétérosynthétique (synthèse d'un précurseur dans les cellules folliculaires de la gonade) et/ou autosynthétique (synthèse au sein même de l'ovocyte). L'utilisation de techniques de biologie moléculaire nous permettrait d'isoler la ou les protéines présentes dans la gonade des myes femelles et reconnue(s) par l'antisérum anti-FSP de pétoncle. Des techniques d'immunohistologie nous permettraient également de visualiser la localisation de ces protéines dans la gonade pour confirmer l'hypothèse d'une hétérosynthèse. L'inductibilité de cette ou de ces protéines de type vitelline par le 17 $\beta$ -œstradiol nous encourage cependant à poursuivre nos recherches pour la validation de leur utilisation chez la mye comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes dans un futur proche. Le 17 $\beta$ -œstradiol et la testostérone sont d'ailleurs présents dans la gonade des myes mâles et femelles et leurs concentrations sont comparables chez les deux sexes. Elles varient durant la gamétogenèse de 195 à 412 ng·g<sup>-1</sup> de tissu frais pour le 17 $\beta$ -œstradiol et de 19,1 à 29,8 ng·g<sup>-1</sup> de tissu frais pour la testostérone. Bien que la variation de ces concentrations ne soit pas très importante durant la gamétogenèse, ces hormones pourraient participer à la régulation de processus physiologiques et en particulier celui contrôlant la maturation sexuelle au début du développement des gamètes et au moment de la ponte pour le 17 $\beta$ -œstradiol. L'exposition des myes au 17 $\beta$ -œstradiol a provoqué une augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase bien que la concentration en glycogène n'ait pas varié au terme de 48 heures d'exposition. Ce résultat et l'effet inducteur du 17 $\beta$ -œstradiol sur la synthèse de protéines de type

vitelline observé durant notre étude et rapporté chez d'autres bivalves, tendent à montrer que cette hormone pourrait être impliquée dans la régulation de la mobilisation des réserves énergétiques et/ou dans l'induction directe de la synthèse de protéines de type vitelline. Nos résultats nous permettent donc de formuler différentes pistes d'investigations sur la nature des protéines de type vitelline, leur mode de synthèse et leur inductibilité par les œstrogènes en ayant pour perspective l'intérêt de leur utilisation en aquaculture et en écotoxicologie.

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE II

<u>Tableau 2-1: Enzymes participant à la stéroïdogénèse répertoriées dans la littérature chez les bivalves.</u> .....	28
<u>Tableau 2-2: Hormones stéroïdiennes répertoriées chez différents bivalves dans divers tissus.</u> .....	31
<u>Tableau 2-3: Classes de composés identifiés comme xéno-œstrogènes.</u> .....	55
<u>Tableau 2-4: Effet œstrogénique de différents composés observés <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> vis à vis de la synthèse de vitellogénine ou de protéines apparentées aux vitellines chez différentes espèces.</u> .....	60

### CHAPITRE III

<u>Tableau 3-1: Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade femelle d'après Ropes &amp; Stickney (1965).</u> .....	81
<u>Tableau 3-2: Classes distinctes (<math>p &lt; 0,05</math>) de taille du diamètre moyen de l'ovocyte (<math>\emptyset</math>) selon le degré d'avancement du processus vitellogénique.</u> .....	87
<u>Tableau 3-3: Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade femelle d'après l'étude histologique de la vitellogénèse.</u> .....	90
<u>Tableau 3-4: Corrélation de Spearman entre les paramètres biochimiques (ADN, ARN, protéines) et le diamètre moyen des ovocytes.</u> .....	96
<u>Tableau 3-5: Caractérisations de protéines de réserve rapportées dans la littérature chez différents bivalves.</u> .....	101
<u>Tableau 3-6: Analyse densitométrique de la région de grande masse moléculaire (<math>&gt; 400</math> kDa) du gel d'électrophorèse PAGE réalisé avec les extraits de gonades de femelles à différents stades de développement.</u> .....	103

### CHAPITRE IV

<u>Tableau 4-1: Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade mâle d'après Ropes &amp; Stickney (1965).</u> .....	111
---	-----

<b><u>Tableau 4-2: Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade mâle d'après l'étude histologique du développement des gamètes.</u></b> .....	115
<b><u>Tableau 4-3: Correspondance entre les stades de développement de la gonade chez les mâles et les femelles.</u></b> .....	117
<b><u>Tableau 4-4: Concentrations en testostérone et en 17<math>\beta</math>-œstradiol rapportées dans la littérature durant la gamétogenèse chez différents bivalves et différents tissus, ou déterminées pour un mois donné ou un certain stade de développement de la gonade indiqué entre parenthèses.</u></b> .....	128
<b><u>Tableau 4-5: Concentrations moyennes (<math>\pm</math> écart-type) en 17<math>\beta</math>-œstradiol (E2) et en testostérone (T) déterminées dans la glande digestive de femelles à différents stades de la gamétogenèse.</u></b> .....	136

## CHAPITRE V

<b><u>Tableau 5-1: Résultats de l'évaluation de l'immunocompétence des myes au terme de l'exposition au 17<math>\beta</math>-œstradiol.</u></b> .....	153
---	-----

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE I

<u>Figure 1-1: <i>Mya arenaria</i>, mollusque bivalve endobenthique avec son siphon inhalant et exhalant.</u>	8
<u>Figure 1-2: Cycle de maturation sexuelle chez <i>Mya arenaria</i> dans l'estuaire du Saint-Laurent de mai à octobre 1997 (tirée de Gauthier-Clerc, 1998).</u>	9
<u>Figure 1-3: Répartition en pourcentage des réserves énergétiques dans la gonade de <i>Mya arenaria</i> dans l'Estuaire du Saint-Laurent de mai à octobre 1997 (tirée de Gauthier-Clerc (1998)).</u>	10

### CHAPITRE II

<u>Figure 2-1: Représentation des composantes enzymatiques et hormonales de la stéroïdogénèse rencontrées chez les bivalves.</u>	27
<u>Figure 2-2: Représentation schématique de la synthèse des hormones stéroïdiennes à l'échelle de la cellule (modifiée de Hall, 1986).</u>	29
<u>Figure 2-3: Représentation schématique de la synthèse des hormones stéroïdiennes au sein du système du CytP450 enchassé dans la membrane des microsomes (modifiée de Hall, 1986).</u>	29
<u>Figure 2-4: Schématisation de l'action d'hormones identifiées chez les bivalves au cours de la reproduction et mentionnées dans les sections 2.1.1, 2.1.2 et 2.1.3.</u>	38
<u>Figure 2-5: Modèle simplifié de la dynamique des hormones; modifiée de Crain <i>et al.</i> (2000).</u>	47
<u>Figure 2-6: Contrôle œstrogénique de la synthèse de vitellogénine chez les vertébrés ovipares.</u>	59
<u>Figure 2-7: Phylogénie de l'usage des hormones chez les chordés et les invertébrés; modifiée de Leblanc (2000).</u>	66

### CHAPITRE III

<u>Figure 3-1: Représentation schématique de la méthodologie utilisée pour l'étude de la vitellogenèse chez <i>Mya arenaria</i>.</u> .....	77
<u>Figure 3-2: Présentation du site d'échantillonnage de Métis sur Mer et des myes échantillonnées pour les dissections de la gonade.</u> .....	78
<u>Figure 3-3: Coupes histologiques de gonade femelle de <i>Mya arenaria</i> a) au stade pré-vitellogénique; b) au stade vitellogénique; c) au stade post-vitellogénique.</u> .....	89
<u>Figure 3-4: Déroulement saisonnier de la gamétogenèse chez <i>Mya arenaria</i> femelle de mai à novembre 1999 et variation de l'indice de maturité (IM).</u> .....	91
<u>Figure 3-5: Concentration moyennes (<math>\pm</math> erreur type) en protéines suivant le stade de développement de la gonade femelle.</u> .....	93
<u>Figure 3-6: Variation a) des concentrations moyennes (<math>\pm</math> erreur type) en ADN et en ARN et b) des ratios moyens (<math>\pm</math> erreur type) ARN/ADN suivant le stade de développement de la gonade femelle.</u> .....	94
<u>Figure 3-7: Potentiel d'immunoréactivité moyen (<math>\pm</math> erreur type) des vitellines avec l'antisérum anti-FSP de <i>P. yessoensis</i> (%) a) en fonction du stade de développement de la gonade femelle et b) en fonction du diamètre moyen des ovocytes.</u> .....	97
<u>Figure 3-8: Potentiel d'immunoréactivité moyen (<math>\pm</math> erreur type) avec l'antisérum anti-FSP de <i>P. yessoensis</i> (%) déterminé pour les fractions S15 de gonades de mâles à différents stades de développement.</u> .....	99
<u>Figure 3-9: Gel d'électrophorèse des fractions S15 de la gonade femelle à différents stades de développement.</u> .....	102

### CHAPITRE IV

<u>Figure 4-1: Coupes histologiques (grossissement x 250) de gonades de mâle <i>Mya arenaria</i> a) au stade de développement 1 (d1); b) au stade de développement 2 (d2); c) au stade mûr.</u> .....	116
---	-----

<b>Figure 4-2:</b> Déroulement saisonnier de la gamétogenèse chez les mâles <i>Mya arenaria</i> de mai à novembre 1999 et variation mensuelle de l'indice de maturité (IM).....	118
<b>Figure 4-3:</b> Concentrations moyennes ( $\pm$ erreur type) en protéines dans la gonade mâle a) de mai à novembre 1999 et b) pour chaque stade de développement de la gonade.....	120
<b>Figure 4-4:</b> Concentrations moyennes ( $\pm$ erreur type) en ADN et en ARN de la gonade mâle a) de mai à novembre 1999 et b) pour chaque stade de développement de la gonade.....	122
<b>Figure 4-5:</b> Valeurs moyennes du ratio ARN/ADN dans la gonade mâle ( $\pm$ erreur type) a) de mai à novembre 1999 et b) pour chaque stade de développement de la gonade.....	125
<b>Figure 4-6:</b> Concentrations moyennes ( $\pm$ erreur type) en $17\beta$ -œstradiol (E2) et en testostérone (T) dans la gonade mâle et femelle suivant son stade de développement.....	127
<b>Figure 4-7:</b> Régressions linéaires entre le diamètre moyen des ovocytes durant la vitellogenèse et a) la concentration moyenne en $17\beta$ -œstradiol (E2) dans la gonade ou b) la valeur du ratio testostérone/ $17\beta$ -œstradiol (T/E2) dans la gonade.....	133
<b>Figure 4-8:</b> Valeurs moyennes ( $\pm$ erreur type) du ratio T/E2 pour chaque stade de développement de la gonade mâle et femelle.....	134

## CHAPITRE V

<b>Figure 5-1:</b> Montage expérimental utilisé pour l'exposition des myes aux trois doses de $17\beta$ -œstradiol (E2).....	145
<b>Figure 5-2:</b> Photographie de l'injection de $17\beta$ -œstradiol dans le muscle adducteur des myes.....	146
<b>Figure 5-3:</b> a) Concentrations moyennes en glycogène ( $\pm$ erreur type) et b) Activité moyenne de la glycogène phosphorylase ( $\pm$ erreur type) dans la gonade des myes mâles et femelles témoins et exposées au $17\beta$ -œstradiol.....	154
<b>Figure 5-4:</b> Potentiel d'immunoréactivité moyen ( $\pm$ erreur type) des vitellines dans les gonades des myes mâles et femelles témoins et exposées au $17\beta$ -œstradiol.....	157
<b>Figure 5-5:</b> Concentrations moyennes ( $\pm$ erreur type) en protéines dans les gonades des myes mâles et femelles témoins et exposées au $17\beta$ -œstradiol.....	159



**Figure 5-6:** Concentrations moyennes ( $\pm$  erreur type) a) en ADN et b) en ARN dans les gonades des myes mâles et femelles témoins et exposées au  $17\beta$ -œstradiol..... 161

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- AhR: récepteur Aryl hydrolase
- Anti-IL: anti-insulin-like
- BPCs: biphénylpolychlorés
- CNS: cellules neurosécrétrices
- Cyt P450: cytochrome P450
- E1: œstrone
- E2: 17 $\beta$ -œstradiol
- E3: œstriol
- EEQ: estrogen equivalent
- EE2: éthinyloœstradiol
- ELISA: Enzyme-Link Immunosorbent Assay
- ER: estrogen receptor
- ERE: estrogen responsive element
- EROD: éthoxyresofurine-O-déséthylase
- FSP: female specific protein
- G6PDH: glucose-6-phosphate déshydrogénase
- GMH: Glycogen Mobilizing Hormone
- GMSF: Gonial Mitosis-Stimulation Factor
- HAP: hydrocarbure aromatique polycyclique
- HSD: hydroxystéroïde déshydrogénase
- IGS: indice gonado-somatique
- IM: indice de maturité

OP: octylphénol

NP: nonylphnol

NPxEO: nonlyphénol polyéthoxylates

P: progestérone

PCDD: polyclorodibenzodioxine

PGs: prostaglandines

PGE<sub>2</sub>: prostaglandine de type E<sub>2</sub>

PgluM: phosphoglucomutase

QSAR: Quality Structure Activity Relation

T: testostérone

TAG: triacylglycérol

TBT: tributylétain

TCDD: tetrachlorodibenzodioxine

TEQ: toxic equivalent quantity

TH: testostérone hydrolase

VHDL: very high density lipid

VTG: vitellogénine

Vn: vitelline

## AVANT-PROPOS

Cette étude s'inscrit dans une volonté d'apporter des réponses écophysiologiques concernant le déroulement de la vitellogenèse chez *Mya arenaria* et l'implication des hormones stéroïdiennes durant la reproduction avec une attention particulière pour l'implication du  $17\beta$ -œstradiol dans le processus vitellogénique. Cette thèse s'articulera en quatre chapitres suivis d'une conclusion générale et des perspectives. **Le chapitre I** est consacré à une synthèse bibliographique sur le contrôle endocrinien de la gamétogenèse et de la vitellogenèse chez les bivalves. Par la suite, nous décrivons les différentes perturbations observées chez *Mya arenaria* qui nous permettent d'énoncer l'hypothèse d'un déséquilibre de processus physiologiques régulés par des hormones, avant de nous attarder sur la problématique des perturbateurs endocriniens. Nous décrivons plus en détail les perturbateurs endocriniens qui interfèrent avec les œstrogènes avant de mentionner de manière plus générale les effets répertoriés chez les invertébrés durant des expositions à des perturbateurs endocriniens. Ces différents points nous permettront alors de mettre en exergue nos principaux objectifs pour clore le chapitre. **Le chapitre II** est consacré à la description de la vitellogenèse chez *Mya arenaria* et le chapitre suivant (**chapitre III**) fait la synthèse de ce que nous connaissons en terme de variations saisonnières des concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone chez les myes, mâles et les femelles, en relation avec le cycle gamétogénique. **Le chapitre IV** concerne les effets d'une exposition *in vivo* des myes au  $17\beta$ -œstradiol, sur la synthèse de protéines de type vitelline(s) et sur la mobilisation des réserves énergétiques.

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

De nombreux composants, processus, structures ou fonctions cellulaires et biochimiques sont utilisés comme biomarqueurs en écotoxicologie pour mettre en évidence l'exposition des organismes à des xénobiotiques et/ou les effets de cette exposition (Lagadic *et al.*, 1997). Les biomarqueurs biochimiques désignés sous le terme de biomarqueurs d'exposition résultent généralement de l'interaction des molécules endogènes avec le xénobiotique présent dans l'organisme. Parmi eux, certains sont plus représentatifs de l'exposition à un certain groupe de contaminants, comme l'acétylcholinestérase pour les organochlorés ou les métallothionéines pour les métaux. D'autres biomarqueurs montrent l'effet (toxique ou non) du xénobiotique sur une cible biochimique ou cellulaire. Ils sont alors appelés biomarqueurs d'effet et certains d'entre eux reflètent l'effet global de l'exposition en traduisant l'état de stress de l'organisme (utilisation des réserves énergétiques) ou le fonctionnement de ses systèmes de défense cellulaire (systèmes immunitaires, ou les enzymes du système des monooxygénases). Représentatifs d'une famille de contaminants ou non, les biomarqueurs d'exposition ou d'effet ont une sensibilité plus ou moins importante selon l'espèce choisie comme indicateur.

Depuis une dizaine d'années, certains biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet ont été identifiés comme indiquant une exposition des organismes à des perturbateurs endocriniens capables d'interférer avec l'homéostasie des hormones. Ces biomarqueurs sont représentatifs voire même spécifiques d'une perturbation endocrinienne. Parmi eux figurent des phénomènes de féminisation de mâles ou de masculinisation de femelles qui reflètent un véritable dysfonctionnement hormonal, totalement absent chez les organismes sains. Ils se traduisent alors par des variations des teneurs de variables

biochimiques (activités enzymatiques, concentrations en hormones circulantes, etc) ou par l'apparition de caractères sexuels du sexe opposé exploitables à titre de biomarqueurs. La représentativité des biomarqueurs vis-à-vis des perturbateurs endocriniens doit cependant être démontrée. Une parfaite connaissance de l'endocrinologie des organismes et de l'implication des hormones dans le contrôle des processus physiologiques est nécessaire pour faire le lien entre la réponse du biomarqueur et un dysfonctionnement endocrinien. Différents rapports consacrés aux perturbateurs endocriniens et leurs effets chez la faune sauvage mettent en évidence le peu d'étude concernant les perturbations endocriniennes chez les invertébrés alors que ceux-ci représentent 95 % des espèces animales. Le principal obstacle à cette tâche consiste en la connaissance encore incomplète de l'endocrinologie des invertébrés. Parmi les mollusques marins, les gastéropodes sont utilisés en milieu naturel pour mettre en évidence et de manière spécifique une perturbation endocrinienne engendrée par le tributylétain (TBT) qui est un xénobiotique présent dans les milieux aquatiques (zones côtières, lac ou rivières) du fait de son utilisation jusque dans les années mille neuf cent quatre-vingt dans les peintures anti-salissures de bateaux. Un lien de causalité entre le TBT et l'endocrinologie des gastéropodes a pu être mis en évidence grâce à l'apparition de caractères sexuels secondaires mâles chez les femelles via un dysfonctionnement hormonal. D'autres espèces sentinelles devront cependant être identifiées car la nature des hormones et des processus physiologiques qu'elles contrôlent, varient d'une espèce à l'autre. Un perturbateur endocrinien peut ainsi agir sur une espèce mais pas sur d'autres, bien que toutes soient exposées aux mêmes concentrations de celui-ci. Devant cet état de fait, les effets de l'exposition à l'échelle de la communauté et de l'écosystème sont difficilement prévisibles voire même inconnus

dans la plupart des cas. De récentes études s'avèrent encourageantes dans la perspective d'utiliser le bivalve *Mya arenaria* comme espèce sentinelle dans le cas de perturbations endocriniennes. Il s'agirait de développer un biomarqueur d'exposition impliqué dans la vitellogenèse, semblable à celui déjà utilisé chez les poissons et les batraciens. Durant la vitellogenèse (chez les vertébrés ou invertébrés) les ovocytes sont en développement chez les femelles et stockent des protéines de réserves communément appelées vitellines. Chez les vertébrés ovipares (poissons et batraciens), la vitellogénine est le précurseur des vitellines. La synthèse de vitellogénine est sous le contrôle des hormones femelles (les œstrogènes) et comme leurs concentrations sont faibles chez les mâles, ces derniers ne la produisent pas, bien qu'ils possèdent un gène fonctionnel et inductible pour la synthétiser. La vitellogénine est cependant utilisée comme biomarqueur biochimique d'exposition aux xénobiotiques capables de mimer l'action des œstrogènes car dans ce cas, sa synthèse est induite chez les mâles des vertébrés ovipares. Chez *Mya arenaria*, la synthèse de vitelline(s) apparentée(s) à la vitellogénine semble être inductible par le  $17\beta$ -œstradiol et des xénobiotiques capables de mimer l'action des œstrogènes (Blaise *et al.*, 1999). D'autres observations tendent également à montrer que la condition physiologique et le potentiel reproducteur des myes peuvent être modifiés par la présence de perturbateurs endocriniens (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002; Gagné *et al.*, 2003) ce qui implique qu'une perturbation de l'homéostasie des hormones chez *Mya arenaria* engendrerait des effets mesurables pouvant avoir des conséquences physiologiques importantes. La vitellogenèse n'a pas encore été clairement décrite chez *Mya arenaria* et il est possible que contrairement aux vertébrés ovipares, la synthèse de vitelline(s) soit naturellement effective chez les deux sexes comme cela a pu être observé chez d'autres invertébrés marins comme l'oursin (Harrington & Easton, 1982;



Shyu *et al.*, 1986). Cette dernière information ne remettrait pas en cause l'utilisation de vitelline(s) si leur synthèse s'avère être inductible par les oestrogènes, mais elle est indispensable pour une utilisation adéquate en milieu naturel de ce biomarqueur potentiel.

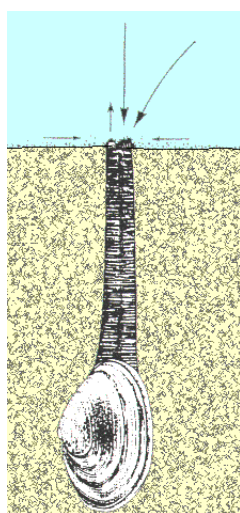
**CHAPITRE 1**  
**PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS**

## 1.1. PROBLÉMATIQUE

### 1.1.1. *Mya arenaria* : mollusque bivalve endobenthique

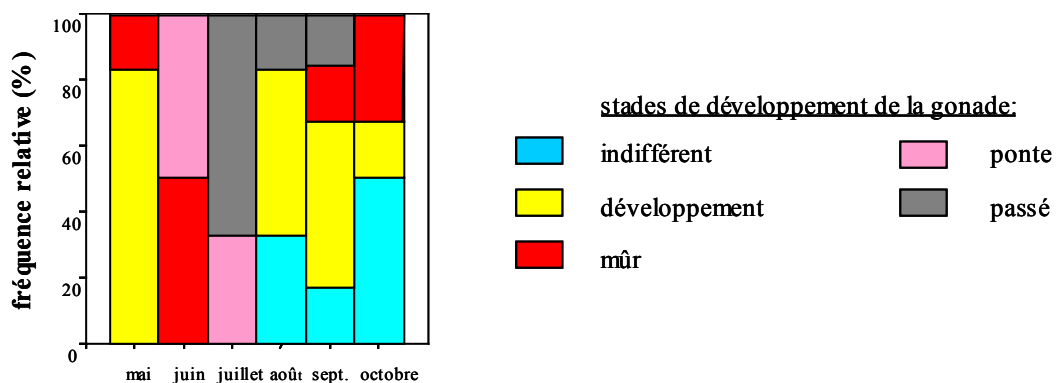
#### 1.1.1.1. Présentation générale

*Mya arenaria* est un Mollusque bivalve pélecypode, suspensivore, filtreur et fouisseur qui vit dès l'âge adulte enfoui dans la matrice sédimentaire en zone intertidale et subtidale. Son siphon inhalant capte les particules en suspension qui sont alors ingérées ou rejetées par le deuxième siphon exhalant (figure 1-1) (Grassé *et al.*, 1970). La répartition géographique de *Mya arenaria* dans l'hémisphère Nord est ubiquiste (Abbott, 1968). Au Québec, elle appartient à la communauté à *Macoma balthica* (Desrosiers & Brêthes, 1984) et son exploitation commerciale y est effective dans un certain nombre de régions. De nombreux recensements ont été réalisés mettant ainsi à jour 14 bancs d'intérêt commercial dans les années 70 (Lamoureux, 1974).



**Figure 1-1:** *Mya arenaria*, mollusque bivalve endobenthique avec son siphon inhalant et exhalant.

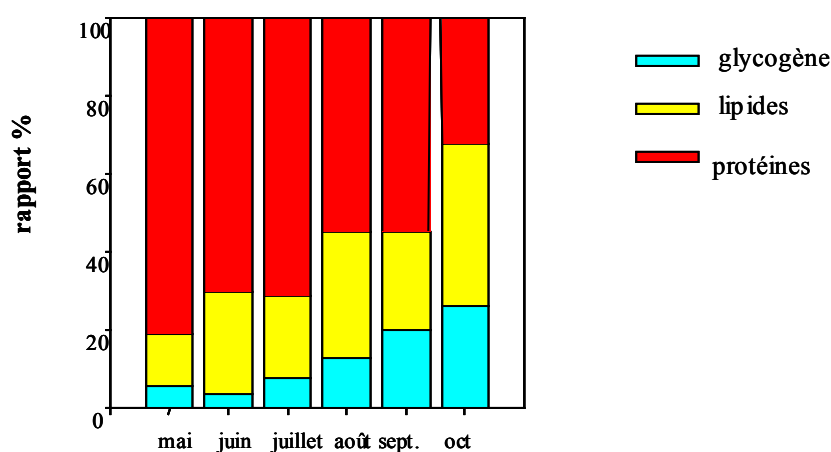
Cet organisme présente une gamétogenèse bimodale dans l'estuaire du Saint-Laurent avec deux périodes de maturation pour la gonade (Roseberry *et al.*, 1991; Tremblay, 1992; Gauthier-Clerc *et al.*, 2002): une première maturation au printemps et l'autre à l'automne (figure 1-2). Ce type de reproduction bimodale reflète un comportement opportuniste (Bayne, 1976) et fait coïncider la période de reproduction avec celle d'un apport nutritionnel optimal du milieu. Chez *Mya arenaria*, comme chez tous les autres bivalves, l'énergie dérivée de l'alimentation et destinée à la gamétogenèse est stockée puis consommée selon un "cycle biochimique" interdépendant de la gamétogenèse (Bayne, 1976). Ce cycle est particulièrement marqué dans la gonade où se développent les gamètes. Un suivi saisonnier, des concentrations en protéines, lipides et glycogène qui sont les trois formes principales des réserves énergétiques (Gabbott & Bayne, 1973), illustre parfaitement ce phénomène chez les myes lors d'une étude sur la rive Nord du



**Figure 1-2:** Cycle de maturation sexuelle chez *Mya arenaria* dans l'estuaire du Saint-Laurent de mai à octobre 1997 (tirée de Gauthier-Clerc, 1998).

La ponte des myes a lieu en juin et juillet dans l'estuaire du Saint-Laurent, suivie d'une nouvelle période de maturation sexuelle avec l'observation de gonades au stade mûr dès le mois de septembre.

Saint-Laurent (figure 1-3). Du mois de mai au mois de juin, alors que l'activité de la gonade est à son maximum et que près de 66% des gonades sont au stade de ponte en juillet, le pourcentage des réserves représenté par le glycogène diminue, alors que celui concernant les lipides augmente (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Ce phénomène illustre d'ailleurs clairement le fait que le glycogène est le principal soutien de la gamétogenèse et est remobilisé durant le processus de vitellogenèse alors que les concentrations en lipides augmentent dans les œufs pour lesquels les lipides sont la principale forme de réserve énergétique (Gabbott & Bayne, 1973). Ce phénomène est également désigné comme un cycle de stockage pour le glycogène (Gabbott, 1975).



**Figure 1-3:** Répartition en pourcentage des réserves énergétiques dans la gonade de *Mya arenaria* dans l'Estuaire du Saint-Laurent de mai à octobre 1997 (tirée de Gauthier-Clerc (1998)).

Le pourcentage de réserves énergétiques sous forme de glycogène est minimal jusqu'au moment de la ponte du fait de la mobilisation des réserves en glycogène pour le stockage de réserves en vitellines. Il augmente ensuite jusqu'en octobre grâce à un apport nutritionnel. L'augmentation de mai à juin du pourcentage en lipides des réserves de la gonade illustre le stockage de réserves en vitellines durant leur maturation des ovocytes. Après la ponte, les réserves lipidiques augmentent grâce à un apport nutritionnel.

### 1.1.1.2. Constat d'une perturbation de la vitellogenèse chez *Mya arenaria* ?

*Retard dans la maturation sexuelle des myes du fjord du Saguenay (Québec, Canada).*

Le fjord du Saguenay (Québec, Canada) a subi jusque depuis les années cinquante une contamination importante par les HAP et les métaux. La matrice sédimentaire demeure le compartiment mémoire de cette contamination à laquelle les organismes benthiques sont particulièrement exposés. A titre de bivalve ubiquiste, sédentaire, membre de la communauté benthique locale, *Mya arenaria* est une espèce sentinelle de choix dans le Saguenay et l'estuaire du Saint-Laurent. Elle a donc été choisie pour une campagne d'échantillonnage réalisée en 1995 dans le but d'estimer les effets de l'exposition chronique à la contamination du fjord du Saguenay. Pour ce faire, la condition physiologique des organismes avait alors été déterminée grâce à des biomarqueurs d'immunocompétence. Les résultats de cette étude avaient alors montré une plus faible compétence immunitaire des myes du fjord par rapport au site témoin localisé dans l'estuaire du Saint-Laurent (Ginet, 1996). De ce fait, une seconde campagne d'échantillonnage a été réalisée de mai à octobre 1997 afin de mieux caractériser la condition physiologique des myes du fjord par rapport au même site témoin que la première étude. Les teneurs en réserves énergétiques (protéines, lipides, glycogène) de la gonade et du manteau ont alors été déterminées ainsi qu'un examen des gonades pour décrire leur stade de maturation. Les résultats de cette étude ont montré que la condition physiologique des myes est dépendante des conditions environnementales. En effet, dans le fjord où la productivité est faible par rapport à celle de l'estuaire, les réserves énergétiques des myes sont moins importantes que dans l'estuaire à la fin du printemps et la maturation unimodale de la gonade ne se déroule que durant les mois de juin et

juillet. Cependant, le fait le plus remarquable a été observé au site d'échantillonnage de la Baie Eternité, le plus en amont du fjord, où durant l'été 1995 la condition physiologique des myes avait déjà présenté de faibles réserves énergétiques alors que des concentrations élevées en métallothionéines étaient observées en 1995 (Blaise *et al.*, 1996). Durant le printemps 1997, les concentrations en glycogène dans la gonade étaient significativement supérieures à celles observées chez les myes du site plus en aval mais où les conditions environnementales sont similaires ainsi que celle du Saint-Laurent (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Ces concentrations plus élevées en glycogène étaient également accompagnées d'un retard dans la maturation de la gonade qui avait également été détecté en juin 1996. Il semblerait qu'à ce site de la Baie Eternité, une certaine inhibition de la vitellogenèse soit la cause du retard de la maturation gonadale alors que la mobilisation du glycogène ne semble pas effective. Des dosages de protéines "vitellogenin-like" dans l'hémolymphe de myes provenant du même site et pour une même période d'étude semblent d'ailleurs confirmer cette hypothèse puisque les concentrations en "vitellogenin-like" sont les plus faibles à ce site d'étude à la fin du printemps comparativement aux sites témoins (Blaise *et al.*, 1999).

*Origine suspectée de la perturbation de la vitellogénèse chez Mya arenaria*

Le caractère inductible de la vitellogenèse et l'implication des hormones stéroïdiennes dans cette inductibilité comme dans la maturation sexuelle chez les bivalves, évoquées dans les paragraphes précédents, nous permettent d'émettre l'hypothèse d'une perturbation de la vitellogenèse par la voie des hormones stéroïdiennes chez *Mya arenaria* dans le fjord du Saguenay. Cette hypothèse s'inscrit dans la problématique des modulateurs endocriniens développée dans la section 1.2.2. Cela signifie alors que les myes de la Baie Éternité ont été exposées à un ou des composés capables d'interférer

avec l'homéostasie des hormones stéroïdiennes. Une action "anti-œstrogénique" aurait alors entraîné un retard dans l'induction de la vitellogenèse chez *Mya arenaria*. Parmi les principaux contaminants du fjord auxquels sont exposés les organismes de manière chronique, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) pourraient être soupçonnés d'avoir joué un rôle de perturbateur endocrinien. La distribution de ces HAP dans la matrice sédimentaire du fjord est d'ailleurs linéaire en fonction de la distance dans la section inférieure du fjord (Martel *et al.*, 1986), les plus fortes concentrations se trouvant en amont. Un apport d'origine domestique de HAP est cependant toujours d'actualité (White *et al.*, 1998a). La présence de substances génotoxiques souvent apparentées aux HAP ont même été révélées dans les tissus mous de *Mya arenaria* et *Mytilus edulis* (White *et al.*, 1997; White *et al.*, 1998b). Il serait bien sûr illusoire d'incriminer de manière spécifique un quelconque "contaminant" qui aurait pu entraîner un retard de la vitellogenèse chez *Mya arenaria*. L'état des lieux actuel de la contamination diffuse et multiple du fjord du Saguenay ainsi que la biodisponibilité de ces contaminants ne peuvent cependant qu'encourager notre hypothèse, bien que nos connaissances de l'implication des hormones stéroïdiennes sur la maturation sexuelle chez *Mya arenaria* ou de la vitellogenèse ne soient encore trop restreintes pour les appuyer. Plus récemment, d'autres observations réalisées chez *Mya arenaria* tendent à conforter l'hypothèse du rôle des stéroïdes dans le contrôle de processus physiologiques impliqués dans la reproduction chez *Mya arenaria*.



### 1.1.1.3. Autres perturbations observées chez *Mya arenaria* et potentiellement liées à une perturbation endocrinienne

Plus récemment, Gagné *et al.* (2002b) ont détecté une altération des propriétés biochimiques de la gonade des myes échantillonnées à des sites contaminés et localisés à proximité d'une marina ou de la zone de rejets d'effluents urbains. Dans les deux cas, la composition de la gonade tout comme celle des protéines apparentées aux vitellines étaient altérées par rapport aux observations réalisées chez des organismes témoins. Ces perturbations biochimiques étaient concomitantes à une diminution de l'indice de condition et une augmentation des dommages à l'ADN, de l'activité EROD dans la glande digestive de même que de la concentration en métallothionéines. Ces biomarqueurs attestent, dans les deux sites contaminés, de la présence de contaminants organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ainsi que de celle de métaux. L'exposition de *Mya arenaria* à cette contamination multiple a semble-t-il engendré l'altération de la composition biochimique de la gonade et en particulier celle de la vitelline. D'autre part, une altération du sex ratio a été détectée chez des myes échantillonnées dans un site contaminé par le tributyl-étain (TBT) (Gagné *et al.*, 2003). Le nombre de mâles était supérieur à celui des femelles en comparaison avec un site témoin et ce type de "masculinisation" pourrait être le résultat d'une perturbation endocrinienne. Le 17 $\beta$ -œstradiol est en effet capable d'engendrer un certain effet "féminisant" durant le processus de différenciation sexuelle de *Crassostrea gigas* (Mori *et al.*, 1969). Nous pouvons donc envisager qu'un tel processus pourrait être effectif chez *Mya arenaria* et que le blocage de la synthèse et/ou de l'action de E2 durant la différenciation cellulaire ait engendré la présence d'un plus grand nombre de mâles que de femelles. Une telle inhibition de la synthèse de 17 $\beta$ -œstradiol par le TBT s'avère

effectivement plausible chez les myes puisque chez les gastéropodes, ce contaminant est capable de bloquer la conversion de la testostérone en  $17\beta$ -œstradiol via l'aromatase du cytochrome P450 (Spooner *et al.*, 1991). Toutes ces perturbations observées chez les myes représentent des indices supplémentaires de l'implication probable des hormones stéroïdiennes dans le contrôle de la reproduction. L'exposition des organismes à des contaminants capables d'interférer avec le métabolisme et/ou l'action des stéroïdes, représente donc un danger pour les individus et les populations comme nous le mentionnerons dans le chapitre suivant.

## **1.2. OBJECTIFS**

Une meilleure connaissance de l'activité stéroïdienne et vitellogénique de *Mya arenaria* s'avère indispensable d'après les hypothèses formulées dans la section précédente pour expliquer certaines perturbations observées chez *Mya arenaria*. Dans une telle perspective, les objectifs de cette thèse ont alors été fixés pour apporter un certain nombre d'informations sur ces deux activités ainsi que sur l'effet du  $17\beta$ -œstradiol sur le processus vitellogénique des myes.

Nos deux objectifs principaux sont les suivants: dans un premier temps, nous caractériserons sur une période de 7 mois (période sans glace sur la zone littorale dans l'estuaire du Saint-Laurent) l'activité vitellogénique et stéroïdienne (concentrations en testostérone et en  $17\beta$ -œstradiol) de la gonade de la mye chez les mâles comme chez les femelles. Dans un second lieu, nous évaluerons les implications d'une exposition à un œstrogène sur la vitellogénèse et la mobilisation des réserves énergétiques de la gonade. De manière plus spécifique, nous pouvons énoncer les sous-objectifs suivants :

*Description de l'activité vitellogénique saisonnière:*

- suivi de l'activité synthétique de la gonade en déterminant les concentrations en ARN et en ADN,
- description de la croissance des ovocytes durant la gamétogenèse pour déterminer l'état d'avancement de la vitellogenèse selon la taille des ovocytes,
- dosage des protéines apparentées aux vitellines.

*Description de l'activité stéroïdienne saisonnière :*

- suivi des profils de concentration en testostérone et 17 $\beta$ -œstradiol dans la gonade des mâles et des femelles durant le cycle de maturation sexuelle.

*Description de l'effet de l'exposition à un œstrogène: le 17 $\beta$ -œstradiol:*

- étude de l'effet toxique de l'exposition sur la compétence immunitaire des myes:
  - dénombrement des hémocytes,
  - évaluation de la capacité phagocytaire des hémocytes,
- étude de l'effet de l'exposition sur la mobilisation des réserves en glycogène de la gonade:
  - variations des concentrations en glycogène,
  - variation de l'activité de la glycogène phosphorylase.
- étude de l'effet de l'exposition sur les concentrations en protéines de type vitellines dans la gonade,
- étude de l'effet de l'exposition sur l'activité synthétique de la gonade (concentrations en ARN et en ADN),

Les éléments de réponses apportés durant notre étude seront d'ordre écophysiologique.

La description de la vitellogenèse chez *Mya arenaria* permettra d'apporter de nouveaux outils descriptifs en histologie et en biochimie qui pourront être des références lors de

l'interprétation des résultats concernant la variation des paramètres biochimiques potentiellement impliqués dans la reproduction des femelles. Le dosage des protéines apparentées aux vitellines représentera une première approche de l'étude de ces protéines dans la gonade de *Mya arenaria* sur une échelle saisonnière. Pour cela, l'utilisation d'un antisérum spécifique aux vitellines de pétoncle *Patinopecten yessoensis* nous permettra de définir les limites de son utilisation chez *Mya arenaria*. Une autre étude de ces protéines par une méthode électrophorétique représentera une autre approche et apportera des informations complémentaires à celles obtenues avec l'utilisation de l'antisérum. Ces deux volets de l'étude des vitellines chez *Mya arenaria* représenteront une première voie exploratoire vers une description de la vitellogenèse chez les myes, en terme de spécificité de sexe pour leur expression et de processus d'autosynthétique et/ou d'hétérosynthétique pour leur synthèse. Le suivi saisonnier des concentrations en testostérone et en  $17\beta$ -œstradiol sera le premier rapporté chez *Mya arenaria* et un des rares réalisé chez un bivalve. Il nous permettra d'estimer l'implication de ces stéroïdes durant la gamétogenèse et d'évaluer si une exposition à un perturbateur endocrinien pourrait engendrer un effet sur la reproduction des myes. Enfin, l'exposition au  $17\beta$ -œstradiol nous permettra d'évaluer plus spécifiquement son effet potentiel sur la remobilisation des réserves énergétiques, en complément des observations saisonnières de ces concentrations, ainsi que sur la synthèse des vitellines. Cette exposition représentera un premier pas dans un processus de validation des vitellines comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes chez *Mya arenaria*.

## **CHAPITRE II**

### **REVUE DE LITTÉRATURE**

## **2.1. ACTIVITÉ ENDOCRINIENNE ET VITELLOGÉNIQUE CHEZ LES BIVALVES**

Cette section synthétise les principales connaissances acquises sur l'activité endocrinienne et vitellogénique chez les bivalves. Nous présenterons dans les premières sous-sections les principaux types d'hormones répertoriées chez les bivalves et le rôle qu'elles peuvent jouer durant la reproduction. Plus loin nous développerons les implications physiologiques et biochimiques de la vitellogenèse encore partiellement décrites chez les bivalves comparativement aux autres invertébrés.

### **2.1.1. Les neurotransmetteurs**

#### 2.1.1.1. Lieu de synthèse et nature

L'importance du système neuroendocrinien a été démontrée chez les bivalves selon trois approches expérimentales: 1) la caractérisation de cellules neurosécrétrices ou d'organes neuroendocriniens par histologie, immunocytologie, immunohistologie; 2) la démonstration de l'importance de ces organes comme régulateurs par des opérations d'ablations ou de transplantations d'organes; 3) la purification et la caractérisation des neurosécrétions permettant d'approfondir l'étude de leurs effets régulateurs grâce à des cultures d'organes (Mathieu *et al.*, 1991). Les ganglions nerveux (cérébraux, viscéraux, pédieux) ont été identifiés chez les bivalves et en particulier chez *Mytilus edulis*, comme étant la source de neurotransmetteurs (Motavkine & Varaksine, 1989). Ils renferment tous des cellules neurosécrétrices (CNS) bien que le ganglion cérébroïde soit celui qui en contient le plus grand nombre (Lubet *et al.*, 1987). Trois types de CNS ont été répertoriés et une corrélation significative a pu être démontrée entre leur nombre

et le cycle de reproduction chez la moule (Lubet *et al.*, 1986; Lubet *et al.*, 1987). Les neurosécrétions sont de types aminergique et peptidique. Parmi les sécrétions aminergiques aussi appelées monoamines, des catécholamines (dopamine et noradrénaline) ainsi que des indol-amines (sérotonine) ont été mises en évidence. Leur présence et leurs concentrations varient selon le type de ganglions ou le tissu considéré et la saison. Chez *Pecten maximus*, les ganglions cérébroïdes avec les ganglions pédieux présentent des concentrations saisonnières en sérotonine systématiquement supérieures à celles en dopamine alors que celle-ci est toujours présente en concentrations plus importantes que la noradrénaline. Dans les ganglions pédieux, les concentrations en noradrénaline restent toujours les plus faibles comparativement aux concentrations en sérotonine qui restent comparables à celles en dopamine durant l'automne, mais sont plus faibles au printemps. Les variations saisonnières de ces trois monoamines n'en demeurent cependant pas moins synchronisées dans l'ensemble des ganglions (Paulet *et al.*, 1993). Chez *Crassostrea gigas*, les concentrations saisonnières en dopamine sont plus importantes que celles en noradrénaline dans les tissus branchiaux alors que les deux restent comparables dans la gonade (Osada & Nomura, 1989a). Sur une saison, les concentrations en noradrénaline, dopamine et sérotonine sont généralement plus élevées en été qu'en hiver chez *Mytilus edulis* (Stefano & Catapane, 1977; Stefano & Catapane, 1980), *Pecten maximus* (Paulet *et al.*, 1993) et *Crassostrea gigas* (Osada & Nomura, 1989a). Une baisse des concentrations en dopamine et noradrénaline est cependant systématiquement observée au moment de la ponte dans les ganglions cérébroïdes et pédieux de *P. maximus* (Paulet *et al.*, 1993) ou dans les tissus de branchies et de gonades de *Crassostrea gigas* (Osada & Nomura, 1989a). Contrairement aux neurosécrétions aminergiques, les neurosécrétions peptidiques ont plus rarement été

recherchées. La présence d'une substance de type insuline, d'un composé de type "somatostatine" et de peptides opioïdes ont également été rapportées chez différents bivalves comme *Mytilus*, *Anodonta* et *Pecten* (Lubet & Mathieu, 1990).

Le rôle des neurosécrétions au cours de la maturation sexuelle a pu être mis en évidence grâce à des expérimentations faisant appel à des cultures organotypiques qui consistent en la mise en culture de tissu de gonade en présence ou non de ganglion(s) (Houtteville & Lubet, 1974; Mathieu & Lubet, 1980; Lubet *et al.*, 1986) et aux variations des concentrations de ces neurosécrétions durant la gamétogenèse (Osada & Nomura, 1989a; Stefano & Catapane, 1977; Pani & Croll, 2000). Ces différentes études ont ainsi montré que les neurotransmetteurs assurent deux fonctions régulatrices principales durant la maturation sexuelle: la régulation de la multiplication des gamètes d'une part et la régulation de la mobilisation des réserves énergétiques pour le développement des gamètes. Ce dernier point concerne d'ailleurs tout particulièrement la vitellogenèse chez les femelles pour le développement des ovocytes (Lubet & Mathieu, 1982).

#### 2.1.1.2. Implication dans la multiplication des gamètes

Les premières expériences d'ablation des ganglions et de mise en culture d'explants en présence ou en l'absence de ganglions ont clairement démontré que les ganglions cérébroïdes étaient indispensables pour l'évolution de la lignée germinale (Lubet, 1959; Houtteville & Lubet, 1974). Plus tard, Mathieu et Lubet (1980) ont décrit chez *Mytilus edulis* la présence d'un facteur mitogène capable de provoquer la multiplication des ovogonies ou des spermatogonies de même qu'un facteur méiotique présent chez les



mâles et capable d'initier la première division de la méiose. En l'absence de ganglions cérébroïdes, l'activité de l'ATCase, une enzyme clé de la synthèse des bases pyrimidiques, chute dans des explants de manteaux de moules mâles (Lubet *et al.*, 1987). Chez les femelles *M. edulis*, la réalisation de cultures d'explants gonadiques a montré que cette activité mitogène induite par les ganglions cérébroïdes était forte au début du développement des ovocytes puis ralentissait (Lubet *et al.*, 1986). L'action régulatrice exercée par les ganglions cérébroïdes sur les explants gonadiques était significative durant la mitose en entraînant une augmentation la quantité d'ADN, et sur le maintien d'une forte teneur en ARN pendant la période de restauration qui suit la ponte. Un facteur mitogénique GMSF (Gonial Mitosis-Stimulating Factor) associé aux ganglions cérébroïdes a d'ailleurs pu être partiellement purifié. Sa caractérisation a mis en évidence sa nature peptidique et sa masse moléculaire de 5 kDa (Mathieu *et al.*, 1988). Notons également que dans la gonade, d'autres neurotransmetteurs sont présents, comme la dopamine chez *Mizuhopecten yessoensis* (Khotimchenko & Deridovich, 1989). Il est également probable que des composés de types hormones libératrices de gonadotropines (GnRH pour Gonadotropin-Releasing Hormones) participent à la régulation de l'activité mitogénique de la gonade puisque cinq GnRH peuvent stimuler la synthèse d'ADN dans ces cultures de cellules de gonade de *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis* (Pazos & Mathieu, 1999). Ces GnRH pourraient interagir avec le facteur mitogénique GMSH décrit par Mathieu *et al.*, (1988).

### 2.1.1.3. Implication dans la vitellogenèse

Tout comme pour la multiplication des ovogonies, la présence des ganglions cérébroïdes est indispensable à la vitellogenèse et à la croissance ovocytaire chez *Mytilus edulis* (Lubet *et al.*, 1986), *Crassostrea gigas*, *Ostrea edulis*, *Ruditapes philippinarum*, *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis* et *Chlamys varia* (Lubet *et al.*, 1987). Un facteur prévitellogénique sécrété par les ganglions cérébroïdes s'avère essentiel au début de la vitellogenèse comme le montrent les expérimentations réalisées chez *Mytilus edulis* mais ce facteur pourrait simplement être le facteur méiotique décrit chez les mâles (Mathieu *et al.*, 1988). La lyse ovocytaire observée en l'absence de ganglions cérébroïdes montre que la présence d'un facteur vitellogénique est nécessaire au bon déroulement de la vitellogenèse. La variation de l'indice vitellogénique (pourcentage des ovocytes en cours de croissance de 15 à 60 µm) est d'ailleurs identique à celle de l'indice mitotique (pourcentage des mitoses et méioses dans la population cellulaire) en présence de ganglions (Lubet *et al.*, 1986).

### 2.1.1.4. Implication dans la régulation des réserves énergétiques pour soutenir

#### l'effort de reproduction: contrôle endocrinien du métabolisme du glycogène

Le contrôle neurohormonal du métabolisme énergétique impliqué dans le cycle reproducteur a été proposé par Gabbott dès 1975 sans toutefois être clairement démontré. Chez *Mytilus edulis*, des actions différentes et antagonistes vis-à-vis des réserves énergétiques ont été rapportées pour les neurotransmetteurs dépendamment du type de ganglion qui les sécrète. Les neurosécrétions du ganglion viscéral stimulent l'augmentation des réserves énergétiques dans les cellules de stockage et les adipogranulocytes, alors que celles des ganglions cérébraux provoquent la mobilisation

des réserves énergétiques pour le développement des gamètes (Lubet *et al.*, 1976). Robbins *et al.*, (1990a; 1991) ont également décrit la présence d'un neurotransmetteur responsable de la mobilisation du glycogène (Glycogen Mobilization Hormone, GMH) dans les cellules à glycogène, les ganglions cérébroïdes et l'hémolymphe. Sa caractérisation a permis de la définir comme étant un composé de nature peptidique et de masse moléculaire supérieure à 20 kDa. La même étude a également permis de mettre en évidence un autre facteur hormonal de plus petite taille (1,5 kDa) et capable cette fois de stimuler la synthèse du glycogène. Ces deux neurohormones ne sont cependant pas les seules à réguler le cycle de stockage et de mobilisation du glycogène utilisé comme source de glucose. D'autres composés IL (insulin-like) apparentés à l'insuline régulent en effet le taux de glucose dans l'hémolymphe de nombreux bivalves alors que d'autres neurosécrétions anti-IL sont capables d'inhiber l'action de ces IL et d'induire la mobilisation du glycogène (Joosse & Geraerts, 1983; Mathieu, 1994). Enfin, nous remarquons que le  $17\beta$ -œstradiol est également capable d'induire la mobilisation du glycogène (Mori, 1980).

#### 2.1.1.5. Implication dans la régulation de la ponte

L'ablation des ganglions cérébroïdes réalisée chez *Modiolus demissus* dans les années soixante a clairement montré que la disparition des neurosécrétions de ces ganglions accélérât l'apparition de la ponte (Nagabhushanam, 1964). Plus tard, Osada & Nomura (1989a) ont observé que les concentrations en dopamine et en noradrénaline dans la gonade de *Crassostrea gigas* étaient importantes jusqu'au moment de la ponte mais diminuaient significativement une fois que celle-ci était engagée comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe 2.1.1.1. Les monoamines semblent jouer un rôle dans la

régulation du déclenchement de la ponte avec notamment un effet inducteur de la sérotonine (Matsutani & Nomura, 1986) dont les sécrétions semblent être régulées par la dopamine au sein des neurones sérotoninergiques (Stefano *et al.*, 1976).

Il est intéressant de noter que lorsque l'information est disponible, les auteurs n'observent pas de dimorphisme sexuel significatif quant aux concentrations des neurotransmetteurs, leur localisation ou leur action (Lubet *et al.*, 1987; Mathieu & Lubet, 1980; Osada & Nomura, 1989a).

## **2.1.2. Les hormones stéroïdiennes**

### 2.1.2.1. Mise en évidence de la stéroïdogénèse chez les bivalves

L'intérêt pour la stéroïdogénèse chez les invertébrés marins a débuté au début des années soixante avec la mise en évidence d'hormones stéroïdiennes (Hagerman *et al.*, 1957; Botticelli *et al.*, 1961) et d'activités enzymatiques impliquées dans le métabolisme des stéroïdes (Lehoux & Sandor, 1970). Ces recherches furent approfondies chez les échinodermes et montrèrent le lien entre le métabolisme des stéroïdes et le cycle reproducteur (Voogt *et al.*, 1991; Hines *et al.*, 1992a). Chez les bivalves cependant, les connaissances sont encore fragmentaires mais elles se développent depuis les années quatre-vingt dix. La figure 2-1 résume les activités enzymatiques impliquées dans la stéroïdogénèse et/ou les stéroïdes rapportés dans la littérature chez différents bivalves. Les enzymes ont été les premières à être rapportées grâce à des études d'incubations avec des précurseurs. Différentes hydroxystéroïdes déshydrogénases (3 $\beta$ -HSD ou 17  $\beta$ -HSD) ont ainsi été mises en évidence de même que des lyases, des aromatasés, des hydrolases (figure 2-1) et ce, dans différents tissus comme la gonade, la glande

digestive, les muscles, le manteau, les intestins (tableau 2-1). D'autres études concernant la présence et l'activité de cytochromes P450 dans la fraction microsomale de la glande digestive des bivalves, témoignent aussi de la présence de systèmes enzymatiques indispensables à la synthèse de stéroïdes puisque certaines activités enzymatiques du cytochrome P450 sont impliquées dans la stéroïdogénèse (figure 2-2 et 2-3). Ces études furent d'avantage entreprises dans le but de valider l'utilisation de l'activité du P450 comme biomarqueur d'exposition dans un contexte écotoxicologique, mais elles n'en demeurent pas moins importantes pour témoigner de la présence de systèmes métaboliques responsables de la stéroïdogénèse (Livingstone & Farrar, 1984; Livingstone, 1988; Porte *et al.*, 1991; Wooton *et al.*, 1995; Porte *et al.*, 1995; Porte *et al.*, 2001).

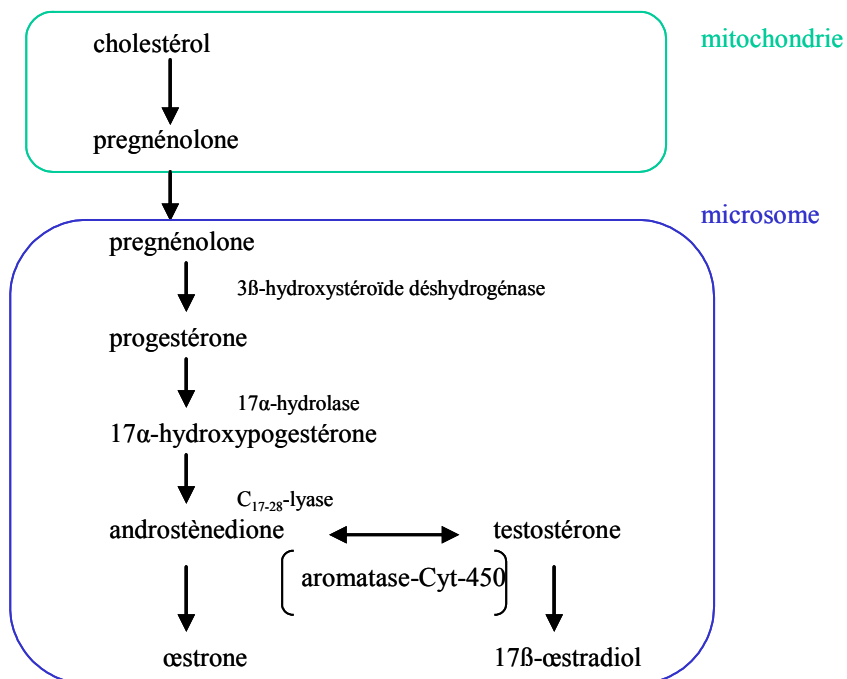
L'hypothèse d'une implication des stéroïdes dans le contrôle de la maturation sexuelle a rapidement pu être proposée compte tenu de la présence et de la variabilité de certaines activités enzymatiques de la stéroïdogénèse dans la gonade de bivalves et en particulier de la 17 $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 $\beta$ -HSD) (Hathaway, 1965). En effet, l'activité de la 17  $\beta$ -HSD augmente dans la gonade durant la gamétogénèse chez les mâles et les femelles *Patinopecten yessoensis* et *Crenomytilus grayanus* (Varaksina & Varaksin, 1988) de même que chez *Crassostrea gigas* (Mori *et al.*, 1966; Matsumoto *et al.*, 1997) ou encore chez les femelles *Patinopecten yessoensis* (Matsumoto *et al.*, 1997) chez qui l'activité est plus forte au début de la différenciation des gamètes qu'après la ponte. De plus, l'activité de la 17 $\beta$ -HSD varie avec le sexe dans l'intestin, les



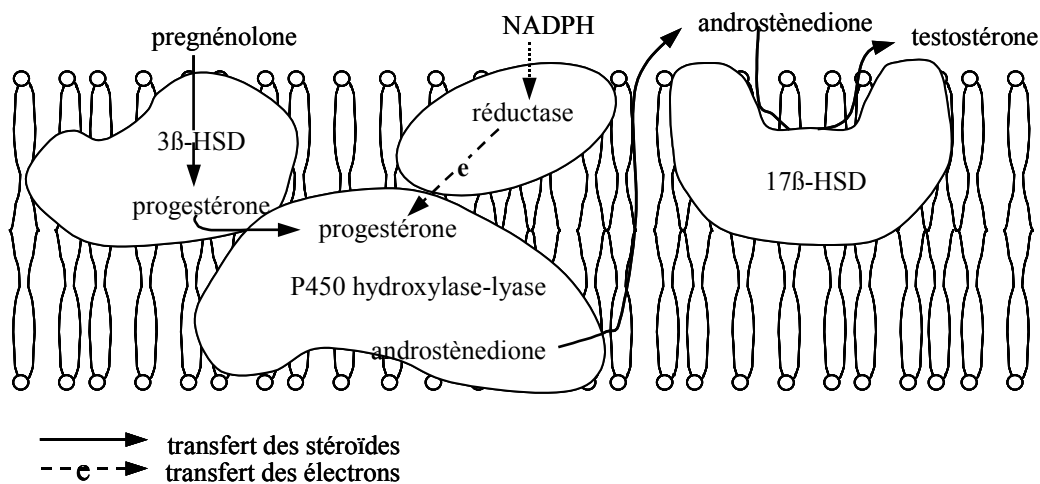
**Tableau 2-1:** Enzymes participant à la stéroïdogénèse répertoriées dans la littérature chez les bivalves.

Espèce	Auteur	Enzymes de la stéroïdogénèse	Tissu
<i>Mytilus edulis</i>	De Longcamp <i>et al.</i> , 1970	17 $\beta$ -HSD	gonade M et F
	De Longcamp <i>et al.</i> , 1974	HSD-isomerase, 17 $\beta$ -HSD, reductase, lyase	gonade M et F
	Kirchin <i>et al.</i> , 1988	HT	fraction mirosomale
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Morcillo <i>et al.</i> , 1999	aromatase	fraction microsomale
<i>Crenomytilus grayanus</i>	Varaksina & Varaksin, 1988	17 $\beta$ -HSD	gonade M et F
<i>Pecten magellanicus</i>	Idler <i>et al.</i> , 1969	desmolase	gonade M
	Hathaway, 1965	17 $\beta$ -HSD	sperme
	Mori <i>et al.</i> , 1965a	3 $\beta$ -HSD	tissus épithéliaux proches des ganglions viscéraux, muscle adducteur, NS
<i>Crassostrea gigas</i>	Mori <i>et al.</i> , 1965b	17 $\beta$ -HSD	epithelium du nephridium, intestin, diverticules digestifs, NS
	Matsumoto <i>et al.</i> , 1997	HSD	gonade F
	Le Curieux-Belfond <i>et al.</i> , 2001	17 $\beta$ -HSD, de type aromatase	branchies, glande digestive, gonade-manteau, autres tissus
	Matsumoto <i>et al.</i> , 1997	17 $\beta$ -HSD 3 $\beta$ -HSD, arotamase	gonade F cellules le long et à l'extérieur de l'acini germinal
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Varaksina & Varaksin, 1988	17 $\beta$ -HSD	gonade M et F: cellules germinales et amœbocytes
<i>Ruditapes decussata</i>	Morcillo <i>et al.</i> , 1998	HT	fraction microsomale

*Légendes:* M: mâle; F: femelle; NS: non-sexé; HSD: hydroxystéroïde déshydrogénase; HT: testostérone hydrolase.



**Figure 2-2:** Représentation schématique de la synthèse des hormones stéroïdiennes à l'échelle de la cellule (modifiée de Hall, 1986).



**Figure 2-3:** Représentation schématique de la synthèse des hormones stéroïdiennes au sein du système du CytP450 enchassé dans la membrane des microsomes (modifiée de Hall, 1986).



diverticules digestifs et le néphridium de *Crassostrea gigas* (Mori *et al.*, 1966). Cette variabilité pourrait alors se traduire par des différences de concentrations en stéroïdes dans les tissus extraits de mâles ou de femelles. De manière plus générale, une variabilité de la quantité et de l'activité du CytP450 a aussi été rapportée chez *Mytilus edulis* entre les mâles et les femelles (Stegeman, 1985; Livingstone *et al.*, 1988) ou avec la saison (Kirchin *et al.*, 1992), ce qui peut renforcer l'hypothèse d'une implication des stéroïdes dans la maturation sexuelle des bivalves. Il n'en demeure pas moins qu'à l'heure actuelle, le métabolisme le plus étudié est celui de la testostérone du fait de l'apparition du phénomène d'imposex lié à la perturbation de son métabolisme. Ceci ne peut que renforcer l'hypothèse d'une implication des stéroïdes dans la maturation sexuelle des bivalves.

La présence du  $17\beta$ -œstradiol (E2), de la testostérone (T), de la progestérone (P), de l'androstènedione (A), de l'œstrone (E1) et de l'œstriol (E3) ont été rapportées chez les bivalves comme le montre la figure 1-1. Ces stéroïdes ont été quantifiés dans la biomasse totale mais aussi dans la gonade, le manteau, les fluides corporels ou le pied chez les mâles et/ou les femelles, comme on peut le voir aussi dans le tableau 2-2. De même que pour les enzymes de la stéroïdogénèse, il apparaît clairement que la gonade a fait l'objet de la plupart des études répertoriées ayant eu pour objectif de faire le lien entre l'activité stéroïdienne des bivalves et la maturation sexuelle. Les concentrations en stéroïdes de la gonade présentent en effet des variations selon le sexe et l'état de maturation sexuelle chez différents bivalves. Les concentrations en testostérone dans la gonade augmentent chez les mâles comme chez les femelles *Mytilus edulis* durant la maturation sexuelle mais la concentration est presque dix fois plus importante chez les

**Tableau 2-2:** Hormones stéroïdiennes répertoriées chez différents bivalves dans divers tissus.

espèce	auteur	stéroïdes	tissu
<i>Mytilus edulis</i>	De Longcamp <i>et al.</i> (1974)	T, E1, E2	gonade M et F
	Reis-Henriques <i>et al.</i> (1990)	P, A, T, E1, E2	biomasse totale M et F
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Morcillo <i>et al.</i> (1999)	T, E2	biomasse totale, NS
<i>Pecten hericius</i>	Botticelli <i>et al.</i> (1961)	P, composés oestrogéniques	gonade F
<i>Pecten maximus</i>	Saliot et Barbier (1971)	P	gonade F
<i>Crassostrea gigas</i>	Matsumoto <i>et al.</i> (1997)	E2	gonade M
		E1, E2, E3	gonade F
<i>Patinopecten yessoensis</i>	Matsumoto <i>et al.</i> (1997)	E1, E2, E3	gonade F
		E2	gonade M
<i>Ruditapes decussata</i>	Morcillo <i>et al.</i> (1998), Morcillo & Porte (2000)	E2, T	biomasse totale, NS
<i>Mya arenaria</i>	Siah <i>et al.</i> (2002)	P	gonade M et F
<i>Elliptio buckleyi</i>	Gross <i>et al.</i> , (2003)	T, E2, P	fluides corporels, manteau, gonade, pied, M et F

*Légendes:* F: femelle; M: mâle; NS: non sexé; E1: œstrone; E2: 17 $\beta$ -œstradiol; T: testostérone, P: progestérone, A: androstènedione.

mâles (43 ng·g<sup>-1</sup>) que chez les femelles (5,4 ng·g<sup>-1</sup>) à un stade avancé de la maturation sexuelle alors que les concentrations en 17 $\beta$ -œstradiol sont comparables pour les deux sexes avec des valeurs proches de 4,5 ng·g<sup>-1</sup> (De Longcamp *et al.*, 1974). La concentration en 17 $\beta$ -œstradiol est au contraire près de trois fois plus importante dans les gonades femelles de *Crassostrea gigas*: environ 1,4 contre 0,35 ng·g<sup>-1</sup> durant la gametogenèse et 0,7 contre 0,3 ng·g<sup>-1</sup> après la ponte (Matsumoto *et al.*, 1997). La variation saisonnière des concentrations en stéroïdes dans l'animal entier ou dans la gonade est synchronisée avec la maturation sexuelle. Les concentrations augmentent

durant la gamétogenèse, que ce soit pour la progestérone (de 0,7 à 3,8 ng·g<sup>-1</sup>) dans la gonade (mâles et femelles confondus) de *Mytilus edulis* (Reis-Henriques & Coimbra, 1990), le 17β-œstradiol (de 0,7 à 1,1 ng·g<sup>-1</sup>) dans la gonade de femelles *Patinopecten yessoensis* (Matsumoto *et al.*, 1997) ou encore la progestérone (de 2,8 à 4,5 ng·g<sup>-1</sup>) dans la gonade mâle et femelle de *Mya arenaria* (Siah *et al.*, 2002).

#### 2.1.2.2. Implication dans le contrôle endocrinien de la reproduction des bivalves

Bien que la présence de différentes enzymes ou hormones de la stéroïdogénèse soient rapportées chez les bivalves et que leur concentration ou activité puisse varier d'un sexe à l'autre ou durant la saison, le rôle des hormones stéroïdiennes n'est pas encore clairement décrit. Cependant, trois rôles potentiels peuvent d'ores et déjà être envisagés:

- 1- un rôle dans la différenciation sexuelle à cause des différences observées entre les mâles et les femelles, avec notamment des taux différents de conversion des œstrogènes ou des androgènes (Hathaway, 1965),
- 2- un rôle dans la maturation sexuelle pour le contrôle du développement des gamètes, en particulier les œstrogènes pour le développement des ovocytes (Matsumoto *et al.*, 1997),
- 3- un rôle dans la mobilisation des réserves énergétiques pour le soutien de l'effort de reproduction par leur présence dans la gonade ou de leur proximité avec le système digestif et plus particulièrement avec les tissus de réserve en glycogène tel que rapporté chez *Crassostrea gigas* (Mori *et al.*, 1965a; Mori *et al.*, 1965b).

Il est aussi important de souligner que l'action de ces hormones n'est possible qu'en présence de récepteurs hormonaux. Des sites de liaison pour les œstrogènes ont été récemment rapportés chez *Elliptio complanata* (Gagné *et al.*, 2001a) et ils présentent une constante de dissociation ( $K_d = 0,4 \text{ nM}$ ) comparable à celle des récepteurs œstrogéniques des amphibiens. D'autre part, des précurseurs de stéroïdes tels que les stérols et plus particulièrement le cholestérol ont été observés chez *Mya arenaria*, *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis* (Idler & Wiseman, 1971; Jarzebski, 1985; Pazos *et al.*, 1996), ou encore *Placopecten magellanicus* (Tamura *et al.*, 1964; Napolitano *et al.*, 1992), *Pecten maximus* (Pazos *et al.*, 1997), *Chlamys tehuelcha* (Pollero *et al.*, 1979) et *Diplodon delodontus* (Pollero, 1987; Pollero *et al.*, 1979; Jarzebski, 1985; Pollero, 1987; Napolitano *et al.*, 1992; Pazos *et al.*, 1996; Pazos *et al.*, 1997). Ces stérols pourraient être impliqués dans la synthèse de stéroïdes. Gagné *et al.* (2001c) ont d'ailleurs montré que le coprostanol (cop), produit de la réduction du cholestérol, avait un effet œstrogénique chez *Elliptio complanata* du fait très probablement de sa métabolisation en E2 observée *in vitro* dans un extrait gonadique.

Des expérimentations *in vitro* et *in vivo* ont permis d'observer l'implication des stéroïdes dans divers processus physiologiques des bivalves. Mori (1968a, b; 1980) fut le premier à rapporter des effets physiologiques induits par le  $17\beta$ -œstradiol chez *Crassostrea gigas*. Ces effets sont liés d'une part à la maturation sexuelle et d'autre part à la différenciation sexuelle des individus. Il a en effet montré une augmentation de la respiration de la gonade exposée à de l'E2 (alors que la testostérone ne provoquait pas cet effet), une augmentation du taux de fécondation grâce à une augmentation de la mobilité des spermatozoïdes, et une augmentation du taux de développement des œufs

(Mori, 1968a; Mori, 1968b). La croissance de la gonade femelle s'avère également accélérée en présence de  $17\beta$ -œstradiol (Mori, 1969) de même que la glycogénolyse alors qu'aucun effet n'a été observé au niveau des reins ou dans les diverticules de la glande digestive (Mori, 1980). Ces dernières observations révèlent donc une spécificité d'action de l'E2 vis à vis de la gonade, de même que son implication dans le processus de maturation sexuelle chez les femelles. D'autre part, une réversibilité du sexe a été observée chez les mâles exposés à de l'E2 (Mori *et al.*, 1969) durant les premiers stades de la maturation sexuelle ce qui démontre l'importance des stéroïdes dans le processus de différenciation sexuelle de même que la variation de la susceptibilité des tissus pour les stéroïdes durant leur différenciation.

Plus récemment Li *et al.* (1998) ont montré que la synthèse de protéines de réserve (vitellines) augmente dans les ovocytes de femelles de *Crassostrea gigas* exposées à l'E2. Cette induction sous contrôle œstrogénique de la synthèse de vitellines est parfaitement connue chez les vertébrés ovipares durant la vitellogenèse (Nagler *et al.*, 1987; Wallace & Jared, 1968; Motavkine & Varaksine, 1989) mais ce processus demeure encore mal décrit chez les bivalves ou les Mollusques en général. Cependant, le même type d'effet inducteur de l'E2 ou de composés œstrogéniques tels que le nonylphénol ont pu être observés chez *Mya arenaria* (Blaise *et al.*, 1999) et *Elliptio complanata* (Gagné *et al.*, 2001a). Les œstrogènes semblent donc impliqués dans la maturation sexuelle des femelles durant la vitellogenèse. Le site d'action reste encore à déterminer de même que la nature de la vitellogenèse puisque le ou les lieux de synthèse des protéines de réserve ne font pas l'unanimité.

Enfin, rares sont les études qui se sont intéressées au lien entre l'action des neurotransmetteurs et celles des hormones stéroïdiennes. Baranyi (1973) fut le premier à rapporter une augmentation de l'activité des cellules neurosécrétrices et une activation des neurosécrétions chez *Anodonta cygnea* après une injection de propionate d'E2. Il a également observé que l'augmentation de la synthèse des neurotransmetteurs et de leur sécrétion était concomitante à l'augmentation de l'activité de la  $\Delta$  5,3-hydroxystéroïde déshydrogénase et du développement de la gonade ce qui montrerait que les œstrogènes accroissent l'activité du système neurosécréteur, qui, à son tour, influence la stéroïdogenèse (Baranyi & Salanki, 1967). Osada et Nomura (1989b) ont également proposé une fonction régulatrice de l'E2 vis à vis des catécholamines après avoir observé que l'administration *in vivo* de E2 dans la gonade de *Patinopecten yessiensis* entraînait une diminution des concentrations en noradrénaline et en dopamine. Un certain rétrocontrôle entre stéroïdes et neurotransmetteurs dans la gonade pourrait alors être déterminant durant la ponte puisqu'une baisse des concentrations en catécholamines est systématiquement observée durant cette période de la reproduction (voir section 2.1.1.1). Cependant nous ne devons pas exclure d'autres rétrocontrôles avec d'autres hormones pour décrire le contrôle endocrinien du déclenchement de la ponte comme nous l'évoquerons dans la section suivante.

### **2.1.3. Les prostaglandines**

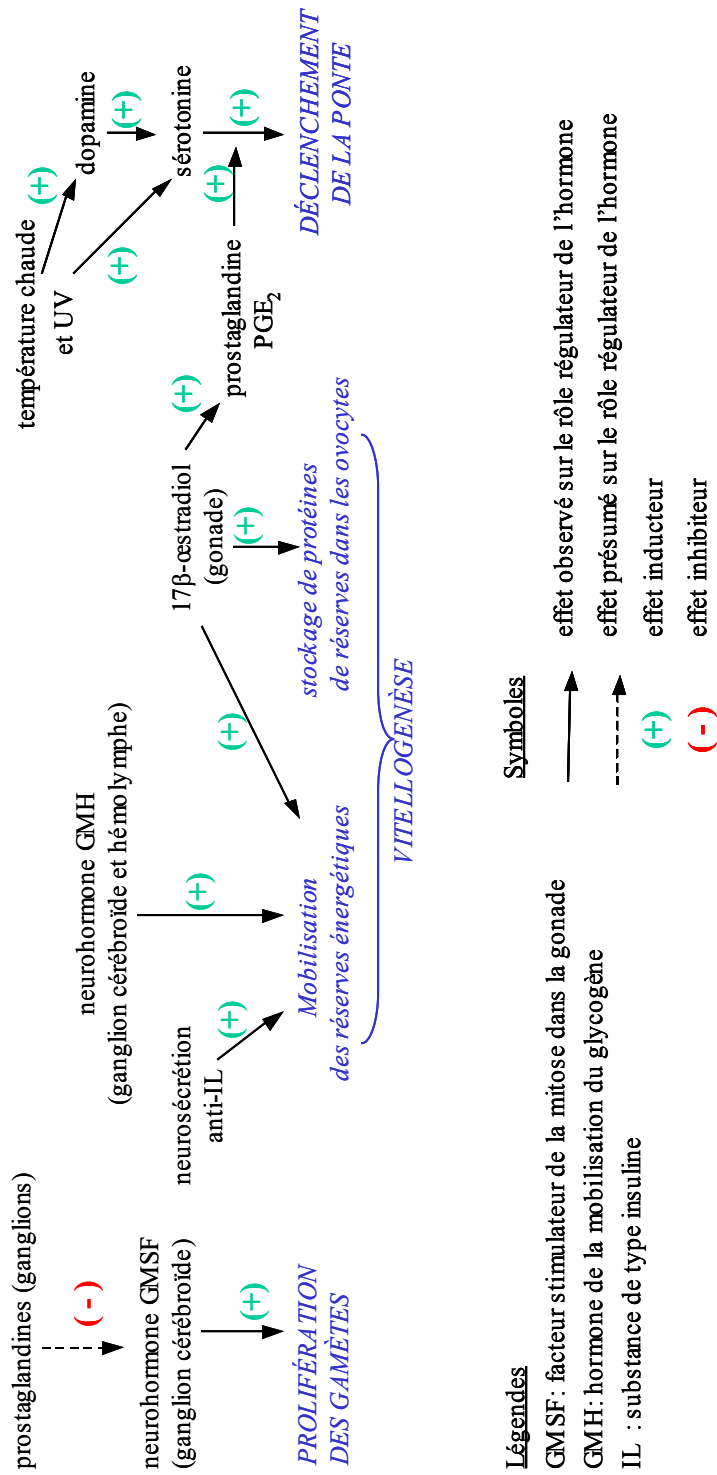
Les prostaglandines (PGs) sont des produits de l'acide arachidonique. Chez les vertébrés, ce sont des hormones "locales" qui agissent par diffusion dans le tissu interstitiel ou via la circulation sanguine sur des cellules-cibles et des récepteurs membranaires spécifiques. Elles induisent la formation de seconds messagers et peuvent

notamment être nécessaires à l'action de AMPc dépendante de l'adrénaline et de la noradrénaline. Elles possèdent cependant un très grand spectre d'action et jouent un rôle important dans la reproduction des vertébrés en participant à la régulation de la maturation sexuelle, de l'ovulation et de l'accouchement (ou la ponte). Les prostaglandines ont été rapportées chez de nombreux bivalves (Deridovich & Reunova, 1993). Leur concentration augmente dans la gonade durant la gamétogenèse chez *Crassostrea gigas* (Ono *et al.*, 1982) et *Patinopecten yessoensis* (Osada & Nomura, 1990) ce qui montre leur implication dans la reproduction. Ce rôle semble cependant différent durant l'induction de la ponte chez les mâles et les femelles *Patinopecten yessoensis* car leurs concentrations dans la gonade sont très différentes d'un sexe à l'autre (Osada *et al.*, 1989c). Les prostaglandines E<sub>2</sub> participeraient d'ailleurs à l'induction de la ponte en contrôlant son déclenchement par la sérotonine alors que les F<sub>2</sub>α supprimeraient cette action (Matsutani & Nomura, 1987). Le 17β-œstradiol participe également au contrôle de leur synthèse (Osada & Nomura, 1990) et l'interaction multiple décrite ici entre catécholamines, stéroïdes et prostaglandines montre que le contrôle endocrinien de la reproduction est assez élaboré chez les bivalves. Il apparaît également possible que les prostaglandines puissent agir sur la prolifération des gamètes en stimulant le facteur mitogène (GMSF) décrit par Mathieu *et al.*, (1988). Chez les mammifères, les PGs agissent sur les neurosécrétions alors par analogie, nous pouvons penser que les PGs peuvent réguler la synthèse des GMSF chez les bivalves. Dans ce cas, les faibles synthèses en PGs rapportées chez les bivalves durant la prolifération des gamètes pourraient être une condition nécessaire à la production des GMSF dans les cellules neurosécrétrices (Deridovich & Reunova, 1993).

#### **2.1.4. Résumé des régulations hormonales identifiées chez les bivalves au cours de la reproduction**

L'action observée ou pressentie de différentes hormones identifiées chez les bivalves durant la reproduction est présentée à la figure 2-4. Cette synthèse permet de résumer les différents types de régulations hormonales citées dans les paragraphes précédents: durant la prolifération cellulaire, la mobilisation des réserves énergétiques pour le développement des gamètes et la synthèse de protéines de réserve de type vitellines ainsi que pour la ponte. Elle permet de souligner la diversité et la complexité du contrôle hormonal de la gamétogenèse alors que les modes d'action de la plupart de ces hormones restent à définir de même que leurs interactions avec d'autres hormones potentiellement actives et encore non répertoriées.





**Figure 2-1:** Schématisation de l'action d'hormones identifiées chez les bivalves au cours de la reproduction et mentionnées dans les sections 2.1.1, 2.1.2 et 2.1.3.

## 2.1.5. La vitellogenèse chez les bivalves

### 2.1.5.1. Le déroulement de la vitellogenèse

Chez les Mollusques bivalves, les études les plus approfondies sont des descriptions morphologiques des ovocytes et de leurs constituants d'une part, (Coe & Turner, 1938; Motavkine & Varaksine, 1989; Conn *et al.*, 1991) ou d'autre part, de la redistribution saisonnière des réserves énergétiques (Ruiz *et al.*, 1992; De Zwann & Zandee, 1972; Barber & Blake, 1981). Rares sont les auteurs qui décrivent les modalités de conversion des réserves somatiques en réserves vitellines au sein même de l'ovocyte durant la vitellogenèse. *Mytilus edulis* reste malgré tout le bivalve pour lequel les études morphologiques sont les plus descriptives avec les travaux de Lubet (1976) et Albertini (1985). Grâce à l'utilisation de différentes techniques cytochimiques, Albertini (1985) a pu décrire la nature de différents types d'inclusions au sein de l'ovocyte durant la vitellogenèse. En plus de la présence d'une enveloppe vitelline de nature glycoprotéique et synthétisée par l'ovocyte, des inclusions de type I constituent le vitellus lipidique constitué majoritairement de triglycérides (TAG). Des inclusions de type II comprennent le vitellus glycoprotéique et les granules corticaux. Finalement le glycogène est également stocké sous forme d'inclusions. L'importance du vitellus lipidique et en particulier des triglycérides n'est d'ailleurs pas surprenante. Le pourcentage en TAG de la gonade a en effet déjà été rapporté comme étant un bon indice de maturité chez *Pecten maximus* (Pazos *et al.*, 1997) et chez *Placopecten magellanicus* chez qui ils représentent près de 60 % des œufs de femelles prêtes à pondre (Napolitano *et al.*, 1992). Pour les trois types d'inclusions, Albertini (1985) privilégie l'hypothèse d'une synthèse endogène à partir de précurseurs incorporés dans l'ovocyte. Dès le début du processus vitellogénique les synthèses d'ARN nucléaire

précurseur des ribosomes augmentent et le développement des organites impliqués dans le métabolisme cellulaire (ribosomes, réticulum endoplasmique, mitochondries, appareil de golgi) est important. Ces deux constats attestent d'une importante activité synthétique au sein même de l'ovocyte alors que le taux de pinocytose reste faible et ne montre pas d'incorporation importante de matériel depuis le milieu extra-ovocytaire. Ce principe d'une autosynthèse dans l'ovocyte de vitellus lipidique et/ou glycoprotéique, reste plausible chez tous les bivalves puisque des précurseurs "simples" ou de petite masse moléculaire peuvent passer les membranes. Ces précurseurs simples peuvent provenir de la conversion du glycogène (Gabbott, 1975), directement de l'alimentation (Zandee *et al.*, 1980) ou encore être stockés et transférés via les hémocytes puisqu'un transfert de lipides par les hémocytes a clairement été observé chez *Crassostrea gigas* (Allen & Conley, 1982), *Placopecten magellanicus* (Thompson, 1977), *Diplodon delodontus* (Pollero *et al.*, 1985), *Pecten maximus* (Le Pennec *et al.*, 1991) ou *Chlamys hericia* (Vassallo, 1973). Cependant, lorsque les cellules folliculaires sont présentes dans les alvéoles de la gonade, elles sont en étroit contact avec les ovocytes à qui elles fournissent du matériel. Pipe a d'ailleurs clairement montré en 1987 que chez *Mytilus edulis*, un apport de macromolécules exogènes est effectif au début de la vitellogenèse via des jonctions semblables à des desmosomes entre les cellules folliculaires et les ovocytes en développement. Ces structures démontrent l'existence d'échanges de petites molécules et d'ions entre les cellules folliculaires et les ovocytes en développement. Autrement dit, au début du développement et avant la synthèse de l'enveloppe vitelline, une hétérosynthèse semble effective chez *Mytilus edulis* avec la synthèse de macromolécules à l'extérieur de l'ovocyte au sein duquel elles seront ensuite transférées. Plus tard dans le processus vitellogénique, la formation de réserves lipidiques et

protéiques résulterait davantage de l'activité de l'appareil de Golgi du réticulum endoplasmique granulaire (RER) (Pipe, 1987). Un tel rôle trophique des cellules folliculaires (ou accessoires) qui entourent les ovocytes et avec lesquels elles sont directement liées par des jonctions tout au long de l'ovogenèse a également été proposé chez *Pecten maximus* (Dorange & Le Penec, 1989) et *Crassostrea gigas* (Eckelbarger & Davis, 1996). La durée de cette hétérosynthèse dans les cellules folliculaires peut varier du début de la vitellogenèse jusqu'à la fin de la synthèse de l'enveloppe vitelline. Un autre type d'hétérosynthèse de protéines de réserves semble cependant être privilégié dans les cellules du tissu conjonctif vésiculaire (ou le tissu conjonctif interstitiel). Ce tissu entoure les alvéoles et un transfert des protéines de réserve vers les ovocytes via l'hémolymphe est proposé chez *Crassostrea gigas* (Eckelbarger & Blades-Eckelbarger, 1989) et *Pecten Maximus* (Eckelbarger & Blades-Eckelbarger, 1989; Dorange & Le Penec, 1989). Bien que l'autosynthèse soit privilégiée chez les Mollusques pour la synthèse des protéines de réserves durant la vitellogenèse (Joosse & Geraerts, 1983), l'hypothèse de l'hétérosynthèse reste à confirmer chez d'autres mollusques que le nudibranche *Spurilla neopolitan* (Eckelbarger & Blades-Eckelbarger, 1989).

#### 2.1.5.2. Présence de vitellines chez les bivalves

La vitellogenèse représente le processus de stockage de réserves au sein de l'ovocyte pour le développement du futur embryon. Chez de nombreux invertébrés, les réserves vitellines sont de nature complexe tout comme les vitellines (phosvitine et lipovitelline) stockées chez les vertébrés ovipares qui ont pour précurseurs extra-ovariens (synthétisés dans le foie) des lipoglycophospho-protéines appelées vitellogénine (Willey & Wallace, 1981; Mommsen & Walsh, 1988). Wallace *et al.* ont proposé en 1967 le terme

générique de "lipovitelline" pour désigner les protéines de grande masse moléculaire les plus abondantes dans les œufs matures de crustacés, alors que les lipoprotéines spécifiques aux femelles présentes dans l'hémolymphe sont désignées sous le terme de vitellogénine. Chez les crustacés, les lipovitellines sont des lipoglycoprotéines et leur site de synthèse est parfois différent d'une espèce à l'autre. Elle peut en effet avoir lieu au sein des cellules folliculaires qui jouxtent les ovocytes chez la crevette *Penaeus japonicus* (Yano *et al.*, 1996), dans l'hépatopancréas et la gonade chez *Penaeus vannamei* (Quackenbush, 1989a) ou au sein de vitellogénocytes situés dans l'hépatopancréas des décapodes *Carcinus maenas* et *Libinia emarginata* (Paulus & Laufer, 1987). Des protéines identiques à ces lipovitellines ont également été spécifiquement rapportées par les mêmes auteurs dans l'hémolymphe des femelles de *Penaeus vannamei* (Wolin *et al.*, 1973; Croisille, 1974; Byard & Aiken, 1984; Quackenbush, 1989a). La purification et la caractérisation de certaines vitellines ont parfois été réalisées (vitellogenines et/ou lipovitellines) (Tirumalai & Subramoniam, 1992; Shimizu *et al.*, 1996; Oberdörster *et al.*, 2000). Chez d'autres invertébrés comme les échinodermes, la synthèse de vitelline est également connue. Chez l'étoile de mer *Asterias rubens* (L.) l'hétérosynthèse est responsable de la synthèse d'un précurseur vitellogénique au sein du cœlum pylorique qui est transportée dans l'ovaire *via* les cœlémocytes (Voogt *et al.*, 1985; Harrington & Ozaki, 1986). Les cellules accessoires de la gonade ont toutefois été reconnues comme site de synthèse d'une lipoglycoprotéine précurseur de la principale glycoprotéine stockée dans les œufs d'échinodermes (Ozaki *et al.*, 1986). Chez l'oursin en revanche, un tel précurseur (vitellogénine) a été rapporté chez les mâles et les femelles dans le fluide cœlomique (Harrington & Easton, 1982) de même qu'une protéine de réserve (vitelline) dans les

phagocytes nutritifs du lumen folliculaire (Unuma *et al.*, 1998). Un ARN messager de vitellogénine a également été rapporté dans les intestins, les gonades mâles et femelles (Shyu *et al.*, 1986). Ces différents constats démontrent chez l'oursin une véritable synthèse extraovarienne mais aussi l'absence d'une spécificité reliée au sexe, bien que durant la vitellogenèse l'accumulation de vitellogénine ne reste effective que dans la cavité cœlomique de femelles (Shyu *et al.*, 1986). L'ensemble de ces études montre en fait la diversité des processus physiologiques chez les invertébrés marins concernant la présence et le lieu de synthèse de vitelline(s) et de leur(s) précurseur(s) durant la synthèse de réserves ovocytaires.

Chez les bivalves, les informations sont beaucoup moins nombreuses quant à la caractérisation de vitellines et/ou de précurseurs. Albertini (1985) n'a pas pu mettre en évidence la présence d'une protéine de type "vitellogénine" dans l'hémolymphe de *Mytilus edulis* durant la période d'activité sexuelle, et contrairement aux crustacés, le vitellus glycoprotéique ne semble pas être le constituant majoritaire du vitellus de la moule. En revanche, Clayton (1996) a décrit la présence d'une lipoprotéine dans la fraction lipidique de très haute densité (VHDL) dans l'hémolymphe de *Mya arenaria*. La fraction protéique de cette lipoprotéine plasmatique représente 80 % et la fraction lipidique 20 %, mais les conditions expérimentales n'ont pas permis de mettre en évidence une spécificité de sexe ou une augmentation de sa concentration dans la gonade durant un cycle de maturation sexuelle. Lee et Hefferman (1991) ont également montré chez *Crassostrea virginica* et *Mercenaria mercenaria* que les oeufs sont majoritairement constitués de protéines (40 à 50 % du tissu sec). Parmi elles, une lipoprotéine de 56 kDa et de grande densité est majoritaire et pourrait effectivement être

une vitelline. Osada *et al.*, (1992) furent les premiers à isoler, purifier et caractériser une protéine de réserve de type vitelline dans la gonade du pétoncle *Patinopecten yessoensis*. Cette protéine a une masse moléculaire de 400 kDa et sa purification partielle a permis de développer un anticorps qui lui est spécifique. Ainsi, grâce à des techniques "d'immunodiffusion" "d'immunoblotting", cette protéine a pu être localisée dans la gonade, la glande digestive et l'hémolymphe. Trois autres protéines d'une masse moléculaire semblable et une quatrième de 700 kDa ont également pu être détectées grâce à leur reconnaissance par l'anticorps. Ces résultats représentent les premiers indices biochimiques de l'existence d'une hétérosynthèse de vitellines dans la glande digestive de bivalves, bien que celle-ci soit très probablement accompagnée d'une autosynthèse. Il faut également souligner que l'anticorps produit à partir de la "vitelline" de pétoncle a également reconnu une protéine dans un extrait de gonade de *Chlamys farreri* et *Mytilus edulis*, ce qui tendrait à prouver la similitude de ces protéines chez les trois espèces. Suzuki *et al.*, (1992) ont aussi purifié une protéine de type vitelline chez *Crassostrea gigas*. Il s'agit d'une glycoprotéine de grande masse moléculaire (~ 500 kDa). Sa présence n'a été détectée par immunolocalisation que dans les ovocytes et l'enveloppe vitelline, ce qui tend à démontrer l'existence d'une réelle autosynthèse de vitelline dans les ovocytes de *Crassostrea gigas*. Le constat d'une autosynthèse stricte ou majoritaire a également été fait chez *Mercenaria mercenaria* (Lee *et al.*, 1994) puisque l'isolement et la purification d'une vitelline a permis de démontrer par immunohistochimie sa présence uniquement dans les granules de réserves des ovocytes. Enfin, Blaise *et al.* (1999) ont montré la présence de protéine(s) dans l'hémolymphe de *Mya arenaria* dont les propriétés biochimiques s'apparentent à celle de la vitellogénine (VTG) des vertébrés ovipares. Ces vitellogénines sont des protéine(s) riche(s) en

phosphates et associée(s) à du calcium et du zinc. Synthétisées dans le foie chez les poissons et les batraciens, elles sont ensuite transférées dans les ovocytes via le sang pour permettre le stockage de vitelline après leur fractionnement comme nous le verrons plus en détail dans la section 2.2.2.3. La concentration de protéine(s) de type VTG dans l'hémolymphe des myes de l'Estuaire du Saint-Laurent était croissante durant la maturation des ovocytes et maximale chez les ovocytes mûrs ce qui pourrait attester d'une hétérosynthèse de vitelline(s) transféré(e)s par l'hémolymphe dans la gonade (Blaise *et al.*, 1999). Li *et al.* (1998) ont d'ailleurs clairement rapporté le synchronisme de l'augmentation des concentrations en vitellines de la gonade de *Crassostrea gigas* avec l'accroissement du diamètre de l'ovocyte durant la vitellogenèse. L'hypothèse d'une hétérosynthèse chez *Mya arenaria* est donc posée. Cependant, la présence de protéines de type vitelline dans l'hémolymphe des myes ne peut à elle seule en faire la preuve puisqu'elle peut résulter de la dégénérescence d'ovocytes desquels ces vitellines seraient libérées.

#### 2.1.5.3. Contrôle endocrinien de la synthèse de vitellines chez les bivalves

Chez les vertébrés ovipares, l'induction de la synthèse de vitellogénine par le 17 $\beta$ -œstradiol est parfaitement connue comme nous l'évoquerons dans la section 2.2.2.3 (Wallace & Jared, 1968; Emmersen & Petersen, 1976). Chez les bivalves, différentes expositions à des œstrogènes ont été réalisées afin de constater l'induction de la synthèse de vitelline. L'étude de Li *et al.* (1998) est sans conteste la plus convaincante grâce au dosage des vitellines avec l'anticorps capable de les reconnaître chez *Crassostrea gigas*. Après injection *in vivo* d'E2, les concentrations en vitelline et le diamètre des ovocytes ont augmenté dans la gonade de l'huître. Ces deux constats montrent clairement un effet

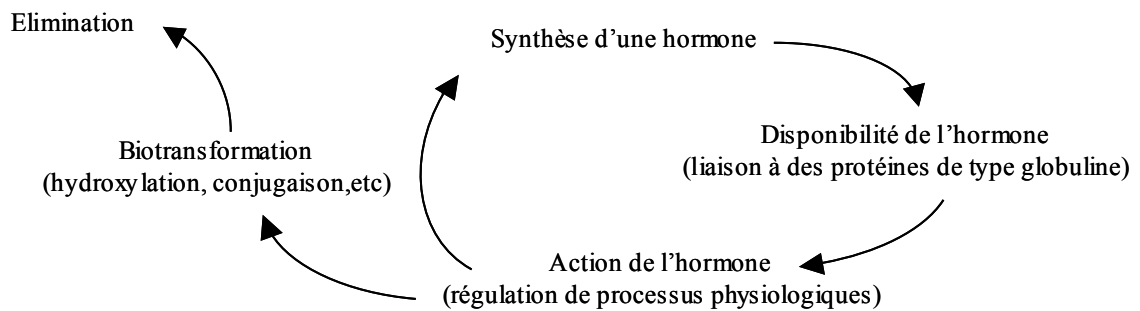


inducteur de l'E2 sur la vitellogenèse. L'augmentation dans la gonade de *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis* des concentrations en E2 durant la croissance des ovocytes (Matsumoto *et al.*, 1997) renforce d'ailleurs l'hypothèse d'un rôle clé de E2 durant la vitellogenèse mais encore une fois, le mode d'action de l'E2 n'est pas connu. Blaise *et al.* (1999) ont également observé une augmentation dans l'hémolymphe de la concentration de(s) protéine(e) de type vitellogénine après l'injection *in vivo* d'E2 et du nonylphénol dont l'action mime celle du 17 $\beta$ -œstradiol (voir la section 2.2.2.3). Ce type de protéine(s) phosphorylée(s) et inductible(s) par les œstrogènes a également été rapporté dans l'hémolymphe des moules d'eau douce *Dreissena polymorpha* et *Elliptio complanata* (Gagné *et al.*, 2001a; Gagné *et al.*, 2002a) mais aucune caractérisation biochimique n'a été réalisée et nous ne connaissons pas non plus le mode de synthèse (autosynthèse et/ou hétérosynthèse hors des ovocytes) chez ces trois espèces.

## **2.2. Les perturbateurs endocriniens**

### **2.2.1. Définition et risques associés**

Les modulateurs (ou perturbateurs) endocriniens déséquilibrent l'homéostasie des hormones, laquelle est régulée selon le schéma représenté sur la figure 2-5. Les principales familles de contaminants comme les pesticides organochlorés (DDT, et ses métabolites, le toxaphène, etc), les biphenylpolychlorés (BPCs), les dioxines, les produits de dégradation des alkylphénols polyéthoxylates utilisés comme surfactants, les HAP, et les métaux sont reconnus comme étant capables d'engendrer des perturbations endocriniennes chez de nombreuses espèces animales: vertébrés, mammifères, reptiles, oiseaux, poissons, invertébrés (Colborn & Clement, 1992; Tyler *et al.*, 1998; Vos *et al.*, 2000; Guillette & Crain, 2000).



**Figure 2-1:** Modèle simplifié de la dynamique des hormones; modifiée de Crain *et al.* (2000).

Une fois l'hormone synthétisée, des protéines circulantes régulent sa biodisponibilité. L'hormone pourra exercer son action en se liant à un récepteur. Par la suite, elle sera excrétée après des réactions de conjugaison ou transformée en une autre hormone qui à son tour s'engagera dans le cycle de la biodisponibilité, de l'action et de l'excrétion ou de la biotransformation.

Les perturbateurs endocriniens peuvent agir selon différents modes d'actions :

- en interférant avec la synthèse d'une hormone endogène via les sites de contrôle de cette synthèse comme par exemple un dysfonctionnement de la thyroïde des vertébrés tel que rapporté chez les alligators exposés entre autre à du Dicofos (Crain & Guillette Jr., 1997).
- en altérant la fonction de protéines qui se lient normalement avec les stéroïdes endogènes (androgènes ou œstrogènes) auxquels ils se substituent (Danzo, 1997; Tollefsen, 2002),
- en mimant l'action des hormones via l'activation de récepteurs hormonaux qui contrôlent la synthèse de certains gènes. Dans ce cas, les perturbateurs endocriniens peuvent agir comme agoniste en mimant l'action d'une hormone endogène et donc

activer le récepteur nucléaire. Ils peuvent aussi dans d'autre cas agir comme antagoniste et bloquer le récepteur. Ce blocage du récepteur empêche son activation par liaison avec le stéroïde et donc la transcription de gènes qui sont sous son contrôle (Arnold *et al.*, 1996; Tyler *et al.*, 1998). Une telle interaction a par exemple été démontrée *in vitro* chez les poissons exposés à différentes familles de contaminants (Le Menn *et al.*, 1980; Donohoe & Curtis, 1996; Knudsen & Pottinger, 1999). *In situ* l'effet agoniste avec le récepteur œstrogénique est fréquemment répertorié chez les poissons exposés aux effluents urbains (Purdom *et al.*, 1994) comme nous le décrirons plus en détail dans la partie 1.2.2.2 consacré aux xéno-œstrogènes.

- en perturbant les enzymes de la stéroïdogénèse et/ou l'élimination de l'hormone endogène. *In situ*, de nombreuses perturbations de la biotransformation des stéroïdes ont été observées chez différentes espèces de poissons exposés à des effluents d'usines de blanchiment de papier ou d'usines de pâtes et papiers (Munkittrick *et al.*, 1992; Munkittrick *et al.*, 1994), à des effluents urbains (Folmar *et al.*, 1996) et à des BPCs (Förlin & Anderson, 1984). Un tel phénomène est également décrit chez des invertébrés comme les gastéropodes exposés au tributyl étain (TBT) (Ronis & Mason, 1996).

Les conséquences d'une exposition à des perturbations endocriniennes sont multiples. Elles peuvent altérer le développement des organismes (Colborn *et al.*, 1993), leur reproduction et même leur comportement (Guillette & Crain, 2000). La nature et l'intensité des effets engendrés par cette exposition varient cependant selon l'espèce considérée (vertébré, invertébré, etc) puisque l'implication des hormones dans les processus de contrôle métabolique est propre chaque espèce. Le moment et la durée de l'exposition au cours de la vie de l'individu sont également très importants car la

sensibilité d'un organisme aux perturbateurs endocriniens peut varier avec le temps. Une exposition au début du développement ou durant des stades juvéniles peut avoir des conséquences très différentes et plus graves en terme de survie ou de capacité reproductrice que celles observées chez un adulte exposé à la même substance (Colborn & Clement, 1992). En milieu naturel, les effets sur la reproduction, la survie ou la mortalité sont plus généralement exploités car facilement explorés chez les poissons exposés de manière chronique à différents types de contaminants comme les BPCs ou le nonylphénol (Black *et al.*, 1998; Allen *et al.*, 1999), puisque l'endocrinologie des poissons est très bien connue.

Les effets les plus spectaculaires de perturbations endocriniennes sont les phénomènes de féminisation ou de masculinisation des individus, caractérisés par des composantes biochimiques (concentrations hormonales ou d'autres composés naturellement exclusifs à un sexe), l'apparition de caractères sexuels secondaires ou même de produits sexuels du sexe opposé dans la gonade. La féminisation concerne donc les mâles et un tel phénomène a été observé *in situ* chez différents organismes. Un des cas les plus connus concerne la féminisation des alligators *Alligator mississippiensis* du lac Apopka (USA) suivi d'un déclin de la population dans les années quatre-vingt (Guillette *et al.*, 1999). Exposés accidentellement à d'importantes concentrations d'un mélange de dicofos, de DDT et de DDE, les alligators mâles avaient de faibles concentrations plasmiqes en testostérone avec en plus une réduction de la taille du pénis chez les juvéniles (Guillette *et al.*, 1994). Les femelles présentaient au contraire une "superféminisation" avec des ratios en E2/T deux fois plus élevés que la normale. En plus de ces effets sur le développement, les conséquences de ces désordres hormonaux avaient engendré une

baisse du succès reproducteur des alligators et à fortiori de la croissance de la population. Les tortues du lac Apopka avaient également été touchées par le phénomène de féminisation des individus. Tous les mâles présentaient un ovotestis (présence de gamètes mâles et femelles de la gonade) ce qui traduisait un phénomène d'intersexe semblable à de l'hermaphrodisme. Un tel phénomène d'intersexe et d'ovotestis a également été observé chez des poissons dans un processus de féminisation induit par des composés comme le nonylphénol ou des effluents ayant des propriétés œstrogéniques dont nous parlerons plus précisément dans la section suivante (Gray & Metcalfe, 1997; Jobling *et al.*, 1996). Une féminisation avec l'apparition de caractères sexuels secondaires féminins a également été rapportée *in situ* chez la gambusie (*Gambusia holbrooki*) du Golfe du Mexique exposée à des effluents d'usines de pâtes et papier. Les femelles étaient alors pourvues d'une nageoire anale semblable au gonopodium des mâles (Davis & Bortone, 1992). A l'inverse du phénomène de féminisation des mâles, une masculinisation des femelles a très fréquemment été rapportée chez de nombreux Mollusques Gastéropodes exposés au TBT (Matthiessen *et al.*, 1999). Cette masculinisation est appelée imposex et intersexe selon l'organe mâle qui se développe. L'imposex est défini par l'apposition d'un pénis et d'un vas-deferens superficiel chez les femelles en plus de leurs propres organes génitaux qui restent fonctionnels (Spooner *et al.*, 1991). L'imposex peut affecter plus de 150 espèces répertoriées de Gastéropodes alors que l'intersexe concerne plus particulièrement l'espèce *Littorina littorea*. Ce dernier est défini par la présence d'une prostate et par la stérilisation des femelles. Le résultat final de l'imposex tout comme de l'intersexe demeure la stérilisation des femelles et de nombreux déséquilibres ont été rapportés

dans les populations de zones côtières ou estuariennes fortement contaminées par le TBT.

Tous les écosystèmes sont exposés à de nombreux perturbateurs endocriniens. Un grand nombre d'entre eux sont des contaminants bioaccumulables, liposolubles et persistants comme les PBCs ou les organochlorés (Facemire, 2000). La recherche d'outils de diagnostic pour estimer le potentiel de substances à entraîner une perturbation endocrinienne est un véritable défi. Évaluer le degré d'exposition *in situ* des organismes aux perturbateurs endocriniens et rechercher des outils prédictifs permettant d'évaluer les effets de cette exposition et ses répercussions sur les populations et les écosystèmes sont désormais des préoccupations écotoxicologiques majeures. Face à l'ampleur et l'enjeu de ces tâches une redéfinition des priorités des principaux organismes publics des pays industrialisés chargés d'évaluer et de veiller à la santé publique et des écosystèmes a dû être réalisée depuis quelques années (EPA, 1997; Kavlock, 1999; Vos *et al.*, 2000). Les observations *in situ* mettent principalement l'emphase sur des effets de perturbations endocriniennes chez les vertébrés exposés de manière chronique à des perturbateurs endocriniens, en particulier chez les poissons (Colborn & Clement, 1992; Jobling *et al.*, 1998; Munkittrick *et al.*, 1994; Munkittrick *et al.*, 1992). De plus amples investigations en milieu estuarien et marin seraient souhaitables (Oberdörster & Cheek, 2001) de même que l'utilisation de différentes espèces appartenant à différents phyla comme organismes sentinelles. Dans cette perspective, les invertébrés devraient alors être davantage représentés (Depledge & Billingham, 1999; Kavlock, 1999). La description de l'endocrinologie des invertébrés comme les mollusques reste cependant fragmentaire (Leblanc, 2000) bien qu'elle soit indispensable à la compréhension des

certains effets observés chez les organismes exposés à des perturbateurs endocriniens comme nous l'exposerons dans le paragraphe 2.3 à venir.

## **2.2.2. Le cas des xéno-œstrogènes**

### 2.2.2.1. Identification et mode d'action

La majeure partie des perturbateurs endocriniens a une véritable capacité à mimer l'activité des hormones et en particulier celle des œstrogènes. Appelés dans ce cas xéno-œstrogènes, *exo-œstrogènes* ou œstrogènes environnementaux, ces composés sont capables de se substituer aux œstrogènes, en particulier le 17 $\beta$ -œstradiol. De nombreux œstrogènes sont en effet présents dans l'environnement, incluant des substances naturelles telles que des phytoestrogènes, des myco-œstrogènes. Parmi les contaminants anthropiques, les pesticides organochlorés (EPA, 1997), des biphenyl-polychlorés (BPCs) (Bradbury *et al.*, 1996), des hydrocarbures aromatiques polychlorés (HAPs) (Schultz *et al.*, 1998), des dioxines polychlorées (PCDDs) (EPA, 1997), des surfactants comme les alkylphénols (Sumpter & Jöbling, 1995), les œstrogènes synthétiques (Tyler *et al.*, 1998) sont reconnus comme œstrogéniques ainsi que certains métaux comme le cadmium (Kluytmans *et al.*, 1988; Thomas, 1989; Olsson *et al.*, 1995; Lee & Noone, 1995). Trois modes d'action peuvent caractériser leurs propriétés œstrogéniques : former une liaison directe avec le récepteur œstrogénique (ER) et l'activer, se lier à d'autres récepteurs nucléaires qui interagissent avec le domaine de l'ADN sensible aux œstrogènes (ERE : estrogen responsive element) ou encore perturber d'autres signaux de transduction impliqués dans l'émission du signal hormonal du 17 $\beta$ -œstradiol (McLachlan & Arnold, 1996; Gillesby & Zacharewski, 1998). Le médiateur direct de cette œstrogénicité reste le récepteur nucléaire œstrogénique. Une

fois la liaison entre ce récepteur et une molécule œstrogénique, un changement de sa configuration s'opère, permettant l'ancrage de ce nouveau dimère (molécule-récepteur) sur la séquence spécifique (ERE : "estrogen receptor element") du promoteur du gène dont l'expression est spécifiquement gouvernée par les œstrogènes. Une fois ER positionné sur ERE, il interagit avec les protéines responsables de la transcription alors attachées au facteur de transcription. Ce dernier est alors activé ou au contraire inactivé. Cette régulation peut donc se traduire par une stimulation de la transcription des gènes placés derrière ERE ou au contraire une inhibition (McLachlan & Arnold, 1996). Différents tests toxicologiques ont été mis au point *in vitro* pour détecter le caractère œstrogénique d'une substance capable d'induire la transcription des gènes placés sous le contrôle de l'ERE. Certains d'entre eux utilisent des cellules humaines comme le test E-Screen qui s'appuie sur la prolifération de cellules cancéreuses induite par la présence d'œstrogènes (MCF-7, CEF) (White *et al.*, 1994). Les cellules cancéreuses humaines sont également utilisées comme les T47D transfectées par un gène codant pour la luciférase placé sous contrôle d'un ERE. Hormis l'induction de la prolifération des cellules après activation du récepteur ER et de son ancrage sur l'ERE, la synthèse de luciférase entraînera une luminescence du milieu de culture (Murk *et al.*, 2002). Le test YES (Yeast Estrogen System) utilise également le principe de la transfection. Des levures capables de produire le ER par modification de leur génome sont aussi transfectées par un plasmide au sein duquel se trouve un gène rapporteur LacZ placé derrière un ERE. Après activation du récepteur ER par un composé œstrogénique et son ancrage sur l'ERE, l'induction de la transcription du gène *lac-Z* engendre la production de  $\beta$ -galactosidase qui hydrolyse un substrat jaune présent dans le milieu de culture et dont le produit de l'hydrolyse est de couleur rouge (Routledge & Sumpter, 1996;



Schultz *et al.*, 1998). D'autres tests *in vitro* exploitent simplement la compétition entre l'œstradiol et des substances à tester pour se lier au ER. L'œstradiol utilisé pour ces tests est radioactif, alors plus les substances identifiées ou présentes dans un milieu présentent d'affinité pour ER, moins l'œstradiol radioactif est fixé au récepteur et à fortiori la radioactivité résiduelle dans le milieu augmente. Ce type de test permet certes de déterminer l'affinité d'une substance pour ER mais il ne permet pas de différencier un "pseudo-œstrogène" capable de se fixer au récepteur ER et de l'activer, d'un "anti-œstrogène" capable de se fixer au récepteur et de le bloquer. Grâce à tous ces différents tests, de nombreux composés naturels et chimiques sont désormais reconnus comme étant des xéno-œstrogènes (tableau 2-3). Ils permettent également de définir un potentiel œstrogénique d'une substance ou d'une matrice (effluents, eaux de surface) en calculant un "équivalent œstrogénique" (EEQ) avec pour référence le 17 $\beta$ -œstradiol (Murk *et al.*, 2002) selon le même principe du calcul de l'équivalent toxique (TEQ) utilisé dans des tests de toxicité avec pour référence la TCDD. L'usage de ces tests présente cependant certaines limites comme celles évoquées pour le test de compétition pour la liaison avec ER. Dans d'autres cas, plusieurs xéno-œstrogènes peuvent agir en synergie ce qui implique une sous-estimation du potentiel œstrogénique de chacun d'eux testé individuellement. La combinaison de composés faiblement œstrogéniques peut d'ailleurs entraîner une œstrogénicité 160 à 1600 fois supérieure à celle de chacun des composés pris individuellement (McLachlan & Arnold, 1996). Ces travaux montrent que la réalisation de tests pour des composés chimiques pris individuellement, sous-estime vraisemblablement le potentiel œstrogénique de mélanges présents dans l'environnement et le risque encouru par une exposition *in situ*. De plus, certaines classes de composés comme les alkylphénols polyéthoxylates (utilisés comme

**Tableau 2-1:** Classes de composés identifiés comme xéno-œstrogènes.  
(modifié de Gillesby & Zacharewski (1998))

<b>Composés naturels</b>	<b>Polluants environnementaux</b>	<b>Composés industriels</b>	<b>Produits pharmaceutiques</b>	<b>Matrices complexe</b>
genistein	DDT	bisphénol A	éthinyli œstradiol	effluents
naningenin	Kepon	alkylphénol	diéthylstilbestrol	sédiments
coumestrol	BPCs/HO-BPCs	ester de phtalates	gestodène	poussières
zearalénone	HAPs et dioxines	endosulfan	norgestrel	extraits tissulaires

surfactants) ne possèdent pas de capacité œstrogénique contrairement à leurs métabolites comme le nonylphénol (Routledge & Sumpter, 1996). Ce dernier exemple montre l'importance de la nature et de la structure d'un composé chimique sur son potentiel œstrogénique. Certains HAP deviennent œstrogéniques après hydroxylation métabolique car les composés de type hydroxy-aromatiques possèdent en effet une similitude structurale avec le cycle A phénolique du  $17\beta$ -œstradiol qui est polymérisé et se fixe sur le récepteur ER (Schultz *et al.*, 1998). La structure chimique peut être très différente d'un xéno-œstrogène à l'autre, mais certaines études tentent de prévoir leur réactivité avec le récepteur ER en fonction de leurs caractéristiques structurales plus ou moins proches de celles du  $17\beta$ -œstradiol avec son groupement phénolique. Différents types de QSAR (Quality Structure Activity Relation) peuvent ainsi être utilisés pour prédire le caractère œstrogénique de molécules. L'œstrogénicité peut alors être évaluée par l'affinité relative d'une substance pour la liaison avec le site d'un récepteur ER extrait du cytosol utérin de souris ou de vache (Duax & Griffin, 1985; Bradbury *et al.*, 1996; Tong *et al.*, 1997). La liaison au récepteur varie en fonction de la capacité de

donner ou de prendre des électrons pour les hydroxybiphényles polychlorés, de la position de l'oxygène phénolique, de l'hydrophobicité et du volume de la molécule (Bradbury *et al.*, 1996).

Tous les tests *in vitro* d'œstrogénicité réalisés en laboratoire via le récepteur ER sont sans conteste d'une grande utilité malgré leurs limites mentionnées plus haut. De plus, en milieu naturel, les organismes sont soumis à une multitude de composés et/ou à leurs métabolites dont l'action peut entraîner, par des voies beaucoup plus indirectes, des perturbations endocriniennes. Un exemple de perturbation engendrée par les xéno-œstrogènes avec un signal de transduction peut être celui de leur interaction potentielle avec le récepteur Aryl hydrolase (Ahr) capable de moduler l'activité du cytochrome P450 qui est impliqué dans le métabolisme du  $17\beta$ -œstradiol (Gillesby & Zacharewski, 1998). Une évaluation *in vivo* de l'exposition des organismes à des xéno-oestrogènes ne peut donc pas être substituée par des essais *in vitro*. Toutefois, l'observation d'un effet ne peut à lui seul permettre de conclure à une perturbation endocrinienne si le contrôle endocrinien du ou des processus physiologiques ayant entraîné l'effet observé n'est pas connu.

#### 2.2.2.2. Leur présence en milieu aquatique

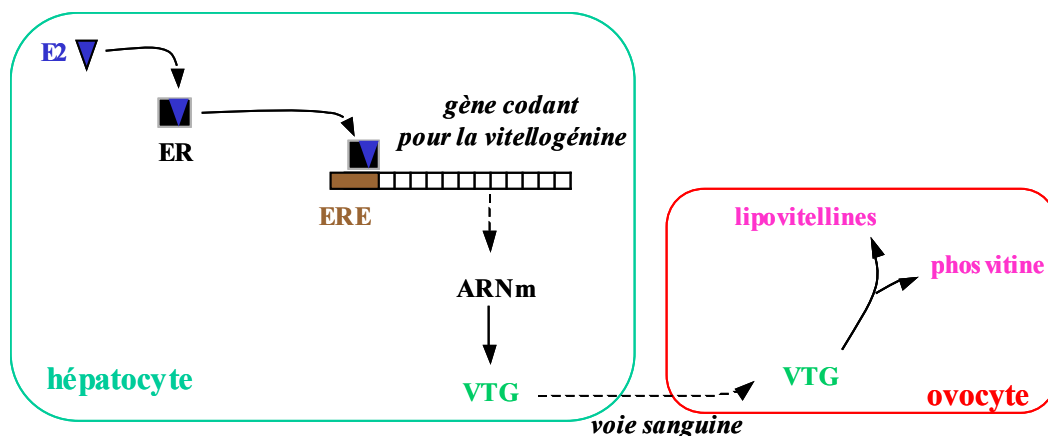
Les principaux xéno-œstrogènes décrits dans l'environnement sont répertoriés en milieu aquatique. Les xéno-œstrogènes les plus souvent cités sont l'éthinyl-œstradiol (EE2) provenant des résidus de pilules contraceptives, des phyto-œstrogènes contenus dans les surfactants, des organochlorés, des biphenyl-polychlorés et certains surfactants comme les alkylphénols (Tyler *et al.*, 1998). Leur transfert dans les cours d'eau, les estuaires et

les zones côtières a principalement lieu *via* les effluents industriels et urbains. Les alkylphénols (APs) sont très largement utilisés comme surfactants non-ioniques et ils présentent une activité œstrogénique tout comme leurs produits de dégradation (nonylphénol [NP], nonylphénol-polyéthoxylates[NPxEO], octylphénol [OP]) dont la présence dans le milieu est favorisée par le traitement biologique des effluents (Jobling & Sumpter, 1993; Routledge & Sumpter, 1996). La responsabilité de ces composés concernant des perturbations endocriniennes détectées *in situ* chez les poissons est reconnue (Jobling *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1999) et leurs concentrations rapportées dans l'eau aux États-Unis ou en Europe sont de l'ordre du 0,038 à 46 µg/L et jusqu'à plus de 2000 µg/L dans des effluents (Bennie *et al.*, 1997; Lye *et al.*, 1999; Blackburn *et al.*, 1999). Bien que l'œstrogénicité des xéno-œstrogènes soit 1000 à 10 000 fois moins effective que celle du 17β-œstradiol (White *et al.*, 1994; Nimrod & Benson, 1996), certaines concentrations rapportées dans l'eau à proximité de rejets peuvent être proches de concentrations déterminées expérimentalement pour induire un effet œstrogénique (Blackburn *et al.*, 1999). De plus, l'hydrophobicité de ces composés facilite leur persistance dans la matrice sédimentaire sur laquelle ils s'adsorbent (Bennie *et al.*, 1997; Lye *et al.*, 1999; Blackburn *et al.*, 1999; Bennett & Metcalfe, 2000). Cette persistance représente alors un risque d'exposition permanent car la bioaccumulation des APs démontrée en laboratoire chez des organismes marins comme la moule ou la crevette (Mc Leese *et al.*, 1981; Ekelund *et al.*, 1990) a été confirmée *in situ* chez les poissons de zones estuariennes (Lye *et al.*, 1999; Blackburn *et al.*, 1999) et les bivalves d'eau douce (Bennett & Metcalfe, 2000). Ces différentes études montrent que tous les organismes vivant dans les milieux récepteurs d'effluents urbains (fleuves, estuaires et zone côtière) sont exposés via la colonne d'eau ou la matrice sédimentaire à des xéno-œstrogènes

persistants qu'ils bioconcentrent. Aucune évaluation du risque de cette exposition à l'échelle de l'écosystème n'est possible si les effets recherchés de cette exposition ne sont pas connus chez différentes espèces clés de chacun des compartiments de l'écosystème. Mais encore une fois, et pour chacune des espèces considérées, les effets recherchés ne pourront être diagnostiqués comme le résultat d'une perturbation endocrinienne par des xéno-œstrogènes si l'on ne peut pas expliquer le rôle des œstrogènes dans les processus physiologiques qui ont engendré leur apparition.

#### 2.2.2.3. Utilisation de la vitellogénine et des protéines apparentées aux vitellines comme biomarqueur d'exposition aux xénoœstrogènes

Bien que l'accumulation de vitellines dans les ovocytes durant la vitellogenèse et la synthèse dans le foie de la vitellogénine (VTG) comme précurseur soient spécifiques aux femelles des vertébrés ovipares (Mommsen & Walsh, 1988), les mâles possèdent le gène codant pour la VTG. L'inductibilité de la synthèse de VTG est sous contrôle œstrogénique comme le décrit la figure 2-6 et les concentrations en E2 dans le plasma des mâles demeurent naturellement trop basses pour engendrer une induction de la synthèse de VTG. Cependant, dans le cas d'une administration de  $17\beta$ -œstradiol, l'induction de la synthèse de VTG est observée chez les mâles comme chez les femelles. Emmersen & Emmersen (1976) et Emmersen *et al.* (1979) l'ont très vite démontré chez le flet *Platichthys flesus* (L.) pour les mâles et les femelles immatures et De Vlaming *et al.* (1980) chez *Carassius auratus* mâle. Folmar *et al.* (1996) ont également noté une telle inductibilité de la VTG chez des carpes mâles exposées à des effluents urbains contenant vraisemblablement des modulateurs endocriniens. Une réduction de la concentration en testostérone dans le sérum a alors induit un certain degré de



**Figure 2-1:** Contrôle œstrogénique de la synthèse de vitellogénine chez les vertébrés ovipares.

Le  $17\beta$ -œstradiol (E2) se fixe sur le récepteur aux œstrogènes (ER) et le couple E2-ER est capable de se fixer sur l'élément spécifique aux récepteurs œstrogéniques (ERE) placé en amont du gène codant pour la vitellogénine. Une fois ER fixé sur ERE, la transcription du gène de la vitellogénine (VTG) peut avoir lieu. Une fois synthétisée, la VTG est transférée dans la gonade via la voie sanguine pour être incorporée dans les ovocytes et scindée en phosvitine et en lipovitellines.

féménisation par induction de la voie œstrogénique de la stéroïdogénèse. Le gène de la vitellogénine est donc présent et fonctionnel chez les mâles. Ce constat désormais bien établi a entraîné une généralisation de l'utilisation des poissons comme organisme "sentinelle" dans un environnement "œstrogénique" ainsi qu'une validation de la vitellogénine comme un biomarqueur de contamination aux xéno-œstrogènes (Sumpter & Jobling, 1995). Son utilisation a permis de démontrer l'œstrogénicité de nombreux composés par comparaison avec l'effet d'une exposition avec le  $17\beta$ -œstradiol (tableau 2-4). L'interaction avec le récepteur nucléaire spécifique aux œstrogènes de certains alkylphénols, BPCs ou même du o,p'DDT, du o,p'DDE ou encore du Lindane a

d'ailleurs été clairement démontrée chez des mâles *Oncorhynchus mykiss* (White *et al.*, 1994; Flouriot *et al.*, 1995; Donohoe & Curtis, 1996).

**Tableau 2-1:** Effet œstrogénique de différents composés observés *in vivo* ou *in vitro* vis à vis de la synthèse de vitellogénine ou de protéines apparentées aux vitellines chez différentes espèces.

Taxa	espèce	composé	effet	référence
Poissons	<i>Onchorynchus mykiss</i>	4-NP, 4-t-OP, NP1EO, NP2EO, t-BP,	+	Jobling & Sumpter, 1993
	<i>Onchorynchus mykiss</i>	OP, NO, NP2EO, NP1EO	+	White <i>et al.</i> , 1994
	<i>Onchorynchus mykiss</i>	NP, Chlordecone, PCB, Lindane, pentachlorophénol, Linuron	+	Flouriot <i>et al.</i> , 1995
	<i>Onchorynchus mykiss</i>	o,p'-DDT, o,p'-DDE, Chlordecone	+	Donohoe & Curtis, 1996
	<i>Zoarces viviparus</i>	NP	+	Korsgaard & Pedersen, 1998
	<i>Salmo salar</i>	4-NP + o,p' DDT	+	Arukwe <i>et al.</i> , 1998
	<i>Platichthys flesus</i>	4-NP	+	Christensen <i>et al.</i> , 1999
Crustacés	<i>Balanus amphitrite</i>	4-NP	+	Billinghurst <i>et al.</i> , 2000
	<i>Palaemonetes pugio</i>	pyrène	+	Oberdörster <i>et al.</i> 2000
Bivalves	<i>Crassostrea gigas</i>	E2	+	Li <i>et al.</i> 1998
	<i>Mya arenaria</i>	4-NP	+	Blaise <i>et al.</i> , 1999
	<i>Dreissena polymorpha</i>	effluents urbains	+	Gagné <i>et al.</i> 2002a
	<i>Elliptio complanata</i>	E2, NP, effluents urbains	+	Gagné <i>et al.</i> 2001a, 2001b, 2002a

Le potentiel œstrogénique des effluents industriels ou de stations d'épuration a pu être démontré durant des expositions *in vivo* ou *in vitro* avec des cultures d'hépatocytes de poissons. Une relation de type dose/effet a d'ailleurs clairement été observée entre le degré d'exposition à l'effluent (taux de dilution durant les essais *in vitro* ou distance

entre le lieu du rejet et le site d'exposition) et la synthèse de VTG chez la truite arc-en-ciel (Purdom *et al.*, 1994; Sumpter & Jobling, 1995; Gagné & Blaise, 1998; Hansen *et al.*, 1998; Harries *et al.*, 1999), la carpe (Folmar *et al.*, 1996) et la plie (Allen *et al.*, 1999). La dilution expérimentale de 75% d'un effluent est parfois même nécessaire pour que ses propriétés œstrogéniques ne soient plus détectables (Harries *et al.*, 1999). La présence de vitellogénine dans le plasma de mâle permet alors de définir *in situ* l'intensité de l'exposition des organismes à des xéno-œstrogènes pour différents sites (Sumpter & Jobling, 1995; Harries *et al.*, 1997). Les concentrations en VTG chez des mâles exposés *in situ* peuvent parfois être supérieures à celles d'organismes témoins d'un facteur 4 à 6, et supérieures aux concentrations observées chez les femelles matures (Allen *et al.*, 1999). Toutes ces études, ainsi qu'une bonne connaissance du processus vitellogénique chez les vertébrés ovipares, ont conduit à un consensus pour reconnaître la vitellogénine comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes chez les poissons (Nicolas, 1999; Sherry *et al.*, 1999; Kime *et al.*, 1999). Il en est également de même chez la grenouille (Palmer *et al.*, 1998). Les efforts méthodologiques s'orientent désormais vers l'utilisation systématique d'anti-corps anti-VTG pour des dosages rapides par ELISA (Denslow *et al.*, 1999) voire même vers la recherche d'un anti-corps universel (Heppell *et al.*, 1995). L'élaboration de tests de plus en plus rapides et sensibles à l'image du marquage de l'ARNm de la vitellogénine grâce à une sonde chémoluminescente dans une culture d'hépatocytes de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Gagné & Blaise, 1998), est vivement encouragée par les organismes publics afin d'établir des diagnostics précoces d'exposition des organismes aux xéno-œstrogènes. Un biomarqueur tel que la VTG possède d'ailleurs une excellente pertinence écologique puisque les réserves énergétiques de l'œuf sont prépondérantes



pour assurer un bon développement larvaire et assurer un bon recrutement de l'espèce considérée. La validation d'un tel biomarqueur dans le cadre d'une estimation de l'exposition à des perturbateurs nécessite toutefois une parfaite connaissance du contrôle œstrogénique de la synthèse de cette protéine. Si cette démarche a pu aboutir chez les vertébrés ovipares (Sumpter & Jobling, 1995; Palmer *et al.*, 1998) c'est grâce aux nombreuses études entreprises depuis les années soixante-dix pour comprendre le contrôle de la synthèse de cette protéine via le récepteur œstrogénique ER schématisé dans la figure 2-6. Hormis les vertébrés ovipares, de nombreuses espèces d'invertébrés synthétisent également des protéines de réserves de types lipovitellines durant la gamétogenèse comme nous l'avons évoqué au paragraphe 2.1.5.2. Différents auteurs ont purifié, caractérisé des lipovitellines spécifiques aux femelles et produit des anticorps capables de réaliser des dosages par ELISA ou de manière semi-quantitative par Western Blott\* (Wolin *et al.*, 1973; Byard & Aiken, 1984). L'utilisation de ces méthodes de dosage pourrait paraître prometteuse chez les invertébrés pour utiliser les lipovitellines comme biomarqueur d'exposition à des xéno-œstrogènes au même titre que la VTG chez les poissons. Nous n'avons pour l'instant répertorié que l'étude de Billingham *et al.* (2000) qui ont tenté de développer ces lipoprotéines comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes chez *Balanus amphitrite*. L'exposition de ce dernier au 17 $\beta$ -œstradiol et au NP a en effet induit la synthèse de la vitelline du crustacé. Le contrôle endocrinien de la synthèse des vitellines chez les crustacés a été démontré par différents auteurs (Quackenbush, 1989b; Lee & Watson, 1995) mais l'hormone responsable de ce contrôle est de nature peptidique. Des composés apparentés

---

\* le terme anglais est conservé car la traduction française "buvardage" n'est pas utilisée

à de l'œstradiol et à de la progestérone ont été rapportés dans la gonade des femelles du homard *Homarus americanus* (Couch *et al.*, 1987) et de la crevette *Parapeneus fissus* (Jen *et al.*, 1978), mais la variation saisonnière de E2 et de la progestérone ne laissent pas présager un rôle de ces stéroïdes dans le contrôle du développement des ovocytes du homard. Bien que la synthèse des lipovitellines soit décrite pour de nombreux crustacés et que le dosage des lipovitellines soit aisément réalisé, les résultats de Billinghamurst *et al.* (2000) ne représentent qu'un premier pas vers une validation potentielle des lipovitellines comme biomarqueur d'exposition des crustacés aux xéno-œstrogènes. L'induction des lipovitellines de la crevette *Penaeus japonicus* exposée à la 17 $\alpha$ -hydroxy-progestérone (Yano, 1987) tend cependant à montrer que les stéroïdes peuvent moduler la synthèse des lipovitellines chez les crustacés. De plus amples recherches seront donc nécessaires pour comprendre et peut-être confirmer le rôle des stéroïdes dans le contrôle de la synthèse des vitellines. Elles pourraient peut-être encourager la validation de ces protéines à titre de biomarqueur d'effet en cas d'exposition à des perturbateurs endocriniens. Un tel objectif est également envisagé chez les bivalves après l'induction de la synthèse de vitellines observée chez *Crassostrea gigas*, *Mya arenaria* et *Elliptio complanata* exposés notamment à du 17 $\beta$ -œstradiol et/ou à du nonylphénol ou des effluents domestiques (voir tableau 2-4). Le contrôle endocrinien de la synthèse de vitellines reste cependant partiellement décrit chez les bivalves de même que le rôle des hormones stéroïdiennes dans le contrôle de la reproduction et en particulier de la vitellogenèse comme nous l'avons décrit dans la section 2.1.2.2. Malgré ces premiers résultats plutôt encourageants chez l'huître, la mye et la moule d'eau douce pour l'utilisation des vitellines comme biomarqueur d'effet des xéno-œstrogènes, l'état des connaissances sur la nature et la synthèse de ces protéines demeure toutefois moins

documenté que chez les crustacés. L'exemple développé dans ce paragraphe avec les crustacés montre qu'il est nécessaire de pouvoir décrire la cause d'effets engendrés par des perturbateurs endocriniens pour être sûr de décrire la conséquence d'une perturbation endocrinienne. Il doit en être de même pour les bivalves. Cette démarche est indispensable au développement et à l'utilisation de biomarqueurs que l'on souhaite représentatifs d'un certain type de contaminant comme les perturbateurs endocriniens. La VTG est sûrement un des plus beaux exemples de biomarqueur représentatif d'une famille de contaminant utilisé en écotoxicologie. Une parfaite connaissance des processus physiologiques impliqués dans sa synthèse a toutefois dû être acquise chez les vertébrés ovipares pour établir un consensus quant à son utilisation à titre de biomarqueur d'effet des xéno-estrogènes.

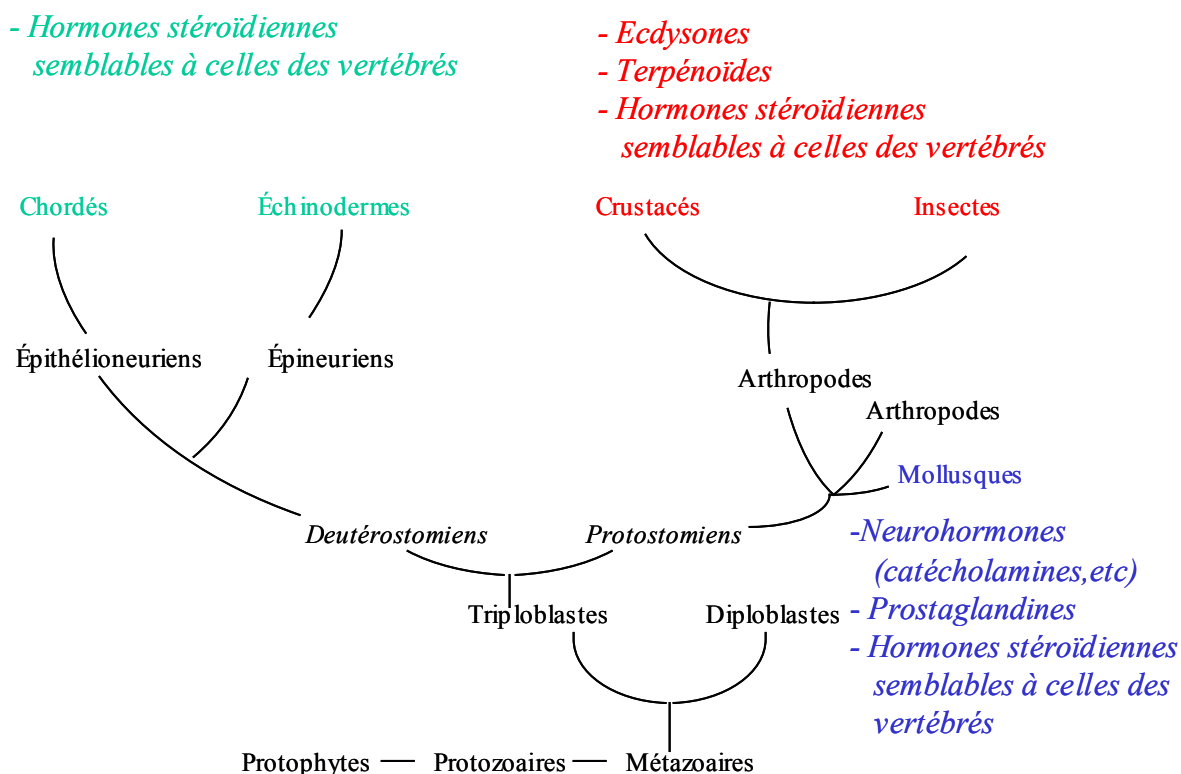
#### 2.2.2.4. Les autres effets observés dans le cas d'exposition aux xéno-œstrogènes

Servos (1999) a répertorié de très nombreuses études de toxicité (CL50, CE50, LOEL, NOEL, génotoxicité, mutagénicité) des alkylphénols et des alkylphénols polyéthoxylates. Cette toxicité croît lorsque la longueur de la chaîne des éthoxylates diminue puisque la liposolubilité des composés est alors plus importante. De nombreuses perturbations apparaissent chez des organismes exposés *in vivo* aux œstrogènes naturels ou aux alkylphénols. La majeure partie des études disponibles concernent une nouvelle fois les poissons chez qui les xéno-œstrogènes (EE2, NP, NP1EO, NP2EO, OP) affectent la croissance (Ashfield *et al.*, 1998; Drèze *et al.*, 2000) et la reproduction, avec notamment une baisse de l'indice gonado-somatique (Ashfield *et al.*, 1998; Scholz & Gutzeit, 2000) voire même une baisse de la fécondité chez les

femelles (Nimrod & Benson, 1996; Kramer *et al.*, 1998; Scholz & Gutzeit, 2000). La différenciation sexuelle peut également être perturbée avec l'apparition de caractères sexuels secondaires féminins chez les mâles et déjà évoqué au paragraphe 2.2.1, comme le développement d'une nageoire anale propre aux femelles chez des mâles *Gambusia holbrooki* exposés au NP (Drèze *et al.*, 2000). Une perturbation de la voie œstrogénique peut même engendrer l'apparition du phénomène d'intersexe évoqué en 2.2.1 (Gray & Metcalfe, 1997). En Grande-Bretagne, ce phénomène d'intersexe a déjà été observé *in situ* chez des poissons échantillonnés en aval de rejets de stations d'épuration (Jobling *et al.*, 1996) ou dans des zones côtières alors que les indices hépato-somatiques élevés étaient corrélés avec la présence de VTG dans le plasma (Allen *et al.*, 1999).

### **2.3. Les perturbations endocriniennes chez les invertébrés**

Les divergences entre l'endocrinologie des invertébrés et celle des vertébrés varient selon l'éloignement des espèces considérées sur l'arbre phylogénique de l'évolution des espèces. La figure 2-7 résume dans cette perspective les principales hormones du contrôle endocrinien pour des invertébrés de différents phyla. Il apparaît que chez les invertébrés deutérostomiens les hormones stéroïdiennes régulent la reproduction au terme d'une succession de régulation neurohormonale, alors que chez les protostomiens les neurotransmetteurs sont les principales "hormones" de la reproduction et du fonctionnement (Leblanc *et al.*, 1999). D'autres différences apparaissent également entre les protostomiens "supérieurs" (crustacés et insectes) et les protostomiens "inférieurs" (Mollusques). Chez les crustacés et les insectes, les terpénoïdes (hormones juvéniles), les ecdysones (spécifiques aux invertébrés) et les hormones stéroïdiennes régulent la mue, la différenciation et la métamorphose de même que l'ovulation, la



**Figure 2-1:** Phylogénie de l'usage des hormones chez les chordés et les invertébrés; modifiée de Leblanc (2000).

Les hormones stéroïdiennes semblables à celles des vertébrés sont responsables de la régulation de processus tels que le développement, la croissance et la reproduction chez les Deutérostomes. Chez les protostomes "supérieurs", cette régulation hormonale implique principalement les ecdystéroïdes, les terpénoïdes et les hormones stéroïdiennes semblables à celles des vertébrés alors que chez les protostomiens "inférieurs" les neurotransmetteurs jouent un rôle prépondérant par rapport aux hormones stéroïdiennes.

spermatogenèse et la vitellogenèse durant la reproduction. Les Mollusques utilisent d'avantage les neurotransmetteurs bien que la présence d'hormones stéroïdiennes et leur

implication dans la reproduction soit reconnue chez certains d'entre eux comme les gastéropodes et les bivalves (section 2.1.2).

L'endocrinologie des invertébrés, bien que "phylogéniquement" moins évoluée que celle des vertébrés, n'en demeure donc pas moins variée. Elle représente une cible potentielle pour les modulateurs endocriniens et la similitude structurale entre les ecdysones et le  $17\beta$ -œstradiol tend d'ailleurs à supposer que des xéno-œstrogènes soient aussi capables d'interférer avec des processus régulés par cette hormone. Un perturbateur endocrinien vis à vis des vertébrés ne sera cependant pas nécessairement actif chez les invertébrés et vice versa. Si l'action de ce perturbateur endocrinien agit plus spécifiquement sur l'homéostasie des hormones stéroïdiennes, des effets potentiels devront être recherchés chez les invertébrés, en particulier chez les échinodermes. Certains composés pourraient également perturber les régulations endocriniennes des invertébrés sans avoir d'effet chez les vertébrés. Le cas de l'œstrogénicité du coprostanol vis à vis du bivalve *Elliptio complanata* en est d'ailleurs une bonne illustration puisque ce composé n'est pas œstrogénique chez les mammifères et les poissons (Gagné *et al.*, 2001c). Cet exemple justifie clairement la nécessité d'estimer l'effet sur le contrôle endocrinien des invertébrés d'une exposition à des composés reconnus ou non comme perturbateurs endocriniens chez les vertébrés. Cette perspective nécessite cependant une bonne connaissance des régulations endocriniennes chez les invertébrés pour associer un effet à une perturbation endocrinienne. La description du contrôle endocrinien n'est malheureusement pas encore totalement achevée pour un grand nombre d'invertébrés dont les bivalves comme nous l'avons déjà évoqué dans la section 2.1.2. Sans une connaissance des mécanismes biologiques impliqués dans l'effet d'une perturbation

endocrinienne, il est également difficile de savoir si cet effet observé a une sensibilité suffisante pour un diagnostic pertinent à l'échelle de la population et de l'écosystème. De ce fait, de nombreuses études sont entreprises en laboratoire pour mettre en évidence des effets induits par une exposition à des hormones stéroïdiennes, car si un stéroïde peut induire un changement métabolique chez un organisme, le même effet peut a fortiori être induit ou inhibé par un perturbateur endocrinien (section 2.2.1). Cette approche est particulièrement utilisée pour mettre en évidence l'effet du  $17\beta$ -œstradiol pour évaluer l'effet potentiel de xéno-œstrogènes. Différents auteurs ont ainsi mis en évidence l'implication de E2 dans l'induction de la vitellogenèse chez divers invertébrés marins comme l'étoile de mer *Asteria rubens* (Schoenmakers *et al.*, 1981), le crustacé *Balanus amphitrite* (Billinghurst *et al.*, 2000) et les bivalves *Mya arenaria* (Blaise *et al.*, 1999), *Elliptio complanata* (Gagné *et al.*, 2001b) et *Crassostrea gigas* (Li *et al.*, 1998). Certaines de ces études ont d'ailleurs montré l'intérêt potentiel des vitellines comme biomarqueur d'exposition des invertébrés aux xéno-oestrogènes (section 1.2.2.2). Lorsque la synthèse des stéroïdes (Voogt *et al.*, 1991; Hines *et al.*, 1992b) et leur implication dans le contrôle de la reproduction sont connus comme chez les étoiles de mer (Xu & Barker, 1990; Hines *et al.*, 1992a), il est alors possible de tester l'effet d'un contaminant sur la stéroïdogénèse et d'estimer son impact sur la reproduction. L'interférence du clophen A50 (un biphényl polychloré) avec la gamétogenèse de *Asteria rubens* (Den Besten *et al.*, 1990) a ainsi pu être expliquée par la perturbation du métabolisme des stéroïdes *via* le cytochrome P450 (Den Besten *et al.*, 1991a). Le cadmium (Den Besten *et al.*, 1991a) et le benzo[a]pyrène (Den Besten *et al.*, 1991b) sont également capables d'interférer avec le métabolisme des stéroïdes de *A. rubens* *via* le cytochrome P450.

Les différentes études mentionnées jusqu'ici font appel à des techniques biochimiques et moléculaires qui démontrent la nature endocrinienne de l'effet observé. De nombreux tests de toxicité tentent cependant de détecter une perturbation endocrinienne en diagnostiquant des perturbations de la reproduction ou du développement. Dans certains cas particuliers, un critère spécifique peut être considéré. Une inhibition de la mue de daphnies exposées par exemple à différents biphényles polychlorés et à du diéthyl phtalate, démontre en effet l'interférence de ces composés (déjà répertoriés comme xéno-œstrogènes chez les vertébrés) avec le contrôle hormonal des ecdysones (Zou & Fingerman, 1997). En règle générale cependant, les critères de toxicité ne peuvent pas démontrer que l'effet observé résulte d'une perturbation endocrinienne. Ils font cependant appel chez différents invertébrés marins (crustacés, bivalves) à la reproduction (Kluytmans *et al.*, 1988; Czech *et al.*, 2001), au développement ou la viabilité larvaire (Ruiz *et al.*, 1995; Bechmann, 1999; Nice *et al.*, 2000; Jha *et al.*, 2000). Dans d'autres cas, la différenciation sexuelle est évaluée comme chez l'amphipode *Hyaella azteca* (Vandenbergh *et al.*, 2003) ou encore l'attachement larvaire chez *Balanus amphitrite* (Billinghamurst *et al.*, 1998). La pertinence écologique de ces critères permet dans une certaine mesure d'évaluer le risque d'une exposition au contaminant suspecté mais d'autres études biochimiques doivent toutefois démontrer la causalité hormonale de l'effet observé pour diagnostiquer une perturbation endocrinienne. En l'absence de biomarqueur spécifique, la seule alternative pour estimer l'exposition d'invertébrés à de potentiels perturbateurs endocriniens demeure malgré tout l'utilisation des critères intégrateurs (développement, reproduction, croissance, etc). Récemment, certaines recherches ont tenté de mettre au point des tests de toxicité avec des œstrogènes "modèles" (EE2, bisphénol A, octylphénol). Les paramètres sélectionnés



étaient liés au développement et à la reproduction du cnidaire *Hydra vulgaris*, des crustacés *Gammarus pulex* et *Hyaella azteca*, de l'insecte *Chironomus riparius* ou du gastéropode *Lymnaea stagnalis* (Segner *et al.*, 2003). Leurs résultats montrent par exemple, que pour *L. stagnalis* certains effets particuliers liés à l'éclosion, au métabolisme de protéines apparentées à de la vitellogénine ou à des atteintes cytologiques, pourraient être considérés comme réalistes pour identifier des perturbateurs endocriniens. Par contre, aucun des autres tests à court terme réalisés avec *G. pulex* et *C. riparius* ne pourraient être utilisés puisque les effets des perturbateurs endocriniens ne peuvent être détectés que sur la durée entière de la vie de l'organisme, en recherchant des effets multiples sur le développement, la croissance, la mue et la reproduction. Pour *H. azteca*, tous les tests (sur un cycle de vie ou multigénérationnels) mettent en évidence des effets organisationnels ou sur le développement de la gonade. D'autres tests de toxicité avec différents invertébrés (*Daphnia magna*, *C. prasinus*, *L. stagnalis*) tentent également d'offrir un outil de diagnostic sur différents types de reproduction (parthénogenèse, reproduction sexuée et hermaphrodisme) (Sánchez & Tarazona, 2002). Outre les lacunes dans nos connaissances du contrôle endocrinien de nombreux processus physiologiques, la diversité et la complexité des effets engendrés par les perturbateurs endocriniens rendent compte de l'ampleur des recherches à entreprendre pour identifier l'apparition d'une perturbation endocrinienne chez les invertébrés et développer des biomarqueurs ou des tests représentatifs d'une exposition à des perturbateurs endocriniens. Ces carences ont été mises en évidence par différents auteurs (Depledge & Billinghamurst, 1999; Kavlock, 1999) et doivent être comblées pour évaluer convenablement l'impact environnemental de l'émission des perturbateurs endocriniens.

La recherche en milieu naturel de perturbations endocriniennes chez les invertébrés n'est apparue qu'avec l'observation du phénomène d'imposex chez les gastéropodes exposés au TBT ou ses dérivés (dibutyl-étain, monobutyl-étain, oxydes d'étain, phényl-étain,, etc). Il s'agit du cas le mieux documenté d'une perturbation endocrinienne chez les invertébrés. De nombreuses études mécanistiques ont permis de décrire l'action du TBT sur la stéroïdogénèse (Matthiessen & Gibbs, 1998). Il induit une augmentation de la testostérone (Spooner *et al.*, 1991) en inhibant l'aromatase dépendante du cytochrome P450 (figure 1-2) par un phénomène de compétition entre l'androstènedione et la progestérone pour son site de liaison. Le déséquilibre entre androgène et œstrogène entraînerait alors un effet masculinisant qui expliquerait l'apparition d'un pénis chez les femelles (Bettin *et al.*, 1996). Ce phénomène d'imposex déjà évoqué dans la section 2.2.1, sa fréquence tout comme la longueur du pénis sont fonction du degré d'exposition au TBT (Spooner *et al.*, 1991). Grâce à ces descriptions mécanistiques, différents auteurs ont directement cherché des effets de l'exposition au TBT sur la stéroïdogénèse d'autres Mollusques comme les bivalves chez qui le phénomène d'imposex n'est pas observé. L'inhibition de l'aromatase du cytochrome P450 a ainsi été détectée *in situ* chez *Mytilus galloprovincialis* dans une zone côtière contaminée par le TBT (Morcillo *et al.*, 1999) et une augmentation de la testostérone a été induite chez *Ruditapes decussata* transplanté dans un site contaminé par le TBT (Morcillo & Porte, 2000). La démonstration *in situ* d'une perturbation endocrinienne chez un bivalve est exceptionnelle. L'imposex peut d'ailleurs être considéré comme l'exemple qui confirme la règle car des perturbations endocriniennes sont souvent soupçonnées *in situ* chez des invertébrés mais jamais démontrées. Des phénomènes d'intersexe sont parfois rapportés comme par exemple chez le homard *Homarus americanus* le long des côtes de la

Nouvelle-Écosse (Sangalang & Jones, 1980) ou chez des copépodes le long des côtes anglaises et à proximité d'une zone de rejet d'effluents (Moore & Stevenson, 1991). Dans la mer Baltique, des malformations embryonnaires ont été rapportées chez des amphipodes (Sundelin & Eriksson, 1998) et l'absence de spermatozoïdes chez *Mytilus edulis* (Sunila, 1988). Tous ces phénomènes apparaissent dans des sites contaminés mais aucun ne peut faire la preuve d'une perturbation endocrinienne.

La sélection d'un taxon parmi les invertébrés pour mettre en place en milieu naturel la surveillance d'effet de perturbateurs endocriniens devrait prioriser les critères suivants (Matthiessen *et al.*, 1999):

- système endocrinien caractérisé autant que possible
- importance écologique pour le maintien de l'écosystème
- cycle reproducteur rapide
- organisme sessile ou semi-sessile
- large distribution géographique et/ou
- espèce d'intérêt commercial

De récentes études laissent présager du potentiel de certains invertébrés comme les mollusques bivalves *Mya arenaria* (Blaise *et al.*, 1999), *Elliptio complanata* (Gagné *et al.*, 2001b) et *Crassostrea gigas* (Li *et al.*, 1998) ou le crustacé *Balanus amphitrite* (Billinghurst *et al.*, 2000) pour être considérés comme organismes sentinelles d'une exposition à des perturbateurs endocriniens. L'induction de la synthèse de protéines apparentées aux vitellines par les xéno-œstrogènes (section 1.2.2.1) offre en effet la perspective de développer un biomarqueur d'effet représentatif d'une perturbation endocrinienne chez ces espèces. Une connaissance approfondie de la vitellogenèse

s'avère toutefois indispensable pour établir les limites d'utilisation *in situ* des vitellines comme biomarqueur d'effet. La description des variations saisonnières des concentrations en vitellines et s'il y a lieu de leur synthèse spécifique à un sexe et à un tissu seront également nécessaires au processus de validation de ce biomarqueur.

## **CHAPITRE III**

### **LA VITELLOGENÈSE CHEZ *MYA ARENARIA***

### 3.1. INTRODUCTION

L'activité synthétique de la gonade est particulièrement importante durant la vitellogenèse. Les ovocytes se multiplient et leur développement implique une augmentation de la quantité de leurs réserves énergétiques et de ce fait une augmentation de leur diamètre. Jusqu'à présent, la gamétogenèse chez *Mya arenaria* a été décrite selon cinq stades: un stade indifférent, un stade de développement (actif), un stade mûr, un stade de ponte et un stade passé (Ropes & Stickney, 1965). Nous décrirons la maturation sexuelle de *Mya arenaria* en accordant une attention particulière au processus vitellogénique puisque le stade "développement" décrit par Ropes & Stickney (1965) ne distingue pas les différents degrés de développement des ovocytes jusqu'à leur maturité. Pour mener à bien cet objectif, nous avons distingué les myes femelles en début, en milieu et en fin de développement. Des mesures de diamètres des ovocytes ont été réalisées ainsi que les dosages biochimiques des concentrations en protéines, en ADN et en ARN dans la gonade de chaque individu pour rendre compte de l'activité synthétique de la gonade. Nous avons également utilisé un antisérum qui reconnaît une protéine de type vitelline et spécifique aux femelles (Female specific protein: FSP) du pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Osada *et al.*, 1992). Cet antisérum nous a permis de doser par ELISA et de manière semi-quantitative la (ou les) protéine(s) de type vitelline(s) présente(s) dans la gonade de myes tout au long de la vitellogenèse. Une électrophorèse a également été réalisée avec des fractions de gonades de femelles à différents stades de développement pour une estimation de la masse moléculaire des protéines les plus abondantes. Une analyse densitométrique a également permis d'estimer l'abondance de ces protéines selon le stade de maturité de la gonade. La figure

3-1 synthétise les choix méthodologiques relatifs à l'approche histologique et biochimique que nous avons choisie dans le cadre d'un suivi saisonnier de la gamétogenèse et de la caractérisation de la vitellogenèse.

## **3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE**

### **3.2.1. Échantillonnage des myes**

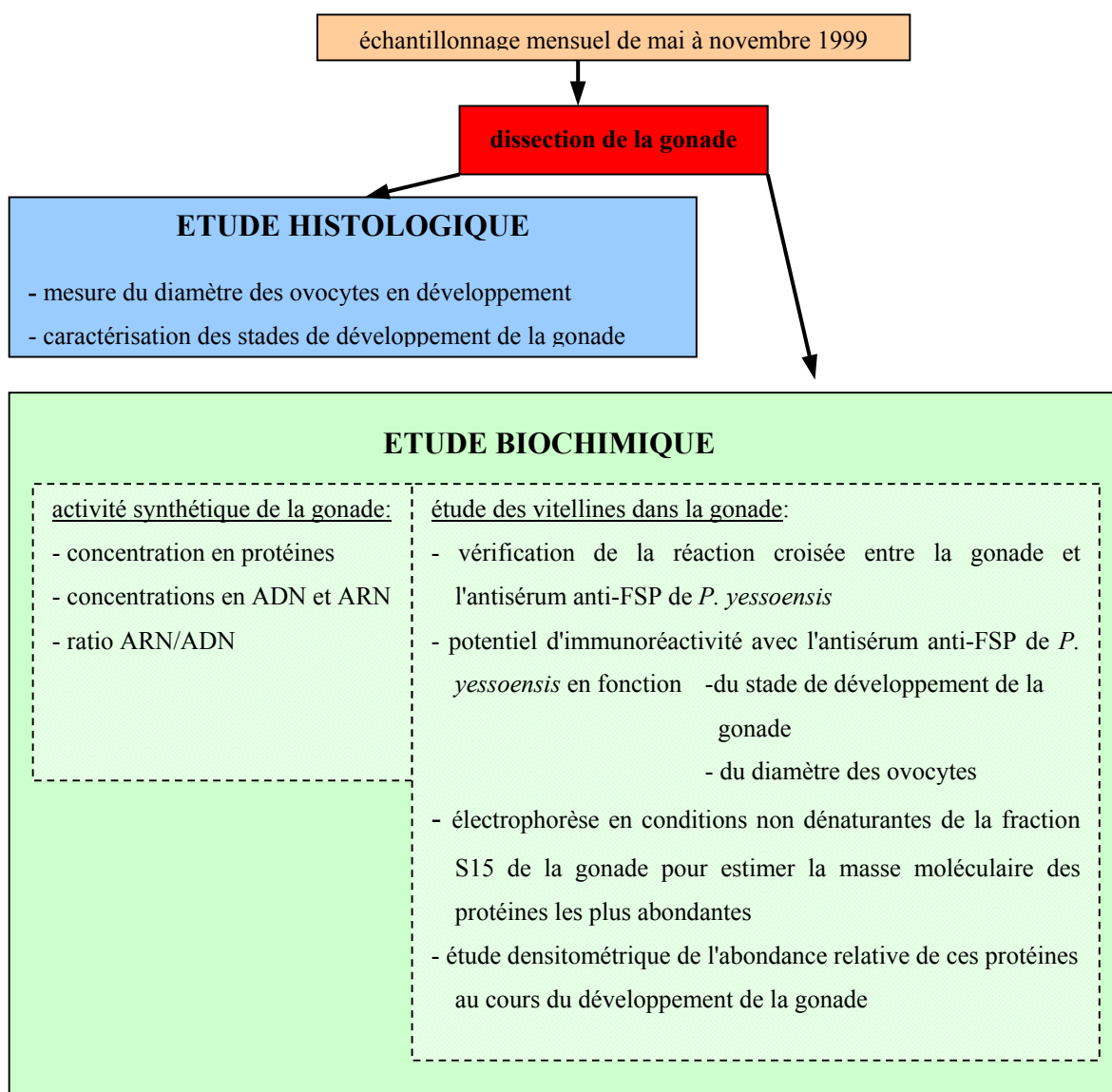
#### 3.2.1.1. Le site d'échantillonnage

Le site d'échantillonnage pour cette étude devait être reconnu comme un site témoin, dépourvu de contamination urbaine par un apport direct d'effluents ou par une contamination agricole via l'affluence d'une rivière d'un bassin versant ayant drainé des terres agricoles. Le site de Métis sur Mer (figure 3-2) situé sur la rive sud du Saint-Laurent à proximité de Rimouski nous a permis de répondre à cette attente. Le niveau résiduel de contamination par les BPC nous a d'ailleurs été confirmé par le Dr Michel Lebeuf, Chimiste à l'Institut Maurice Lamontagne de Pêches et Océans Canada.

#### 3.2.1.2. Fréquence d'échantillonnage et sélection des myes

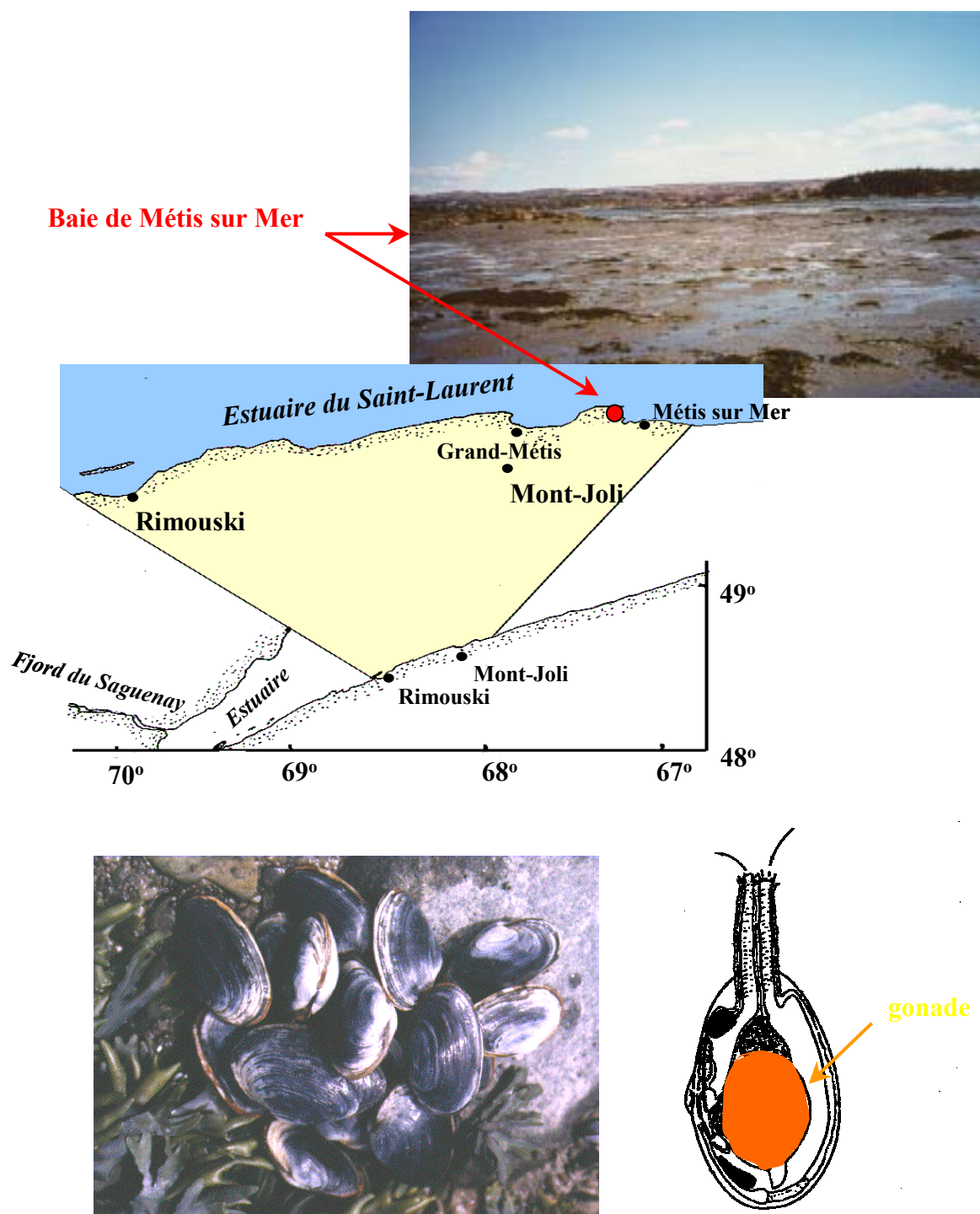
L'échantillonnage a été réalisé du mois de mai au mois de novembre 1999 afin de pouvoir suivre la période de maturation sexuelle des myes. La rigueur de l'hiver ne permettait pas d'accéder à la batture avant le mois de mai à cause du couvert de glace à l'hiver et après le mois de novembre à cause de l'inaccessibilité du site enneigé. Durant l'hiver, ces conditions environnementales impliquent d'ailleurs que les myes restent en diapause et qu'aucun développement de la gonade ne soit permis. Une fréquence mensuelle d'échantillonnage a été jugée suffisante d'après le déroulement de la maturation sexuelle des myes du Saint-Laurent déjà décrite dans différentes études (Roseberry *et al.*, 1991; Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Une certaine classe de taille a

cependant été sélectionnée afin que tous les individus appartiennent à des classes d'âge relativement proches (MacDonald *et al.*, 1998). Nous avons choisi la classe de taille entre 6,5 et 7,5 cm pour la longueur de la coquille ce qui nous permettait d'échantillonner des individus ayant une masse de chair suffisante pour les diverses analyses.



**Figure 3-1:** Représentation schématique de la méthodologie utilisée pour l'étude de la vitellogenèse chez *Mya arenaria*.





**Figure 3-2:** Présentation du site d'échantillonnage de Mitis sur Mer et des myes échantillonnées pour les dissections de la gonade.

Soixante individus ont été échantillonnés à chaque mois pour permettre d'avoir un nombre suffisant de femelles, le sexe ratio étant proche de 1 pour les myes de la rive sud du Saint-Laurent (Gauthier-Clerc, 1998).

Les dissections ont eu lieu à 4°C dans une chambre froide et dans les 24 heures qui ont suivi chaque échantillonnage. Une fois la gonade prélevée, chaque morceau destiné à un type d'analyse a été congelé à -80°C jusqu'au moment de l'analyse. Le morceau de tissu destiné à l'étude histologique a été traité tel que décrit dans le paragraphe 3.2.2.1.

### **3.2.2. Étude histologique de la gonade**

#### 3.2.2.1. Préparation des coupes histologiques

Pour chaque individu, un morceau de gonade a été fixé durant 2 h dans du réactif de Bouin. Après la fixation, la gonade a été graduellement déshydratée pour être entreposée dans de l'éthanol 70 % jusqu'au moment de l'inclusion dans la résine. Au moment de l'inclusion, la déshydratation de la gonade est poursuivie dans de l'éthanol pour atteindre 95 %. L'inclusion a ensuite été réalisée dans une résine synthétique de méthacrylate (kit d'enrobage Marivac, JB-4®). Des coupes de 3 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome Reichert-Jung 2050. Une coloration de Lee (mélange de bleu de méthylène et de fuchsine) a servi à colorer les coupes histologiques qui ont ensuite été montées pour être examinées au microscope.

#### 3.2.2.2. Examen histologique de la gonade et de la croissance des ovocytes

Les stades de développement de la gonade ont été déterminés selon la description de l'ovogenèse de Coe et Turner (1938) et en modifiant les distinctions de cinq stades de

Ropes & Stickney (1965) dont les critères de reconnaissance sont synthétisés dans le tableau 2-1. Afin de mieux décrire la croissance des ovocytes durant la vitellogenèse, le diamètre de 30 ovocytes choisis au hasard a été mesuré pour chaque femelle dont la gonade était au début, en cours ou en fin de développement selon Coe & Turner (1938). Les mesures ont été réalisées avec un microscope optique Olympus BX 50 (1.25x10x20) muni d'une caméra et du logiciel de traitement d'image Mocha (Jandel Scientific). Des photographies ont également été prises pour présenter l'évolution morphologique de la gonade au cours de la vitellogenèse avec un même grossissement (x 250).

Une fois les différents stades de développement identifiés durant la vitellogenèse, la maturation sexuelle saisonnière a été représentée pour chaque mois en terme de pourcentage relatif (a, b, c, d, e, f) de chaque stade observé à chaque mois, du stade indifférent au stade passé incluant les différents stades de la vitellogenèse et le stade de ponte. Un indice de maturité (IM) a aussi été calculé pour chaque mois. Cet indice IM est égal à la somme des différents coefficients attribués à chaque stade de développement (1 = stade indifférent; 2 = stade pré-vitellogénique; 3 = stade vitellogénique; 4 = stade post-vitellogénique; 5 = stade de ponte; 6 = stade passé) pondérés par le pourcentage de femelles répertorié à chacun des stades (a, b, c, d, e ou f). Dans ce cas,  $IM = (1 \times a) + (2 \times b) + (3 \times c) + (4 \times d) + (5 \times e) + (6 \times f)$ .

**Tableau 3-1:** Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade femelle d'après Ropes & Stickney (1965).

stade	critères de reconnaissance
indifférent (ou inactif)	nombreuses cellules folliculaires, importantes réserves lipidiques dans les cellules folliculaires, apparition des ovogonies à la périphérie des alvéoles
développement (ou phase active)	développement plus ou moins avancé des ovogonies depuis la périphérie des alvéoles vers la lumière de l'alvéole,
mûr	ovocytes de grand diamètre majoritaires en nombre dans l'alvéole, nombreux ovocytes libres dans la lumière alvéolaire, quasi-absence des cellules folliculaires
ponte	petit nombre de gros ovocytes dans la lumière de l'alvéole
passé	présence de gros ovocytes diffus en dégénérescence et quasi- absence de structure cellulaire dans les alvéoles

### 3.2.3. Dosages biochimiques pour déterminer l'activité synthétique de la gonade

#### 3.2.3.1. Dosage des protéines

Les protéines ont été dosées selon la méthode de Bradford (1976). Les tissus ont été homogénéisés dans du tampon phosphate (0,1M, pH 7) et l'albumine bovine (Sigma, fraction V) a servi de standard pour la gamme étalon. Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées à 595 nm sur un spectrophotomètre Beckman DU 640.

#### 3.2.3.2. Dosage des acides nucléiques

Les dosages d'ARN et d'ADN ont été réalisés par fluorimétrie en utilisant du Thiazole Orange (TO) d'après la méthode adaptée par Mayrand *et al.* (1998). Le principe du dosage est de déterminer la fluorescence de la quantité totale d'acides nucléiques d'un sous-échantillon d'homogénat de gonade. Puis, dans un autre sous-échantillon provenant

du même homogénat, l'ARN est hydrolysé avec une ARNase pour déterminer la fluorescence relative à la quantité d'ADN. Par différence entre la fluorescence des acides nucléiques totaux et celle de l'ADN, on peut alors calculer la fluorescence relative à l'ARN lors du dosage des acides nucléiques totaux:

$$\text{Fluorescence de l'ARN} = [\text{fluorescence des acides nucléiques totaux}] - [\text{fluorescence de l'ADN}]$$

Deux gammes étalons, une pour des concentrations connues en ADN et l'autre pour des concentrations connues en ARN ont été réalisées en utilisant la même concentration en TO durant le dosage (0,3 mL dans 2,7 mL). Les concentrations en ADN et en ARN des échantillons sont alors calculées d'après leur fluorescence avec les gammes étalons. Le détail du protocole de dosage est décrit dans l'annexe 1.

Toutes les femelles échantillonnées de mai à novembre ont fait l'objet de ce dosage dans la gonade. Le pourcentage de récupération pour l'ADN et l'ARN a été calculé en réalisant des ajouts dosés dans un homogénat de gonade et ils étaient respectivement de  $97,6 \% \pm 0,6$  et  $95,7 \% \pm 0,9$  avec  $N=3$  dans les deux cas.

#### **3.2.4. Immunoréactivité des vitellines de *Mya arenaria* avec l'anticorps de *Patinopecten yessoensis* et dosage semi-quantitatif par ELISA**

Pour cette partie de notre étude, nous avons utilisé un antisérum développé contre la protéine de réserve de type vitelline et spécifique aux femelles (FSP) de pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Osada *et al.*, 1992). Osada *et al.* (1992) ont montré que cette protéine a une masse moléculaire de 450 kDa et qu'elle est uniquement présente dans la

gonade. Ils ont également montré que l'antisérum anti-FSP reconnaît trois autres protéines de grande masse moléculaire présentes dans la gonade du pétoncle. De plus, une réaction croisée a été observée entre l'antisérum anti-FSP et des tissus de gonades de *Mytilus edulis* et *Chlamys farreri nipponensis*. Cette immunoréactivité des gonades de *Mytilus* et *Chlamys* avec l'antisérum montre que celui-ci possède au moins un déterminant capable de reconnaître des protéines présentes chez ces organismes. Les trois bivalves (*P. yessoensis*, *M. edulis* et *C. farreri*) possèdent donc des protéines similaires même si l'antisérum doit certainement présenter un manque de spécificité pour les protéines de type vitelline de *Mytilus* et *Chlamys*. Après vérification d'une réaction croisée entre l'antisérum anti-FSP de pétoncle et le tissu gonadique de *Mya arenaria*, un dosage semi-quantitatif de vitelline(s) des myes a été réalisé par ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

Nous avons sélectionné cinq gonades femelles pour chacun des stades de maturation tel qu'ils ont été définis durant la vitellogenèse grâce à l'étude histologique: stade indifférent, stade prévitellogénique, stade vitellogénique, stade post-vitellogénique, stade mûr et stade passé. Pour chaque individu, un morceau de gonade (environ 150 mg) a été homogénéisé dans 1 mL de tampon (100 mM NaCl, 10 mM Hepes-NaOH, 1 mM EDTA et 1 mM dithiothréitol) et centrifugé à 15 000 g pendant 20 minutes à 2°C. Le surnageant, ou fraction S15, a ensuite été dilué dans du NaHCO<sub>3</sub> 100 mM pH 9 pour que la quantité en protéines totales présente dans les 100 µL de surnageant placé dans chaque puits n'excède pas 1 µg. Pour chaque fraction (diluée si nécessaire), 100 µL sont placés dans un puits de la microplaque (Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Plate, MaxiSorp<sup>TM</sup> Surface, Danemark) pour toute la nuit à 4°C. La plaque est ensuite lavée deux fois avec un

tampon PBS pH 7,4 (NaCl 125 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM). Chaque puits est ensuite saturé avec 200 µL d'albumine bovine (BSA) 3 % dans du PBS-Tween20 0,05 % pH 7,4 pendant 45 minutes à 37°C. Les puits sont alors vidés et l'antisérum dilué 500 fois dans le tampon PBS-BSA-Tween-20 pH 7,4 est ajouté pour une incubation de 1 heure à 37°C. La plaque est ensuite lavée trois fois avec du tampon PBS pH 7,4, et 100 µL d'IgG produit contre les anticorps de lapin, marqué à la phosphatase alcaline (Sigma A2556) et dilué 500 fois dans le tampon PBS-BSA-Tween 20, sont répartis dans chaque puits pour 45 minutes à 37°C. Après un lavage avec le tampon PBS pH 7,4, la quantité du deuxième anticorps ayant réagi avec l'antisérum et restant dans chaque puits, est déterminée selon la procédure du kit de chimiluminescence qui a pour substrat la phosphatase (BM Chemiluminescence ELISA substrate (AP), Roche). La luminescence a alors été mesurée pour chaque puits afin de déterminer de manière semi-quantitative la teneur en vitelline dans les extraits gonadiques des femelles.

Afin de vérifier que cette méthode de dosage était appropriée pour une évaluation semi-quantitative, nous avons préalablement vérifié la linéarité du signal de luminescence obtenu pour une série de deux dilutions réalisées sur une même fraction gonadique de mye et diluée avec du NaHCO<sub>3</sub> 100 mM pH 9. Cette linéarité était effective et les dosages ont pu être réalisés avec les échantillons. Ne disposant pas de vitelline(s) de mye ou de pétoncle purifiée(s) pour réaliser un dosage quantitatif avec une gamme étalon, les résultats ont été exprimés de manière semi-quantitative en terme de potentiel d'immunoréactivité avec l'antisérum anti-FSP de pétoncle. Après avoir normalisé pour chaque puits le signal de luminescence par la quantité de protéines présente dans les 100 µL de l'extrait utilisé pour le dosage, le potentiel d'immunoréactivité des vitellines de

mye, vis à vis de l'antisérum anti-FSP de pétoncle a été exprimé en pourcentage par rapport à la valeur [luminescence/quantité de protéines] la plus élevée et déterminée chez les femelles.

Pour rendre compte d'une certaine spécificité du sexe des myes quant à la présence de protéine(s) de type vitelline(s), le même type de dosage par ELISA avec l'antisérum anti-FSP de pétoncle a été réalisé avec des fractions S15 de gonades de mâles à différents stades de développement.

### **3.2.5. Vers une caractérisation des vitellines de *Mya arenaria***

Parmi les fractions S15 de gonade réalisées pour le dosage semi-quantitatif de vitelline(s) décrit dans le paragraphe précédent, cinq ont été sélectionnées à différents stades de développement. Parmi ces cinq stades, deux ont été préalablement caractérisés avec l'étude histologique pour représenter le degré d'évolution de la vitellogenèse: le stade pré-vitellogénique et le stade vitellogénique. Les autres stades étaient le stade indifférent, le stade de ponte et le stade passé. L'électrophorèse a été réalisée en conditions non dénaturantes avec un gel de haute résolution NuPAGE® Bis-Tris 4-12 % de Invitrogen. 40 µL de chaque fraction ont été placés dans deux puits consécutifs. Des marqueurs de masses moléculaires ont été placés dans le premier puits du gel d'électrophorèse: myosine (250 kDa); phosphorylase (148 kDa); albumine sérique de bovin ou BSA (98 kDa) et de l'albumine dans le deuxième pour une éventuelle quantification des protéines relative à l'intensité de leur coloration. Le tampon des réservoirs était un tampon Tris-acétate 50 mM, 0,1 % SDS, 125 mM glycine, pH 8,3. La durée de l'électrophorèse a été de 3h 45 minutes avec un ampérage de 125 mA. Au



terme de la migration, le gel a été coloré avec du bleu de Coomassie G-250 puis fixé avec un mélange de méthanol (40 %) et d'acide acétique (10 %). La masse moléculaire approximative des bandes apparues pour les extraits de gonades a été calculée en comparant leur distance de migration (Rf) avec celle des trois marqueurs de masses moléculaires. L'intensité de la coloration des bandes dans la région de grande masse moléculaire (> 400 kDa) a été évaluée grâce au logiciel de traitement d'image Un-Scan-It.

### **3.2.6. Traitement des données**

Les valeurs présentées dans ce chapitre sont les moyennes ( $\pm$  erreur type). Des tests de comparaisons de moyennes ont été réalisés entre les paramètres suivants:

- diamètre moyen des ovocytes au début, en cours et à la fin du développement vitellogénique,
- concentrations moyennes en protéines et en acides nucléiques des six stades de développement de la gonade,
- potentiel d'immunoréactivité des gonades pour l'antisérum anti-FSP de pétoncle durant la vitellogenèse.

La normalité de la distribution des données a préalablement été vérifiée avec un test de Levene. Pour faire une comparaison des données (en fonction des stades de développement de la gonade) une ANOVA à un facteur a été réalisée dans des conditions où la normalité était respectée ou alors un test Kruskal-Wallis était appliqué. Les données étaient par la suite soumises à un test de Tuckey (ou de Dunn lorsque les effectifs n'étaient pas égaux entre les groupes) pour distinguer les différences significatives entre groupes.

Des analyses de corrélation linéaire ont également été réalisées avec un test de Spearman pour évaluer la corrélation entre le diamètre des ovocytes et les concentrations des différentes composantes biochimiques durant le processus vitellogénique.

### 3.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

#### 3.3.1. Description de la croissance des ovocytes durant la vitellogenèse

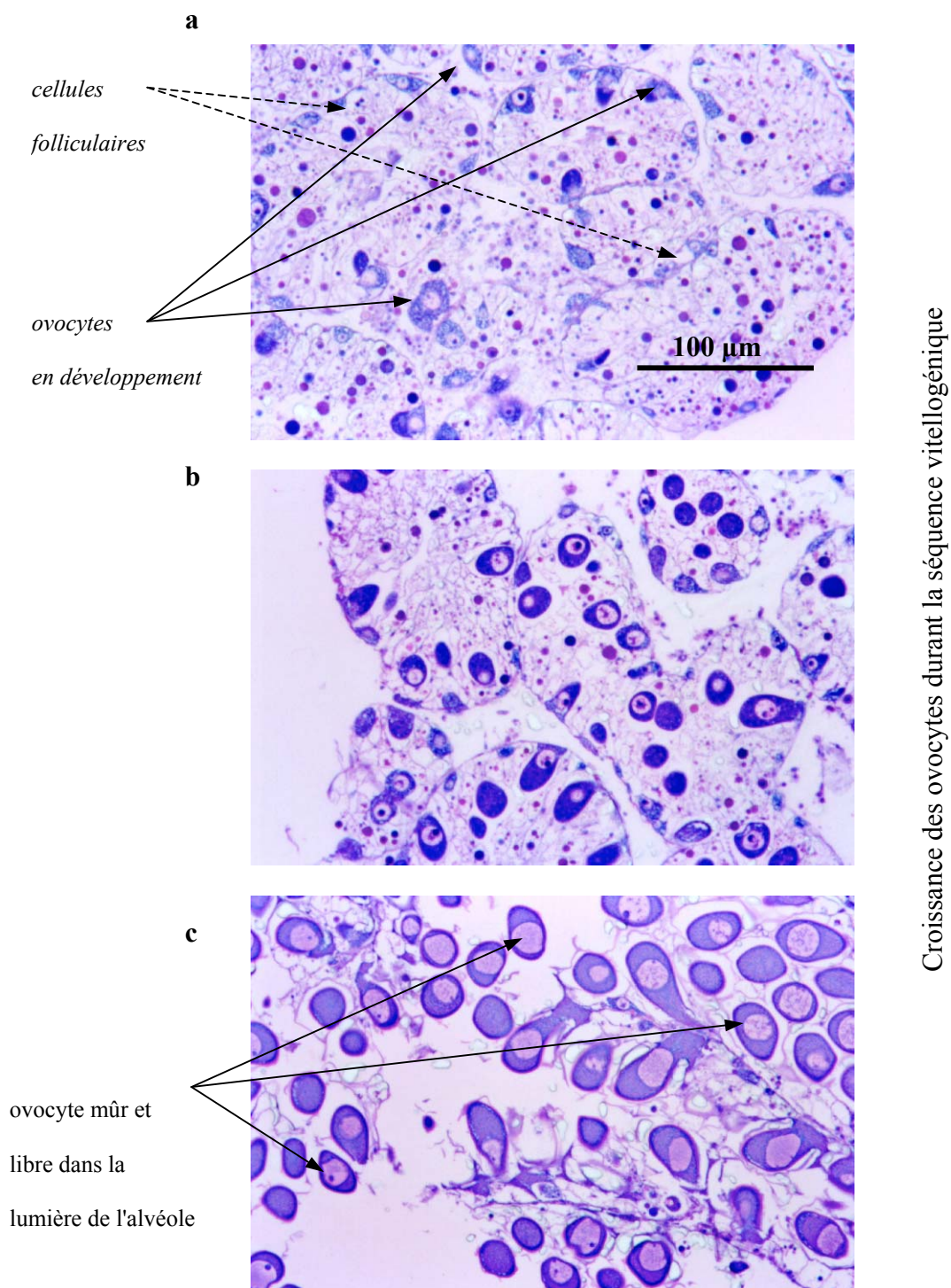
Parmi les 60 individus échantillonnés mensuellement de mai à novembre, le nombre de femelles était de 33, 36, 31, 33, 38, 26 et 33 pour chaque mois respectivement. En distinguant les femelles en début, au milieu et à la fin du développement, la mesure du diamètre moyen des ovocytes nous a statistiquement permis de décrire une séquence vitellogénique. Le tableau 3-2 présente les différentes classes de taille selon le degré d'avancement de la vitellogenèse:

**Tableau 3-1:** Classes distinctes ( $p < 0,05$ ) de taille du diamètre moyen de l'ovocyte ( $\emptyset$ ) selon le degré d'avancement du processus vitellogénique.

stade de développement	pré-vitellogénique	vitellogénique	post-vitellogénique
classe de taille du diamètre moyen des ovocytes ( $\mu\text{m}$ )	$\emptyset < 20$	$20 < \emptyset < 40$	$40 < \emptyset$ (max. 64.5)

Le diamètre moyen des ovocytes est de  $17 \mu\text{m}$  ( $\pm 5$ ) au stade pré-vitellogénique,  $25 \mu\text{m}$  ( $\pm 6$ ) au stade vitellogénique et  $42 \mu\text{m}$  ( $\pm 7$ ) au stade post-vitellogénique. Les figures 3-3 (a, b et c) présentent les coupes histologiques de gonade de myes pour ces trois stades. Durant la vitellogenèse, le développement des ovocytes est très apparent depuis la périphérie jusqu'à la lumière de l'alvéole où ils sont libres une fois leur maturité achevée

au stade post-vitellogénique. Au terme de la vitellogenèse, la classe de taille du diamètre des ovocytes observé chez *Mya arenaria* est tout à fait comparable avec les observations réalisées chez *Crassostrea gigas* (Eckelbarger & Davis, 1996; Matsumoto *et al.*, 1997; Lango-Reynoso *et al.*, 2000), *Mytilus edulis* (Lubet, 1959), *Pecten maximus* (Dorange & Le Pennec, 1989) et *Patinopecten yessoensis* (Osada *et al.*, 1992). Le stade post-vitellogénique marque la fin de la maturation des ovocytes qui sont alors prêts à être expulsés pour être fécondés. Cette étude morphométrique nous permet donc clairement de redéfinir le déroulement de la gamétogenèse chez *Mya arenaria* en distinguant six stades de développement de la gonade selon les critères présentés dans le tableau 2-3.



**Figure 3-1:** Coupes histologiques de gonade femelle de *Mya arenaria* a) au stade pré-vitellogénique; b) au stade vitellogénique; c) au stade post-vitellogénique.

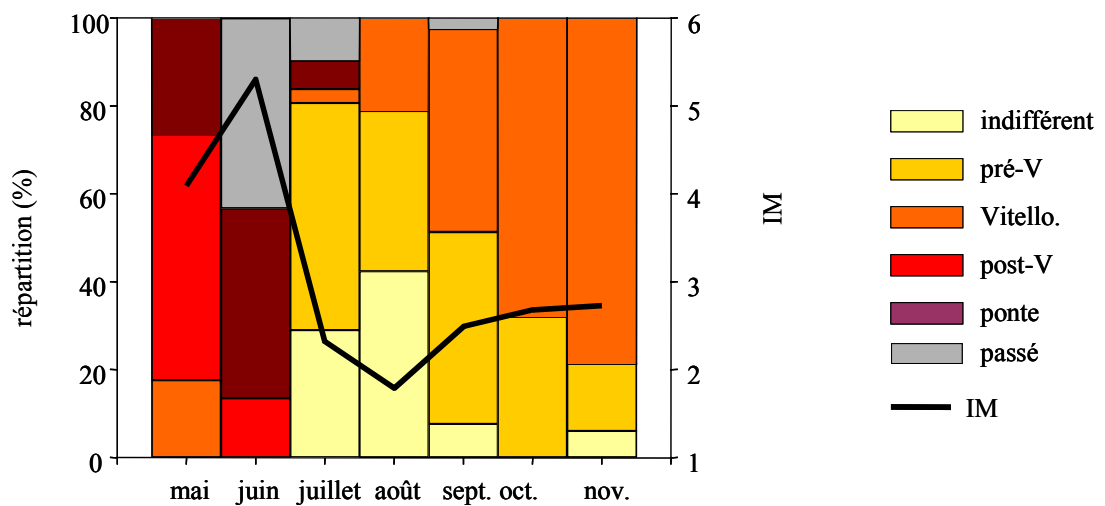
**Tableau 3-2:** Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade femelle d'après l'étude histologique de la vitellogenèse.

stade	critères de reconnaissance
indifférent*	nombreuses cellules folliculaires, importantes réserves lipidiques dans les cellules folliculaires, absence d'ovogonies ou ovogonies de très petite taille à la périphérie de l'alvéole.
pré-vitellogénique	développement plus ou moins avancé des ovocytes depuis la périphérie vers la lumière des alvéoles, ovocytes en développement de diamètre moyen inférieur à 20 $\mu\text{m}$ , nombreuses cellules folliculaires.
vitellogénique	ovocytes en croissance, de diamètre moyen compris entre 20 et 40 $\mu\text{m}$ , disparition partielle des cellules folliculaires
post-vitellogénique	ovocytes de diamètre moyen supérieur à 40 $\mu\text{m}$ majoritaires dans l'alvéole, nombreux ovocytes libres dans la lumière alvéolaire, quasi-absence des cellules folliculaires
ponte*	petit nombre de gros ovocytes dans la lumière de l'alvéole
passé*	présence de gros ovocytes diffus en dégénérescence et quasi-absence de structure cellulaire dans les alvéoles

### 3.3.2. Déroulement de la gamétogenèse de mai à novembre 1999

La figure 2-4 présente la maturation sexuelle des femelles de mai à novembre 1999. La période la plus active de la maturation sexuelle est rapportée au mois de mai et juin avec l'observation de stades post-vitellogénique (55 % en mai) et de ponte (43 % en juin). Cette période est très courte dans le temps et montre bien la stratégie opportuniste de reproduction des myes en fonction des conditions abiotiques plus favorables durant ces quelques mois. Nos résultats corroborent sur ce point d'autres études sur la reproduction des myes dans l'estuaire du Saint-Laurent (Roseberry *et al.*, 1991; Gauthier-Clerc, 1998). Une autre période de développement apparaît cependant durant l'automne et le

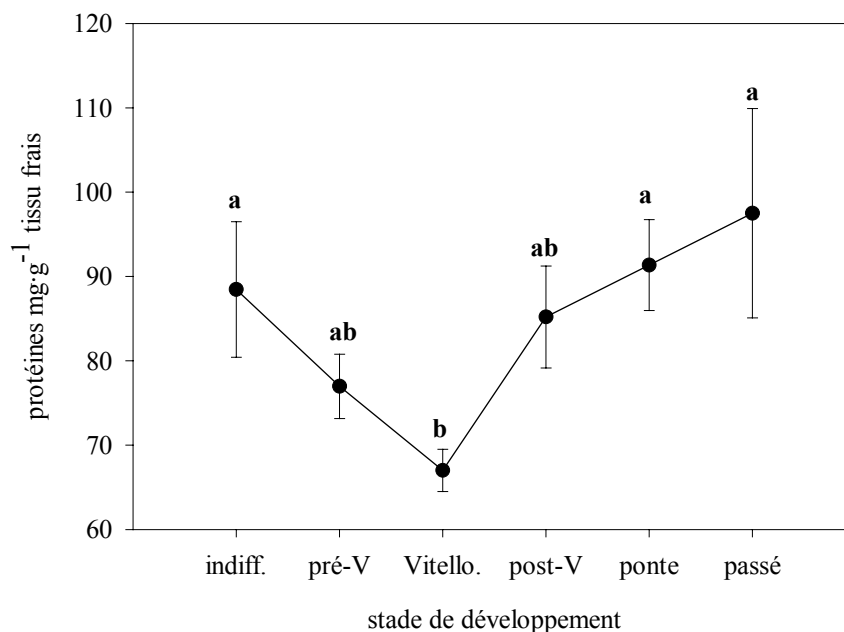
nombre de femelles au stade vitellogénique augmente de 46 % en septembre à 78 % en novembre mais aucun stade de ponte n'a été rapporté durant nos derniers échantillonnages. L'utilisation de l'indice de maturité traduit très bien l'évolution de la maturation des ovocytes. Sa valeur est maximale en juin (5,3) et sa valeur augmente de 1,8 à 2,7 en novembre ce qui traduit bien la reprise d'une maturation des ovocytes.



**Figure 3-1:** Déroulement saisonnier de la gamétogenèse chez *Mya arenaria* femelle de mai à novembre 1999 et variation de l'indice de maturité (IM).

### 3.3.3. Variation de l'activité synthétique de la gonade durant le processus de maturation sexuelle

Les concentrations en protéines, en ADN et en ARN pour les six stades de développement de la gonade sont représentées sur les figures 3-5 et 3-6. Les concentrations en protéines diminuent entre le stade indifférent ( $88,4 \pm 8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais) et le stade vitellogénique ( $67,0 \pm 2,5 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais) mais une augmentation significative est ensuite observée et est plus élevée que celle au stade vitellogénique (ANOVA  $F=4.87$ ;  $p<0.05$ ). Les concentrations en acides nucléiques présentent également des différences significatives entre les différents stades de développement de la gonade et en particulier durant la vitellogenèse. Du stade pré- vitellogénique au stade post-vitellogénique, les concentrations en ADN et en ARN augmentent significativement de  $0,11 (\pm 0,03)$  à  $0,17 (\pm 0,02) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissu frais (ANOVA  $F=63.27$ ;  $p<0.05$ ) et de  $4,48 (\pm 1,18)$  à  $9,55 (\pm 2,18) \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissu frais (ANOVA  $F=3.30$ ;  $p<0.05$ ) respectivement. Le ratio ARN/ADN augmente également significativement entre le stade pré- et post-vitellogénique (ANOVA  $F=14.59$ ;  $p<0.05$ ). Au stade indifférent, la valeur minimale de ce ratio tout comme la concentration minimale en ARN mettent clairement en exergue l'augmentation ultérieure de l'activité synthétique de la gonade durant la maturation sexuelle. Les augmentations significatives en ADN et en ARN observées durant la vitellogenèse soulignent l'intérêt de notre nouvel outil d'évaluation du degré de développement des ovocytes (tableau 3-3) puisqu'il permet de décrire avec plus d'acuité les changements biochimiques liés à la maturation des ovocytes durant la vitellogenèse. Son utilisation devrait être préconisée pour l'étude des variations saisonnières de biomarqueurs potentiellement impliqués dans la maturation sexuelle chez *Mya arenaria*.

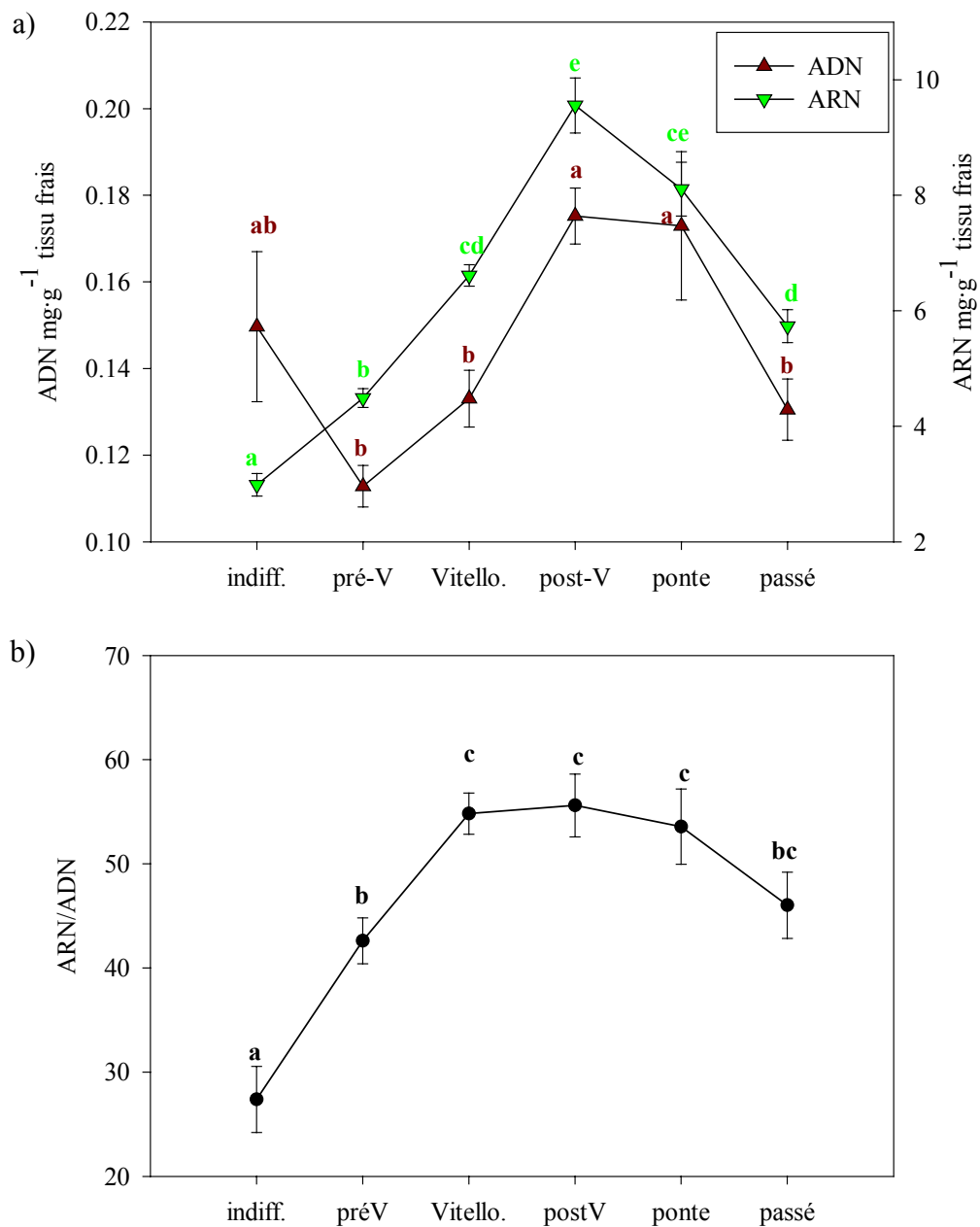


**Figure 3-1:** Concentration moyennes ( $\pm$  erreur type) en protéines suivant le stade de développement de la gonade femelle.

*Légendes:* stade pré-V pour pré-vitellogénique, Vitello. pour vitellogénique et post-V pour post-vitellogénique; les moyennes marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

L'augmentation de l'activité synthétique dans la gonade des myes durant le développement des ovocytes reste conforme au principe de la synthèse de réserves énergétiques. Les concentrations en ARN sont également comparables avec celles détectées chez *Pecten maximus* (Lubet *et al.*, 1987; Robbins *et al.*, 1990a) et *Crassostrea gigas* (Li *et al.*, 2000). Les valeurs des ratios ARN/ADN sont cependant différentes de celles rapportés chez d'autres bivalves à cause des plus faibles concentrations en ADN rapportées chez les myes. L'augmentation du ratio ARN/ADN





**Figure 3-2:** Variation a) des concentrations moyennes ( $\pm$  erreur type) en ADN et en ARN et b) des ratios moyens ( $\pm$  erreur type) ARN/ADN suivant le stade de développement de la gonade femelle.

*Légende:* les moyennes marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

reflète malgré cela l'augmentation de l'activité synthétique durant la vitellogenèse. Parmi les différentes composantes biochimiques analysées dans la gonade, les concentrations en ARN sont les plus représentatifs de l'augmentation du diamètre moyen des ovocytes (tableau 3-4). Cette corrélation montre que l'augmentation des concentrations en ARN reflète bien l'augmentation de l'activité synthétique de la gonade confirmée par l'augmentation du ratio ARN/ADN. Au contraire, la corrélation reste faible entre les concentrations en protéines de la gonade et le diamètre moyen des ovocytes (figure 3-5). Ce constat semble montrer que si la présence des vitellines de nature glycoprotéique ne peut ici être remise en cause, elle ne résulte pas d'une synthèse accrue de protéines en particulier au début de la vitellogenèse chez les myes. D'autre part, le calcul de la quantité moyenne de protéines dans la gonade des individus au stade pré-vitellogénique ( $109 \pm 43$  mg) n'est pas statistiquement différent de celle de la gonade des individus au stade vitellogénique ( $120 \pm 41$  mg) alors que cette quantité augmente significativement ( $p < 0,05$ ) au stade post-vitellogénique ( $158 \pm 15$  mg). Bien que l'accumulation de protéines n'apparaît qu'à la fin du processus vitellogénique, des protéines déjà présentes dans la gonade pourraient servir de précurseur dès le début du développement des ovocytes et jusqu'au stade vitellogénique. Les concentrations en protéines rapportées dans cette étude pour la gonade sont d'ailleurs plus élevées que celles rapportées de mai à octobre 1997 dans les gonades de myes échantillonnées sur la rive nord du Saint-Laurent (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Durant cette étude réalisée chez *Mya arenaria* en 1997, les protéines représentaient cependant près de 70 % des constituants de la gonade ce qui est important par rapport au pourcentage de protéines de la gonade et en comparaison avec le pourcentage de protéines dans les gonades d'autres bivalves, compris entre 40 et 68 % (Choi *et al.*, 1993). Les concentrations en

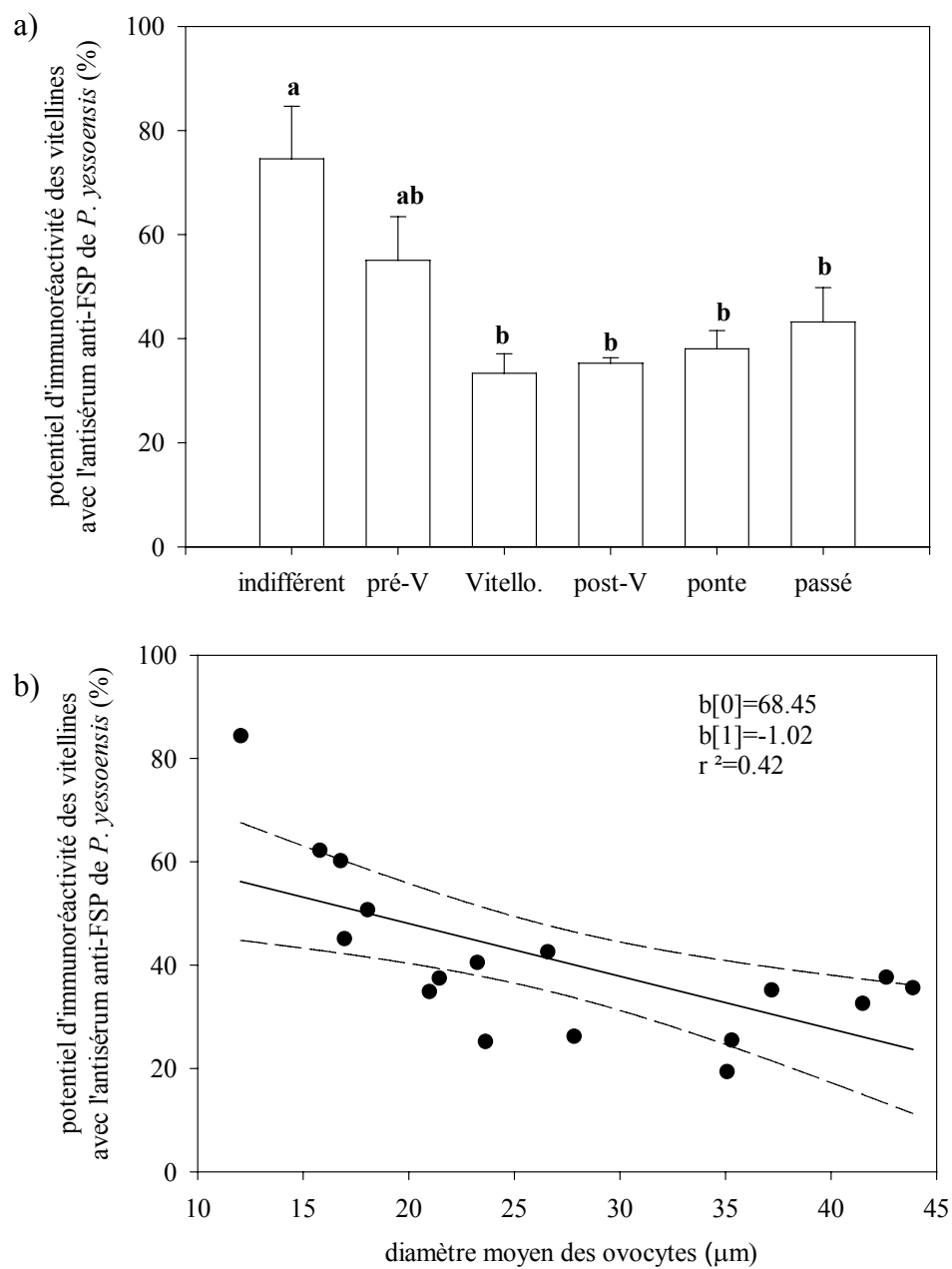
protéines rapportées dans ce chapitre sont importantes et elles représentent un pourcentage appréciable des constituants de la gonade.

**Tableau 3-1:** Corrélation de Spearman entre les paramètres biochimiques (ADN, ARN, protéines) et le diamètre moyen des ovocytes.

	ARN	ADN	ARN/ADN	protéines
<b>corrélation avec le diamètre</b>	R=0,75	R=0,29	R=0,27	R=0,02
<b>moyen des ovocytes</b>	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p=0,79

#### **3.3.4. Potentiel d'immunoréactivité des vitellines de *Mya arenaria* avec l'antisérum anti-FSP de *P. yessoensis***

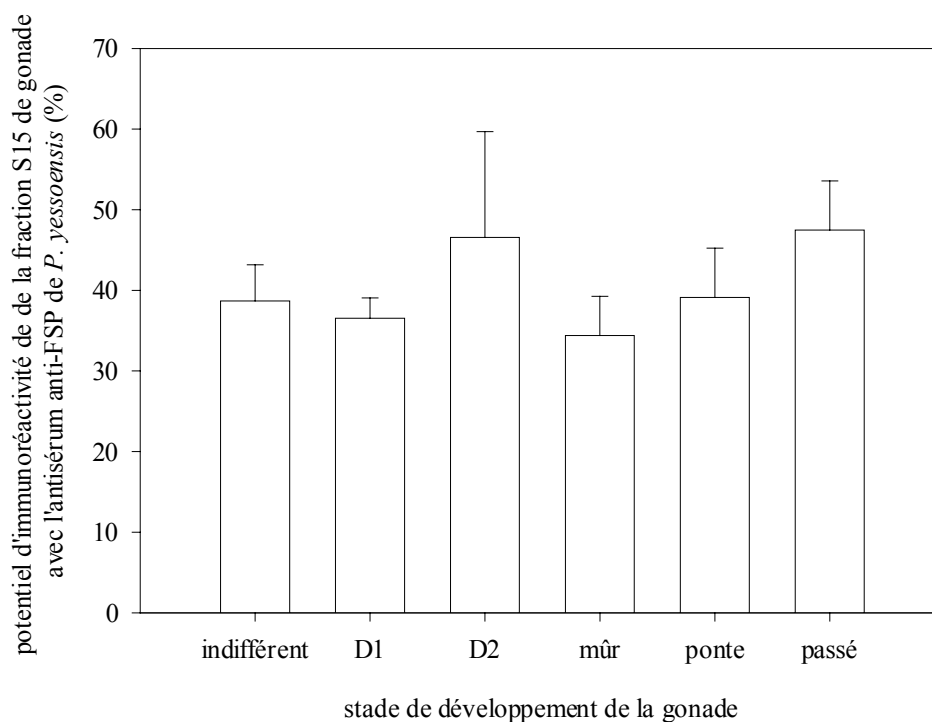
Ne disposant pas de vitelline purifiée provenant du pétoncle ou des myes, nous avons dû exprimer nos résultats en terme de potentiel d'immunoréactivité des vitellines avec l'antisérum tel qu'exposé dans la partie matériel et méthode. Les résultats obtenus pour chaque stade sont présentés à la figure 3-7. Nous observons une diminution significative (ANOVA F=6.18; p<0,05) du potentiel d'immunoréactivité des protéines du stade indifférent ( $74 \pm 22$  %) au stade vitellogénique ( $33 \pm 10$  %). Une corrélation négative lie d'ailleurs les valeurs du potentiel d'immunoréactivité des vitellines avec le diamètre moyen des ovocytes durant la vitellogenèse ( $r = -0,65$ , p<0,05), que Blaise *et al.* (1999) ont par ailleurs noté en dosant les concentrations en protéines apparentées à la vitellogénine dans l'hémolymphe de myes. Contrairement aux observations réalisées chez *P. yessoensis* (Osada *et al.*, 1992), le dosage semi-quantitatif des vitellines avec l'antisérum anti-FSP ne permet donc pas de mettre en évidence une augmentation des vitellines reconnues par l'antisérum durant la vitellogenèse. La reconnaissance par l'antisérum d'une protéine de type vitelline chez les femelles *Mya arenaria* demeure



**Figure 3-1:** Potentiel d'immunoréactivité moyen ( $\pm$  erreur type) des vitellines avec l'antisérum anti-FSP de *P. yessoensis* (%) a) en fonction du stade de développement de la gonade femelle et b) en fonction du diamètre moyen des ovocytes.

*Légende:* les moyennes marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

cependant fondée puisque contrairement à l'absence d'une variation significative du signal obtenu avec l'ELISA chez les mâles (figure 3-8), le potentiel d'immunoréactivité est significativement plus important au début du développement des ovocytes. La valeur moyenne obtenue pour le potentiel d'immunoréactivité calculé chez les mâles est de 40 ( $\pm 5$ ) % durant toute la période de développement de la gonade. Cette valeur correspondrait dans ce cas "au bruit de fond" de l'ELISA en l'absence théorique de vitelline et provoquée par le manque de spécificité de l'antisérum produit chez le pétoncle. Cette valeur de bruit de fond obtenue chez les mâles de 39 % obtenue chez les femelles à partir du stade vitellogénique. Les valeurs obtenues aux stades indifférents et prévitellogénique apparaissent donc singulières et traduisent la présence d'une protéine reconnue par l'antisérum. Nos résultats tendent également à montrer que l'antisérum reconnaît une protéine de type vitelline de pétoncle stockée vraisemblablement dans les cellules folliculaires qui occupent la totalité de l'alvéole avant que les ovocytes n'apparaissent qu'au stade prévitellogénique. La translocation de ce précurseur depuis les cellules folliculaires vers les ovocytes pourrait engendrer une certaine protéolyse responsable de la perte du déterminant antigénique reconnu par l'antisérum anti-FSP de pétoncle. L'existence d'un précurseur de vitelline(s) au sein des cellules folliculaires implique l'existence d'un processus hétérosynthétique de vitelline chez *Mya arenaria*. Cette hétérosynthèse serait alors principalement présente au début de la vitellogenèse et expliquerait alors que la quantité de protéine dans la gonade n'augmente pas au début de la vitellogenèse. Ce précurseur serait donc présent dans les cellules folliculaires pour être transféré aux ovocytes au début de la vitellogenèse. L'existence d'un tel précurseur de vitellines dans les cellules folliculaires a déjà été rapportée chez différents invertébrés marins comme l'étoile de mer (Voogt *et al.*, 1985), l'oursin (Ozaki, 1980;



**Figure 3-2:** Potentiel d'immunoréactivité moyen ( $\pm$  erreur type) avec l'antisérum anti-FSP de *P. yessoensis* (%) déterminé pour les fractions S15 de gonades de mâles à différents stades de développement.

*Légendes:* stade D1 pour développement 1, D2 développement 2.

Harrington & Ozaki, 1986; Ozaki *et al.*, 1986) et la crevette (Yano & Chinzei, 1987). De plus, le principe d'une hétérosynthèse a déjà été énoncé chez d'autres bivalves comme nous l'avons évoqué au chapitre 2. L'observation de phénomènes d'endocytose, de pinocytose ou de jonction entre les follicules (ou les cellules auxiliaires) et les ovocytes chez *Crassostrea gigas* (Eckelbarger & Davis, 1996), *Mytilus edulis* (Pipe, 1987b) et *Pecten Maximus* (Dorange & Le Pennec, 1989) en seraient les indices morphologiques. Il serait possible de conforter notre hypothèse d'une hétérosynthèse chez *Mya arenaria* en réalisant une étude immunohistochimique avec l'antisérum de pétoncle et des coupes histologiques de gonades.

Plus tard durant la vitellogenèse, un processus autosynthétique au sein même des ovocytes pourrait être envisagé chez *Mya arenaria*, puisqu'au stade post-vitellogénique la quantité de protéine augmente significativement ( $p < 0,05$ ) dans la gonade alors que les cellules folliculaires sont quasi-absentes. Une telle autosynthèse serait d'ailleurs en accord avec l'observation de nombreux organites protéosynthétiques (ribosomes, réticulum endoplasmique, mitochondries, dictyosome golgiens) observés dans le cytoplasme des ovocytes durant la prolifération des inclusions de réserves chez *Mytilus edulis* (Pipe, 1987a) et *Crassostrea gigas* (Eckelbarger & Davis, 1996). Les vitellines synthétisées par l'ovocyte des myes ne seraient alors pas reconnues par l'antisérum produit chez le pétoncle ce qui expliquerait que le signal obtenu durant l'ELISA n'augmente pas au-delà du stade vitellogénique.

### **3.3.5. Premier pas vers une caractérisation de vitellines chez *Mya arenaria***

Chez les bivalves, la caractérisation de protéines dont la présence est représentative de la maturation des ovocytes a été réalisée chez plusieurs bivalves comme le montre le tableau 3-5. Les auteurs désignent ces protéines sous le terme général de protéines de réserve ou de lipoprotéines mais parfois plus spécifiquement de vitelline, selon le degré de leur caractérisation, le tissu où elles ont été extraites et par la suite le tissu où elles ont été observées, ou encore selon la démonstration de leur caractère femelle. Ce sont généralement des protéines de grande masse moléculaire et de très grande densité tout comme les protéines de réserves des vertébrés ovipares.

**Tableau 3-1:** Caractérisations de protéines de réserve rapportées dans la littérature chez différents bivalves.

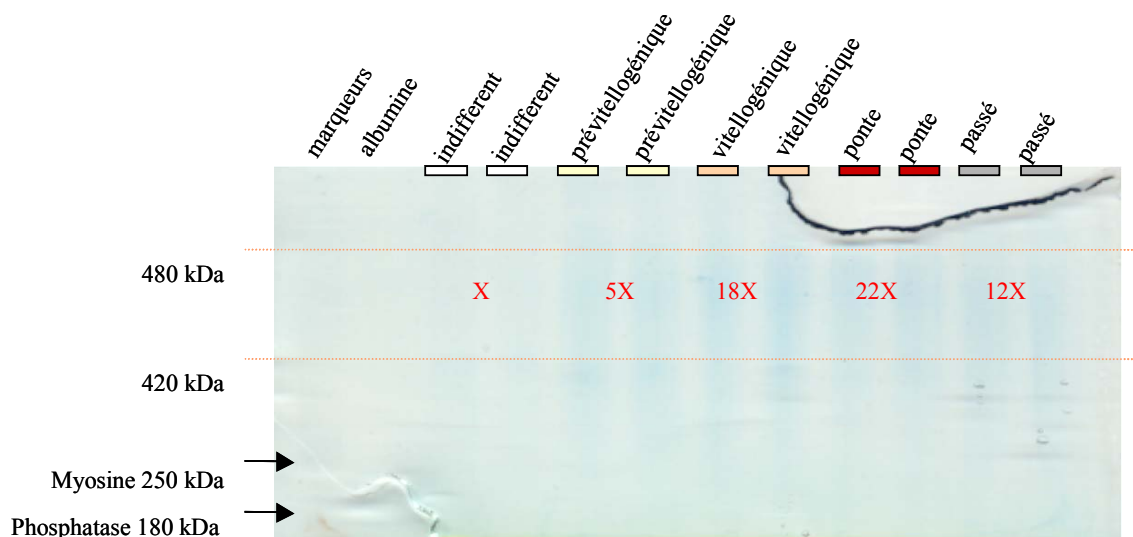
bivalve	dénomination	masse moléculaire	tissu	auteur
<i>C. gigas</i>	protéine de type vitelline spécifiques aux femelles	~ 500 kDa	ovocyte hémolymph	Suzuki <i>et al.</i> (1992)
<i>P. yessoensis</i>	protéines de réserve spécifiques aux femelles	3 protéines 450 kDa 1 protéine de 700 kDa	gonade	Osada <i>et al.</i> (1992)
<i>C. gigas</i> <i>M. mercenaria</i>	lipoprotéine très grande densité soluble dans l'eau	56 kDa	ovocyte	Lee & Heffernan (1992)

Chez *Mya arenaria*, Blaise *et al.* ont rapporté en 1999 la présence de protéine(s) de type vitellogénine (VTG) dans l'hémolymph. La circulation de l'hémolymph se fait cependant en circuit ouvert chez les myes comme pour tous les bivalves. Dans ce cas, il n'est pas exclu d'envisager l'hémolymph et plus spécifiquement les hémocytes comme vecteur d'un transfert actif de protéines de type VTG depuis un autre tissu que la gonade comme cela est le cas chez les poissons avec un transfert de la VTG du foie jusqu'à la gonade. La présence de vitellines dans l'hémolymph des myes ne pourrait cependant pas nous informer de leur provenance ni même s'il pourrait d'agir d'une forme de stockage après synthèse dans la gonade. Les études présentées dans le chapitre 2 (section 2.1.5) montrent davantage l'existence d'une hétérosynthèse de protéines de type vitelline dans les cellules auxiliaires ou folliculaires de la gonade, et une autosynthèse dans les ovocytes. Nous avons donc privilégié la gonade comme site de synthèse de protéines de type vitellines chez *Mya arenaria*. La gonade est d'ailleurs le seul site de synthèse et de maturation des ovocytes chez les myes. La présence de protéines de type vitelline dans l'hémolymph des bivalves dont *M. arenaria* n'est cependant pas remise en cause ici.



Suzuki *et al.* (1992) suggèrent cependant que celle-ci doit être fortuite et résulterait de la dégénérescence d'ovocytes. Il n'en demeure pas moins que chez les bivalves, l'hémolymphe peut contribuer au transport d'un organe à un autre de composés comme les lipides (Vassallo, 1973; Allen & Conley, 1982; Pollero *et al.*, 1985), le cholestérol (Pollero, 1987), le glycogène et les phospholipides (Thompson, 1977).

Le gel d'électrophorèse des fractions S15 de gonades femelles à différents stades de développement est présenté à la figure 3-9. Bien que les conditions n'aient pas été optimisées pour isoler chaque protéine présente dans la gonade pour chaque stade de développement, il apparaît cependant sur le gel que la coloration des protéines avec de grandes masses moléculaires augmente durant la vitellogenèse. Ces protéines ont une



**Figure 3-1:** Gel d'électrophorèse des fractions S15 de la gonade femelle à différents stades de développement.

*Légende:* en rouge est indiquée sur chaque bande la valeur relative de l'intensité de la coloration des protéines mesurée par densimétrie avec "X" la valeur du signal déterminée au stade indifférent.

masse moléculaire comprise entre 420 et 480 kDa et l'analyse densitométrique présentée au tableau 3-6 montre clairement l'augmentation de la quantité de ces protéines au cours de la maturation sexuelle. Ces résultats montrent que la quantité de protéines de très haute masse moléculaire augmente durant la vitellogenèse. La gamme de masse moléculaire de ces protéines concorde avec les masses moléculaires de protéines de type vitellines définies chez *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis* (tableau 3-6).

**Tableau 3-2:** Analyse densitométrique de la région de grande masse moléculaire (> 400 kDa) du gel d'électrophorèse PAGE réalisé avec les extraits de gonades de femelles à différents stades de développement.

*Légende:* préV. pour stade pré-vitellogénique; Vitello. pour stade vitellogénique et les valeurs rapportées sont la moyenne des mesures faites pour les deux bandes d'un même extrait.

stade de développement	indifférent	préV.	Vitello.	ponte	passé
Valeur relative du signal en densitométrie	1804	10514	32715	39219	22509

Cette étude préliminaire encourage donc l'isolement des protéines de masse moléculaire comprise entre 420 et 480 kDa chez *Mya arenaria*. Cet isolement permettrait la caractérisation de ces protéines ainsi que leur purification pour produire un antisérum spécifique aux vitellines de *Mya arenaria*. L'antisérum anti-vitelline de pétoncle pourrait toutefois permettre d'isoler les protéines présentes dans la gonade des myes au début du développement et considérées comme des précurseurs de vitellines présents dans les cellules folliculaires. Il s'agirait dans ce cas d'adsorber l'antisérum sur des billes de Séphadex. Les anticorps de l'antisérum seraient alors fixés sur les billes et leur mise en contact avec un extrait de gonade entraînerait la formation d'un nouveau complexe [bille-anticorps-protéine(s)]. Les protéines reconnues par l'antisérum pourraient ainsi

être isolées et purifiées. Si le manque de spécificité de l'antisérum produit avec le pétoncle provoque l'existence d'un bruit de fond trop important pour une étude immunohistochimique avec les gonades de myes, la purification des protéines reconnues par l'antisérum selon la méthode décrite plus haut, permettrait de produire un antisérum plus spécifique des protéines produites par les myes. Dans ce cas, le nouvel antisérum reconnaîtra dans la gonade des myes les mêmes protéines que l'antisérum anti-FSP de pétoncle mais avec meilleure spécificité qui devrait éliminer le bruit de fond lors d'une étude immunohistochimique. La localisation de ces protéines au sein des cellules folliculaires pourra alors être confirmée ou non et d'autres tissus comme la glande digestive ou encore l'hémolymphe pourront également être utilisés pour rechercher une présence éventuelle de protéines reconnues par l'antisérum.

### **3.4. CONCLUSION**

Ce premier volet de notre étude nous a permis de décrire une séquence vitellogénique chez *Mya arenaria* avec trois stades distincts (prévitellogénique, vitellogénique, post-vitellogénique) au cours desquels l'accroissement du diamètre moyen des ovocytes est significatif (figure 3-3 et tableau 3-2). Nous avons alors pu décrire 6 stades distincts de la maturation de la gonade incluant le processus vitellogénique. L'activité synthétique de la gonade augmente significativement au cours du développement de la gonade et les concentrations moyennes en ARN sont les plus représentatives de l'augmentation du diamètre des ovocytes (tableau 3-4). Le diamètre des ovocytes et les concentrations en ARN de la gonade sont d'ailleurs comparables à ceux rapportés chez d'autres bivalves.

L'utilisation d'un antisérum anti-FSP de pétoncle nous a permis de montrer une réaction croisée avec la gonade femelle de *Mya arenaria*. L'antisérum semble montrer la présence de protéine(s) présente(s) chez les femelles de myes au début du développement de la gonade (figure 3-7). Celle(s)-ci pourraient être des précurseurs de protéines de type vitelline(s) chez les myes. Dans ce cas, les cellules folliculaires pourraient être le lieu de synthèse de ces précurseurs ultérieurement transférés dans les ovocytes. Une hétérosynthèse de vitelline serait alors effective chez *Mya arenaria* mais l'augmentation significative de la quantité de protéines au stade post-vitellogénique pourrait résulter d'une synthèse protéique dans la gonade à la fin de la vitellogenèse et démontrerait alors l'existence d'une autosynthèse. Il n'en demeure pas moins qu'en réalisant une électrophorèse avec des fractions cytosoliques des gonades, nous avons pu observer l'augmentation de la quantité de protéines de très grandes masses moléculaires (entre 420 et 480 kDa) (figure 3-9 et tableau 3-6), comparables à celles des vitellines caractérisées chez l'huître et le pétoncle (tableau 3-5). Malgré son manque de spécificité chez *Mya arenaria*, l'antisérum anti-FSP de pétoncle utilisé pour notre étude nous a permis de constater une antigénicité commune entre des protéines présentes dans la gonade de *Mya arenaria* et *Patinopecten yessoensis*. L'hypothèse d'une reconnaissance d'un précurseur de vitelline par l'antisérum devra cependant être confirmée par une étude immunohistochimique ce qui renforcerait alors celle d'une hétérosynthèse de vitellines chez *Mya arenaria*.

**CHAPITRE IV**

**ACTIVITÉ STÉROÏDIENNE CHEZ *MYA ARENARIA*  
DURANT LA GAMÉTOGÈSE**

#### 4.1. INTRODUCTION

Nous avons présenté à la figure 2-1 et au tableau 2-1, les différentes hormones et enzymes de la stéroïdogénèse rapportées chez les bivalves. Le rôle des hormones stéroïdiennes dans la reproduction n'est pas encore clairement défini, mais les études mentionnées dans la section 2.1.2.2. du chapitre 2 suggèrent leur implication dans le contrôle de la différenciation sexuelle, du développement des gamètes et de la mobilisation des réserves énergétiques au cours de la gamétogenèse. Chez *Mya arenaria*, la progestérone a été rapportée dans la gonade par Siah *et al.* (2002, 2003) et la variation saisonnière de ces concentrations laisse présager de son implication dans la reproduction des myes. Ces variations mensuelles de ces concentrations en progestérone sont comparables dans la gonade des mâles et des femelles de myes et du même ordre de grandeur que celles déterminées dans les gonades de mâles et de femelles de moules *Mytilus edulis* (Reis-Henriques & Coimbra, 1990). Blaise *et al.* (1999) ont cependant montré que le  $17\beta$ -œstradiol est capable d'induire chez *Mya arenaria* la synthèse de protéines apparentées à la vitellogénine. Les effets du  $17\beta$ -œstradiol pourraient alors être comparables à ceux rapportés chez *Crassostrea gigas* en participant au contrôle du développement des gamètes et de la mobilisation des réserves énergétiques (Mori 1968a, 1968b, 1969, 1980; Mori *et al.*, 1969), ou encore plus spécifiquement en induisant la synthèse de vitellines comme chez le pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Li *et al.*, 1998). Le  $17\beta$ -œstradiol jouerait alors un rôle important durant la reproduction chez *Mya arenaria*. La progestérone pourrait pour sa part ne servir que de précurseur lors de sa synthèse. Le rôle de la testostérone est incertain et ses effets sur la reproduction des bivalves sont encore inconnus. La progestérone n'aurait alors qu'un

rôle indirect dans le contrôle de la reproduction en servant d'intermédiaire durant la stéroïdogénèse. Notre propos dans ce chapitre est donc de décrire la variation saisonnière des concentrations en  $17\beta$ -œstradiol (E2) et en testostérone (T) chez *Mya arenaria* tout au long de la gamétogenèse car des variations dans les concentrations devraient apparaître au cours de la gamétogenèse si les hormones sont impliquées dans la régulation de la reproduction. Si tel est le cas, nous pourrions estimer le moment clé de la reproduction (le développement précoce des gamètes, la maturité des gamètes, la ponte, etc.) durant lequel une exposition à un perturbateur endocrinien pourrait avoir un effet sur le potentiel reproducteur de l'espèce. L'implication de ces deux hormones pourrait cependant varier d'un sexe à l'autre et/ou intervenir dans la régulation de différents processus tout au long de la gamétogenèse. Les concentrations des hormones tout comme leur patron de variation durant la gamétogenèse pourraient alors être différentes pour les deux sexes. Dans ce cas, bien que les concentrations en progestérone rapportées par Siah *et al.* (2002; 2003) dans la gonade des myes soient équivalentes pour les deux sexes durant la gamétogenèse, une différence dans le métabolisme de la progestérone ou dans le taux de conversion de la testostérone en  $17\beta$ -œstradiol via l'aromatase du cytochrome P450 différencierait les mâles des femelles. Les valeurs des concentrations en E2 et T de même que celles du rapport T/E2 nous permettraient peut-être de discriminer les mâles des femelles. Si tel était le cas, nous pourrions à l'avenir envisager de sexer les individus sans avoir recours à une étude histologique. Puisqu'il n'existe pas de dimorphisme sexuel chez les myes, un tel sexage des individus avec le dosage des hormones serait une aide précieuse pour le développement des vitellines comme biomarqueur d'exposition à des xéno-œstrogènes chez *Mya arenaria* si la discrimination d'un des deux sexes s'avérait nécessaire.

Dans le chapitre 3, nous avons décrit le déroulement saisonnier de la gamétogenèse chez les femelles *Mya arenaria* au site d'échantillonnage de Métis sur Mer. Cette description comprenait notamment la caractérisation d'une séquence vitellogénique avec la distinction de différents stades de "développement" des gamètes. Pour comparer les concentrations en hormones stéroïdiennes entre les mâles et les femelles nous avons donc dû distinguer pour les deux sexes des stades de maturité de la gonade comparables tout au long de la gamétogenèse. Cette comparaison entre stades de maturité équivalents est d'autant plus nécessaire que la synchronisation de la gamétogenèse n'est pas parfaite entre les mâles et les femelles dans l'Estuaire du Saint-Laurent (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Une comparaison des concentrations mensuelles en hormones n'aurait pas vraiment permis d'interpréter les variations des hormones en fonction du degré d'avancement de la gamétogenèse. Chez les mâles *Mya arenaria*, les stades de développement utilisés jusqu'à présent pour définir l'état de maturité de la gonade sont ceux de Ropes & Stickney (1965). Cependant, pour les mâles comme pour les femelles, les critères de reconnaissance des stades de Ropes & Stickney (1965) ne décrivent que cinq stades de développement (tableau 4-1) dont un seul stade de "développement" avant le stade mûr. Le développement des gamètes se déroule cependant dès l'apparition de spermatogonies à la périphérie des alvéoles jusqu'à leur migration en grand nombre vers la lumière de l'alvéole pour atteindre le stade de spermatozoïde. Avant de déterminer les concentrations E2 et en T dans la gonade des myes mâles et femelles, nous avons donc développé d'autres critères de reconnaissance de stades de développement de la gonade mâle, de l'apparition des spermatogonies jusqu'à la présence des spermatozoïdes afin de décrire avec plus de précision le degré de développement de la gonade. Tout comme pour les femelles dans le chapitre 3, nous



présentons dans ce chapitre 4, l'étude de l'activité synthétique de la gonade des mâles tout au long de la gamétogenèse. Cette étude nous permet alors de justifier chaque stade de développement que nous décrivons tout au long de la gamétogenèse grâce à une signature biochimique propre à chaque stade qui reflète la variation de l'intensité de l'activité synthétique de la gonade au cours de la gamétogenèse. Une fois les stades de développement des gonades mâles caractérisés, nous avons alors comparé les concentrations en E2 et T des gonades mâles et des femelles pour des stades de développement de la gonade équivalents.

## **4.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE**

### **4.2.1. Échantillonnage des myes**

Le site d'échantillonnage des myes, la période et la fréquence d'échantillonnage ont été les mêmes que ceux décrits dans la section 3.2.1. Les myes sélectionnées faisaient donc partie de la classe de taille comprise entre 6,5 à 7,5 cm de longueur de coquille. La dissection des myes et le mode de conditionnement des tissus ont été réalisés tel que décrit dans la section 3.2.1.2. du chapitre 3.

### **4.2.2. Étude histologique de la gonade des mâles**

Les procédures de fixation et d'enrobage dans de la résine des tissus, puis de coupe au microtome et de coloration sont identiques à celles décrites dans la section 3.2.2.1. du chapitre 3. Le stade de développement des gonades a préalablement été déterminé selon les critères de Ropes & Stickney (1938) rapportés dans le tableau 4-1. Les mâles identifiés au stade de "développement" ont ensuite été séparés en deux groupes selon le

**Tableau 4-1:** Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade mâle d'après Ropes & Stickney (1965).

stade	critères de reconnaissance
indifférent ou phase inactive	nombreuses cellules folliculaires, importantes réserves lipidiques dans les cellules folliculaires, absence de spermatogonie.
développement ou phase active	présence de spermatogonies dans l'alvéole, présence de spermatides au centre de l'alvéole qui forment une masse.
mûr	les spermatozoïdes occupent la totalité de l'alvéole en disposition radiale vers le centre de l'alvéole
ponte	le nombre de spermatozoïdes est moins important et ils se trouvent au cœur de l'alvéole, des cellules folliculaires apparaissent entre la membrane basale de l'alvéole et les gamètes.
passé	très faible nombre de spermatozoïdes au centre de l'alvéole, pas de gamètes en cours de développement, nombreuses cellules folliculaires.

degré d'avancement de ce développement. Des photographies ont été prises pour présenter l'évolution morphologique de la gonade mâle du début du développement au stade mûr, avec un même grossissement de 250. Une fois les stades de développement de la gonade des mâles déterminés avec la distinction de deux stades de développement des gamètes, la maturation sexuelle saisonnière a été représentée mensuellement en terme de pourcentage relatif (a, b, c, d, e, f) de chaque stade observé à chaque mois. Comme pour les femelles, un indice mensuel de maturité (IM) a été calculé selon la méthode décrite dans la section 3.2.2.2.

### **4.2.3. Dosages biochimiques pour décrire l'activité synthétique de la gonade des mâles**

Des dosages de protéines, d'ARN et d'ADN ont été entrepris avec les gonades de mâles en suivant les protocoles décrits dans la section 3.2.3 du chapitre 3.

### **4.2.4. Dosages du 17 $\beta$ -œstradiol et de la testostérone**

#### 4.2.4.1. Extraction des stéroïdes

Le 17 $\beta$ -œstradiol et la testostérone ont été extraits de la gonade selon le protocole décrit par Siah *et al.* (2002). Environ 100 mg de gonade ont été homogénéisés dans 500  $\mu$ L d'eau nanopure. Nous avons ajouté 400  $\mu$ L de HCl 0.025 M aux homogénats avant de les placer dans un bain thermostaté à 40°C pendant 15 minutes pour rompre la liaison entre les stéroïdes et des protéines liantes. Par la suite, trois extractions successives ont été entreprises avec 7 mL de chlorure de méthylène. Les fractions organiques recueillies après chaque extraction ont été groupées et évaporées sous un jet d'azote à température ambiante. Enfin, le résidu de l'évaporation contenant les stéroïdes a été remis en suspension dans 250  $\mu$ L de tampon EIA (enzyme immunoassay ) du kit de dosage de type ELISA. Le taux de récupération a été estimé pour chaque hormone en réalisant des ajouts dosés à un homogénat de gonades de myes. Ces taux de récupération sont respectivement de 97  $\pm$  38 % (N=4) pour le 17 $\beta$ -œstradiol et de 94  $\pm$  17 % (N=4) pour la testostérone en utilisant la trousse de dosage de chez Cayman tel que présenté dans la section suivante.

#### 4.2.4.2. Dosage par ELISA du 17 $\beta$ -œstradiol et de la testostérone

Nous avons utilisé les trousse de dosage de chez Cayman (Cayman Chemical Co., Ann Harbor, MI, USA) pour les deux hormones stéroïdiennes en suivant le protocole décrit par la compagnie. Les réactions croisées des antisérums utilisés pour chaque ELISA avec d'autres hormones stéroïdiennes que le 17 $\beta$ -œstradiol ou la testostérone sont telles que décrites par la compagnie Cayman et présentées en annexe 2.

#### **4.2.5. Traitement de données**

Comme pour le chapitre 3, une comparaison des données (en fonction des stades de développement de la gonade) a été effectuée avec une ANOVA à un facteur dans des conditions où la normalité était respectée ou alors un test Kruskal-Wallis était appliqué. Les données étaient par la suite soumises à un test de Tuckey (ou de Dunn lorsque les effectifs n'étaient pas égaux entre les groupes) pour distinguer les différences significatives entre groupes. Pour les résultats avec les hormones stéroïdiennes, une ANOVA à deux facteurs (sexe, stade de développement équivalent) a été réalisée ainsi que des comparaisons de moyennes entre les deux sexes pour un même stade de développement. Enfin, nous avons réalisé une analyse de corrélation linéaire avec un test de Spearman pour évaluer la corrélation entre le diamètre des ovocytes déterminés dans le chapitre 3 durant la vitellogenèse et les concentrations en 17 $\beta$ -œstradiol dans la gonade des femelles.

### 4.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

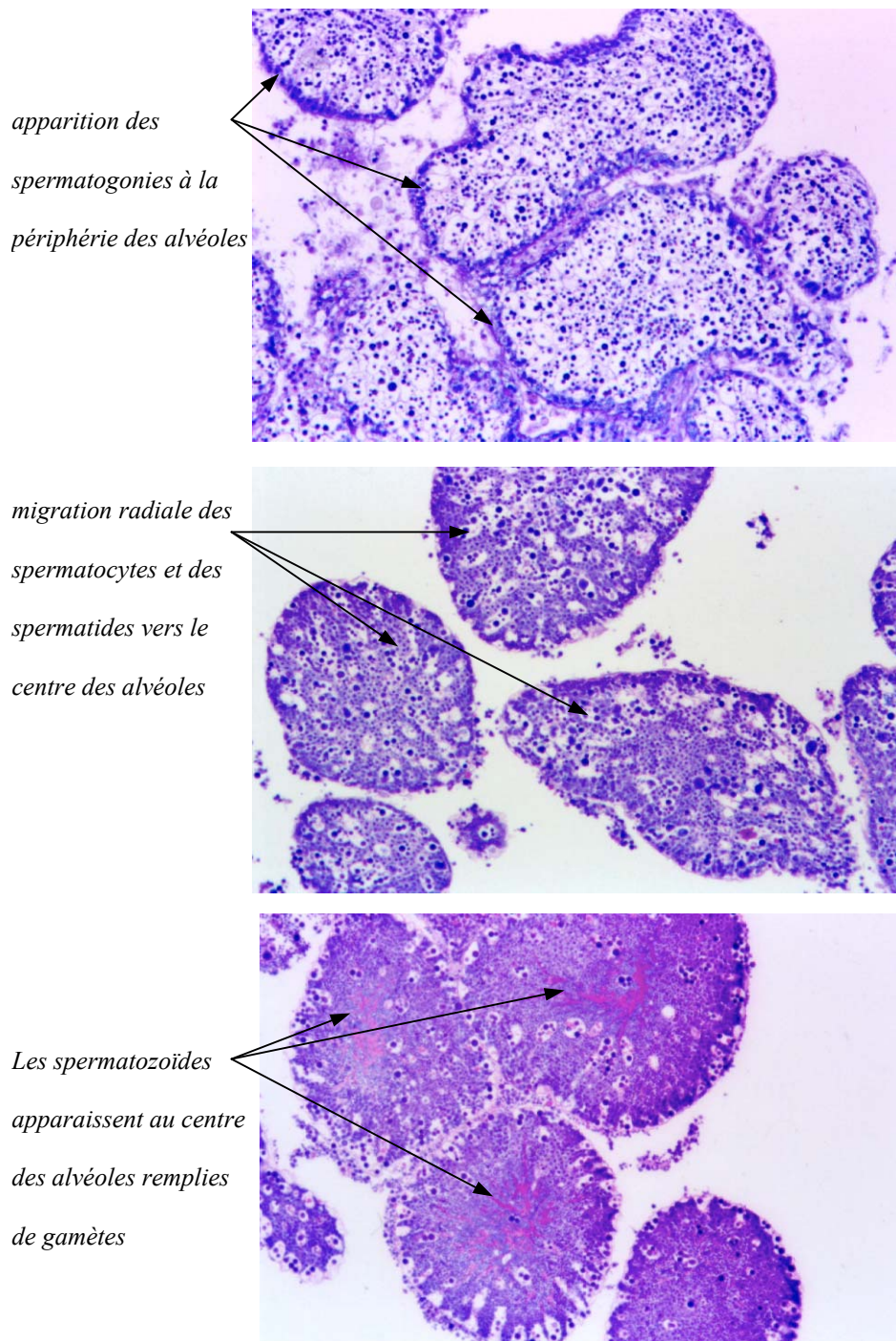
#### 4.3.1. Redéfinition des stades de maturité de la gonade mâle chez *Mya arenaria*

Les gamètes mâles sont très visibles dès leur apparition à la périphérie des alvéoles grâce à la coloration que nous utilisons. Nous avons donc choisi de définir comme stade indifférent le stade durant lequel l'alvéole est entièrement remplie de cellules folliculaires contenant des réserves lipidiques et qu'aucune spermatogonie n'est visible. Tout comme Coe & Turner (1938) ont pu le décrire, les spermatogonies apparaissent au début du développement et restent proches de la périphérie de l'alvéole. Nous avons donc choisi de définir comme stade de développement "1" des gamètes mâles (d1) ce moment de la gamétogenèse durant lequel les spermatogonies sont visibles à la périphérie de l'alvéole et avant leur différenciation en spermatocytes. Cette phase particulière durant laquelle les spermatogonies se différencient en spermatocytes a lieu durant la migration des gamètes alignés en colonnes, de la périphérie de l'alvéole vers le centre de celle-ci. Cette migration est très facilement identifiable et représente une phase plus élaborée du développement des gamètes avant la différenciation des spermatocytes en spermatozoïdes. Nous avons donc choisi de désigner sous le nom de stade de développement "2" (d2) cette période de différenciation des gamètes vers le centre de l'alvéole. Le stade "mûr" représente pour sa part le moment où les spermatozoïdes sont visibles au cœur de l'alvéole dans laquelle les cellules folliculaires ont alors totalement disparu. Les six stades de maturité de la gonade mâle que nous avons utilisés durant notre étude sont le stade indifférent, les stades de développement 1 et 2, le stade mûr, le stade de ponte et le stade passé dont les critères de reconnaissance apparaissent dans le tableau 4-2. Pour le reste de notre étude, nous nous servons de la

correspondance des stades de développement de la gonade mâle et de la gonade femelle telle que la présente le tableau 4-3. La figure 4-1 (a, b et c) présente des coupes histologiques de gonades mâles observées au grossissement 250 et représentatives des deux stades de développement des gamètes (d1 et d2) et du stade mûr.

**Tableau 4-1:** Critères de reconnaissance des stades de développement de la gonade mâle d'après l'étude histologique du développement des gamètes.

stade	critères de reconnaissance
indifférent	nombreuses cellules folliculaires, importantes réserves lipidiques dans les cellules folliculaires, absence de spermatogonie
développement 1 (d1) figure 3-1a	présence de spermatogonies à la périphérie des alvéoles
développement 2 (d2) figure 3-1b	migration radiale des spermatocytes vers le centre de l'alvéole, disparition partielle des cellules folliculaires
mûr figure 3-1c	les spermatozoïdes sont présents au centre de l'alvéole qui est totalement remplie de gamètes
ponte	le nombre de spermatozoïdes est beaucoup moins important des cellules folliculaires apparaissent à la périphérie des alvéoles
passé	de rares alvéoles présentent encore quelques spermatozoïdes en leur centre tandis que la plupart n'en contiennent plus les alvéoles ne contiennent plus de gamètes en cours de développement



**Figure 4-1:** Coupes histologiques (grossissement x 250) de gonades de mâle *Mya arenaria* a) au stade de développement 1 (d1); b) au stade de développement 2 (d2); c) au stade mûr.

**Tableau 4-2:** Correspondance entre les stades de développement de la gonade chez les mâles et les femelles.

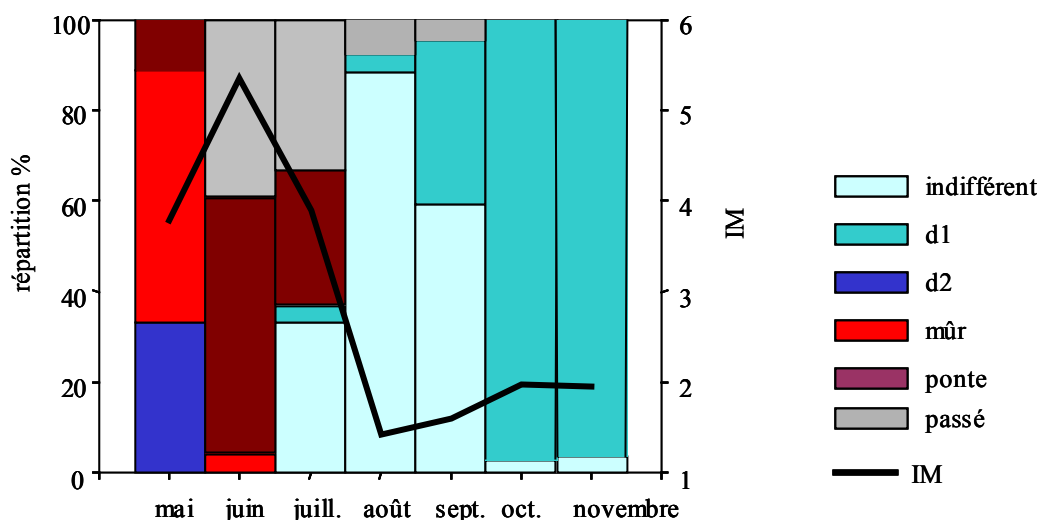
Mâles	femelles
stade indifférent	stade indifférent
stade d1	stade pré-vitellogénique
stade d2	stade vitellogénique
stade mûr	stade post-vitellogénique
stade de ponte	stade de ponte
stade passé	stade passé

#### 4.3.2. Description de la gamétogenèse chez les mâles *Mya arenaria* et de l'activité synthétique de la gonade

##### 3.1.1.1. Déroulement de la gamétogenèse chez les mâles de mai à novembre 1999

Parmi les 60 individus échantillonnés mensuellement de mai à novembre 1999, le nombre de mâles était respectivement de 27, 24, 29, 27, 22, 34 et 27. La figure 4-2 présente le déroulement de la gamétogenèse chez les mâles d'après la répartition mensuelle en pourcentage des différents stades de développement de la gonade. Tout comme nous l'avons déjà mentionné dans l'introduction, bien que 55 % des mâles soient au stade mûr en mai, seuls 11 % sont au stade de ponte ce qui représente une proportion deux fois moins importante que chez les femelles (figure 3-4). Ce décalage entre les mâles et les femelles se poursuit en août alors que 10 % des mâles sont encore au stade indifférent. Concomitamment, 21 % des femelles sont au stade vitellogénique lors d'une nouvelle période de développement de la gonade.





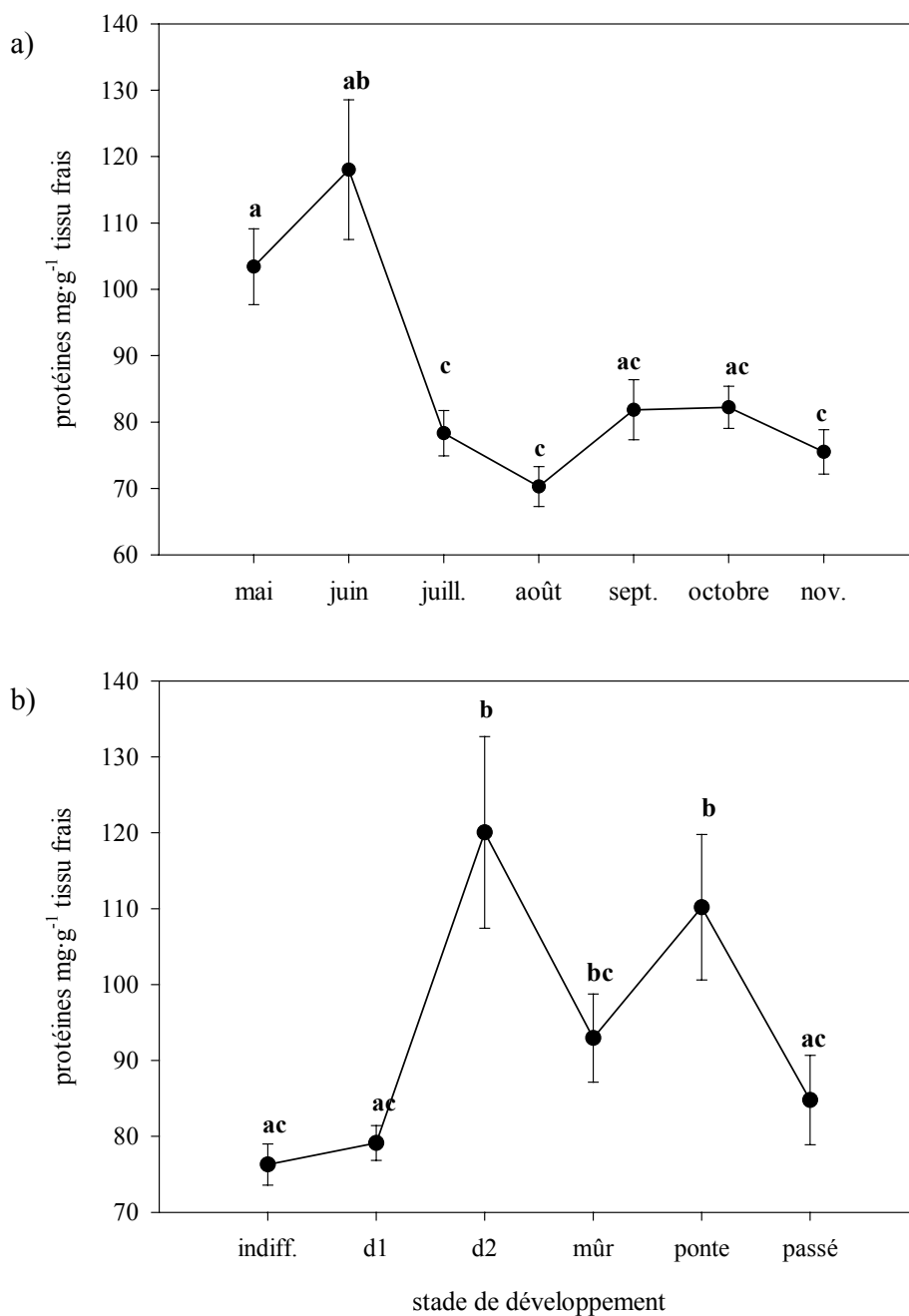
**Figure 4-1:** Déroulement saisonnier de la gamétogenèse chez les mâles *Mya arenaria* de mai à novembre 1999 et variation mensuelle de l'indice de maturité (IM).

A l'automne, les gonades mâles ne se développent pas au-delà du stade d1 alors que la majorité (79 %) des gonades femelles sont au stade vitellogénique qui équivaut au stade d2 des mâles. Ce décalage dans la période estivale de maturation de la gonade des mâles et ce retard de la deuxième période de maturation sexuelle par rapport aux femelles apparaissent clairement avec le calcul de l'indice de maturité. Ce dernier est presque deux fois plus élevé chez les mâles que chez les femelles en juillet, alors qu'en novembre sa valeur est de 1,9 chez les mâles contre 2,7 chez les femelles. La présence d'une nouvelle phase de développement des gamètes durant l'automne et le retard dans ce développement des mâles par rapport aux femelles sont en accord avec les observations réalisées entre 1997 et 1999 dans l'Estuaire du Saint-Laurent (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002; Siah *et al.*, 2002, 2003). Ils justifient également la nécessité d'une comparaison entre les concentrations en hormones stéroïdiennes chez les deux sexes, en fonction du stade de développement et non pas en fonction de la moyenne mensuelle en

particulier si ces concentrations varient durant la gamétogenèse du fait de leur implication potentielle dans la reproduction.

#### 4.3.2.1. Variation de l'activité synthétique de la gonade mâle durant la gamétogenèse

Les variations mensuelles en protéines ou en fonction du stade de développement des gonades sont présentées à la figure 4-3. Les concentrations les plus importantes en protéines apparaissent aux mois de mai ( $103,4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais) et juin ( $118,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais) alors que près de 60 % à 65 % des individus sont au stade mûr et au stade de ponte. La figure 4-3b montre en effet qu'au cours de la gamétogenèse les concentrations en protéines sont significativement (ANOVA  $F=9.762$ ;  $p<0.05$ ) les plus importantes au stade d2 au stade de ponte (entre  $120,0$  et  $110,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais respectivement). Ces résultats sont en accord avec la variation des concentrations en protéines rapportée dans les gonades de mâles *Pecten maximus* (Robbins *et al.*, 1990b) et *Crassostrea gigas* (Li *et al.*, 2000). Ces résultats chez les mâles sont également comparables à ceux rapportés chez les femelles (figure 4-5) pour des stades de développement équivalents, excepté entre le stade d2 des mâles et le stade vitellogénique des femelles puisque les mâles ont alors une concentration moyenne en protéines dans la gonade de  $120,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissu frais contre  $67,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissu frais chez les femelles. Cette équivalence entre les concentrations en protéines des gonades mâles et femelles est en accord avec les résultats observés chez le pétoncle (Robbins *et al.*, 1990b). En revanche, chez l'huître les concentrations en protéines diminuent durant le développement des spermatozoïdes au terme duquel elles sont trois fois moins importantes que dans les gonades femelles (Li *et al.*, 2000). Les valeurs des concentrations en protéines dans la gonade peuvent

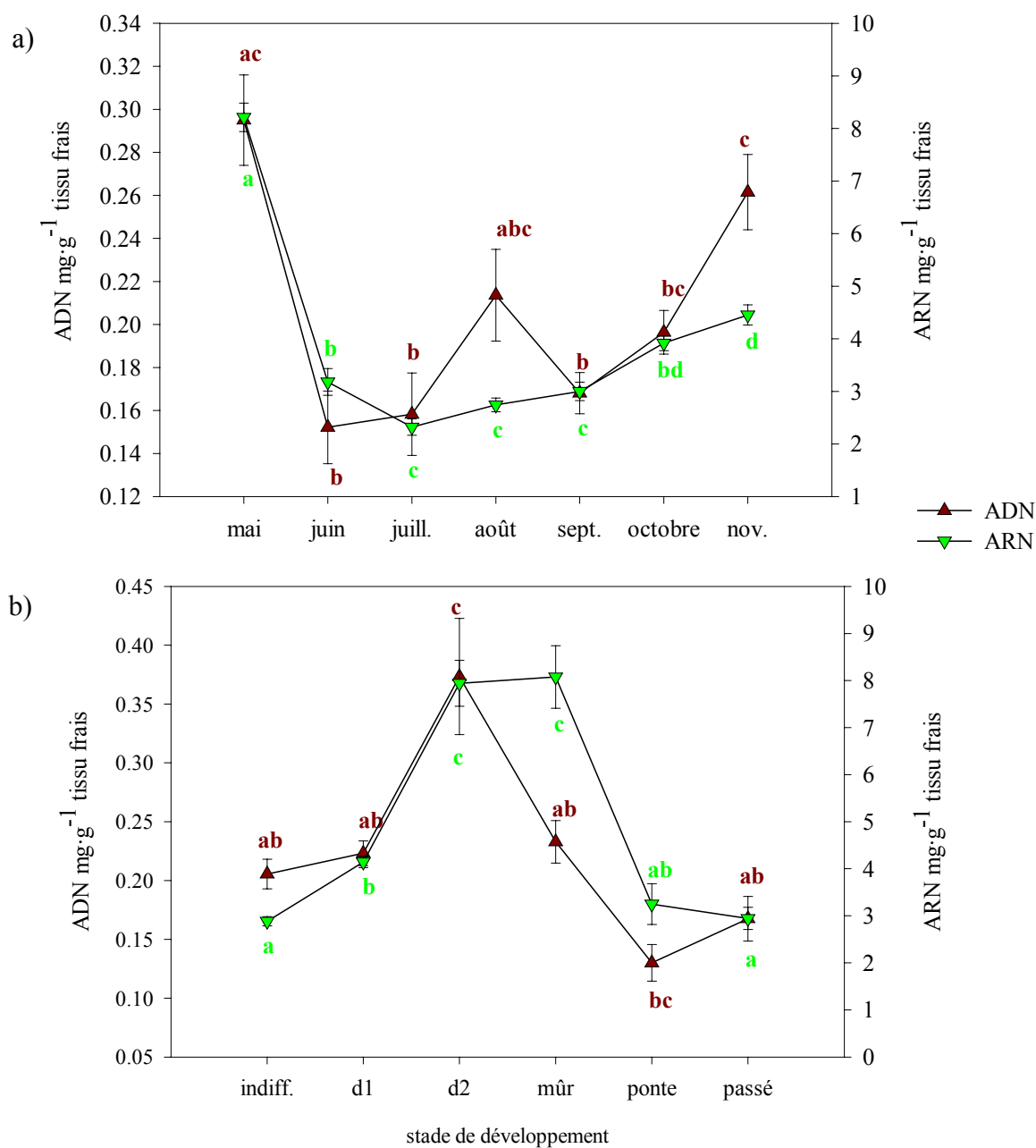


**Figure 4-1:** Concentrations moyennes ( $\pm$  erreur type) en protéines dans la gonade mâle a) de mai à novembre 1999 et b) pour chaque stade de développement de la gonade.

*Légendes:* les moyennes marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

d'ailleurs être très variables tout au long de la reproduction selon l'espèce considérée. Chez les myes, nos résultats présentent au cours de la gamétogenèse une gamme de concentrations mensuelles moyennes en protéines (70,3 à 118.0 mg·g<sup>-1</sup> tissu frais) intermédiaire par rapport à celles rapportées par Epp *et al.* (1988) chez *Pecten maximus* (de 75 à 275 mg·g<sup>-1</sup> tissu frais), *Argopecten irradians irradians* (de 20 à 170 mg·g<sup>-1</sup> tissu frais) et par Robbins *et al.* (1990b) chez *Crassostrea gigas* (de 15 à 40 mg·g<sup>-1</sup> tissu frais). Les conditions nutritionnelles tout comme les conditions climatiques doivent certainement intervenir dans la stratégie d'allocation des réserves énergétiques durant la reproduction suivant l'espèce considérée.

Les concentrations moyennes en acides nucléiques (ARN et ADN) de mai à novembre 1999 et pour chacun des stades de développement de la gonade sont représentées sur les figures 4-4a et 4-4b respectivement. Les concentrations moyennes mensuelles en ADN reflètent parfaitement le stade de maturité de la gonade. La concentration la plus élevée (ANOVA F=9.84; p<0.05) est observée en mai (0,29 mg·g<sup>-1</sup> tissu frais) alors que 55 % des myes sont au stade mûr et 33 % au stade d2 et en novembre (0,26 mg·g<sup>-1</sup> tissu frais) alors que la maturation de la gonade a repris et que 96 % des individus sont au stade d1. En juin, la ponte (56 % des individus) a entraîné une diminution significative des concentrations en ADN, clairement démontrée par la diminution significative de leurs concentrations entre le stade mûr et le stade de ponte (figure 4-4b). L'augmentation des concentrations en ADN durant la gamétogenèse résulte simplement de l'augmentation de la quantité de gamètes. Ces concentrations en ADN dans les gonades des myes mâles sont d'ailleurs significativement (p<0,05) supérieures à celles rapportées dans les gonades de femelles (figure 2-6a) du stade indifférent jusqu'au moment de la ponte.

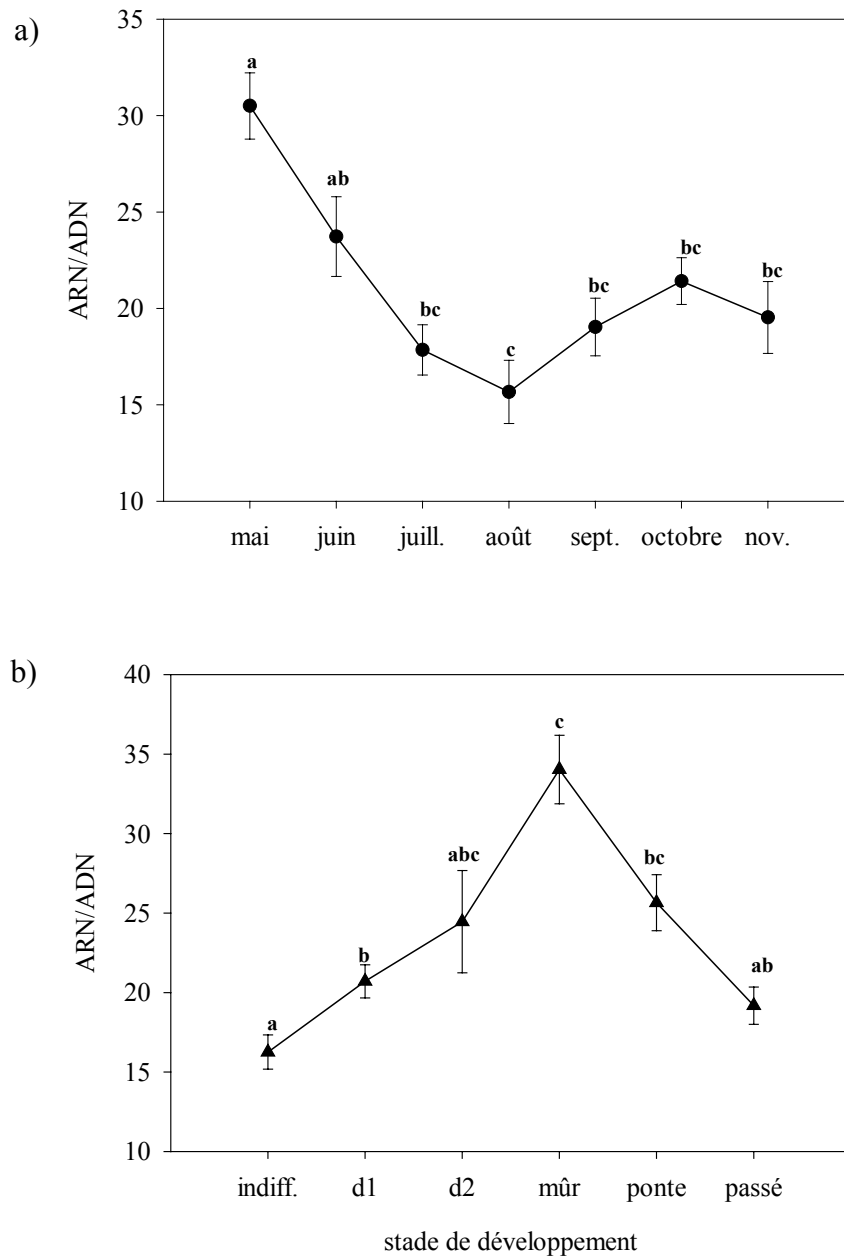


**Figure 4-2:** Concentrations moyennes ( $\pm$  erreur type) en ADN et en ARN de la gonade mâle a) de mai à novembre 1999 et b) pour chaque stade de développement de la gonade.

*Légende:* les moyennes marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).

Cette observation, commune aux études portant sur la concentration en acides nucléiques dans la gonade de bivalves au cours de la reproduction (Li *et al.*, 2000; Robbins *et al.*, 1990b), illustre simplement le fait que le nombre de gamètes est plus important chez les mâles que chez les femelles. La diminution de la concentration en ADN que nous avons observée entre le stade d2 et le stade mûr (Figure 4-4b) (ANOVA  $F=11.75$ ;  $p<0.05$ ) pourrait traduire un léger asynchronisme du déclenchement de la ponte au sein de la gonade d'un même individu. Le prélèvement d'un seul morceau de tissu par gonade pour réaliser les coupes histologiques ne nous permet pas de confirmer ou non cette hypothèse. Toutefois, nous ne pensons pas que cette hétérogénéité dans la maturation de la gonade lors du déclenchement de la ponte puisse être généralisée à toute la période de maturation de la gonade comme cela peut être observé chez *Ostrea edulis* (Ruiz *et al.*, 1992) ou *Mytilus californianus* (Kelley *et al.*, 1982). En effet, la répartition mensuelle des différents stades de développement de la gonade devrait dans ce cas être plus homogène entre chacun des stades durant toute la gamétogenèse, alors que nous ne le constatons pas chez les myes. La diminution de la concentration en ADN n'en est malgré tout pas moins significative du stade mûr au stade de ponte. Les concentrations moyennes mensuelles en ARN ou en fonction du stade de développement de la gonade sont présentées sur la figure 4-4 a et b. Elles traduisent clairement l'augmentation de l'activité synthétique de la gonade au cours de sa maturation en atteignant un maximum de  $8,2 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais au mois de mai avant la ponte (figure 4-4 a) ou en présentant une augmentation significative entre les stades d1 et d2 de  $4,1$  à  $7,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissus frais (figure 4-4b) (ANOVA  $F=53.58$ ;  $p<0.05$ ). Les concentrations sont comparables au stade d2 et au stade mûr (ANOVA  $F=53.58$ ;  $p<0.05$ ) ce qui résulte vraisemblablement d'un effet de dilution engendré par la quantité

maximale de spermatozoïdes au stade mûr alors que leur activité synthétique est plus faible que celle des spermatogonies. Bien qu'il soit étonnant que les concentrations en ARN restent importantes jusqu'au stade de ponte, les concentrations mensuelles que nous avons déterminées sont dans la même gamme de concentrations que celles décrites dans la gonade mâle du pétoncle *Pecten maximus* au cours de la gamétogenèse (Robbins *et al.*, 1990b). Les variations du ratio ARN/ADN présentées sur la figure 4-5 reflètent également le degré de maturité de la gonade avec une valeur maximale de 34,0 durant le stade mûr. Cette augmentation significative (ANOVA  $F=13.51$ ;  $p<0.05$ ) du ratio durant le développement des gamètes s'explique ici par l'augmentation des concentrations en ARN. Robbins *et al.* (1990b) ont également noté une augmentation du ratio ARN/ADN dans la gonade mâle de *Pecten maximus* mais comme pour notre étude, cette augmentation résultant d'avantage d'une augmentation des concentrations en ARN puisque l'augmentation des concentrations en ADN avec l'augmentation du nombre de gamètes durant la maturation de la gonade devrait entraîner une diminution du rapport ARN/ADN. Cette diminution du rapport ARN/ADN est précisément observée durant la gamétogenèse de *Crassostrea gigas* dans la mesure où les concentrations en ARN varient très peu et que la concentration en ADN augmente. Nous pouvons tout de même remarquer que chez les mâles *Mya arenaria*, le rapport ARN/ADN reste statistiquement inférieur à celui déterminé chez les femelles pour chacun des stades de développement de la gonade pouvant être considérés comme femelles durant le développement des gamètes est principalement liée aux concentrations en ADN significativement plus élevées chez les mâles plutôt qu'à des équivalents. Cette différence dans la valeur du rapport ARN/ADN entre les mâles et les concentrations en ARN plus élevées chez les femelles résultant de l'activité vitellogénique.



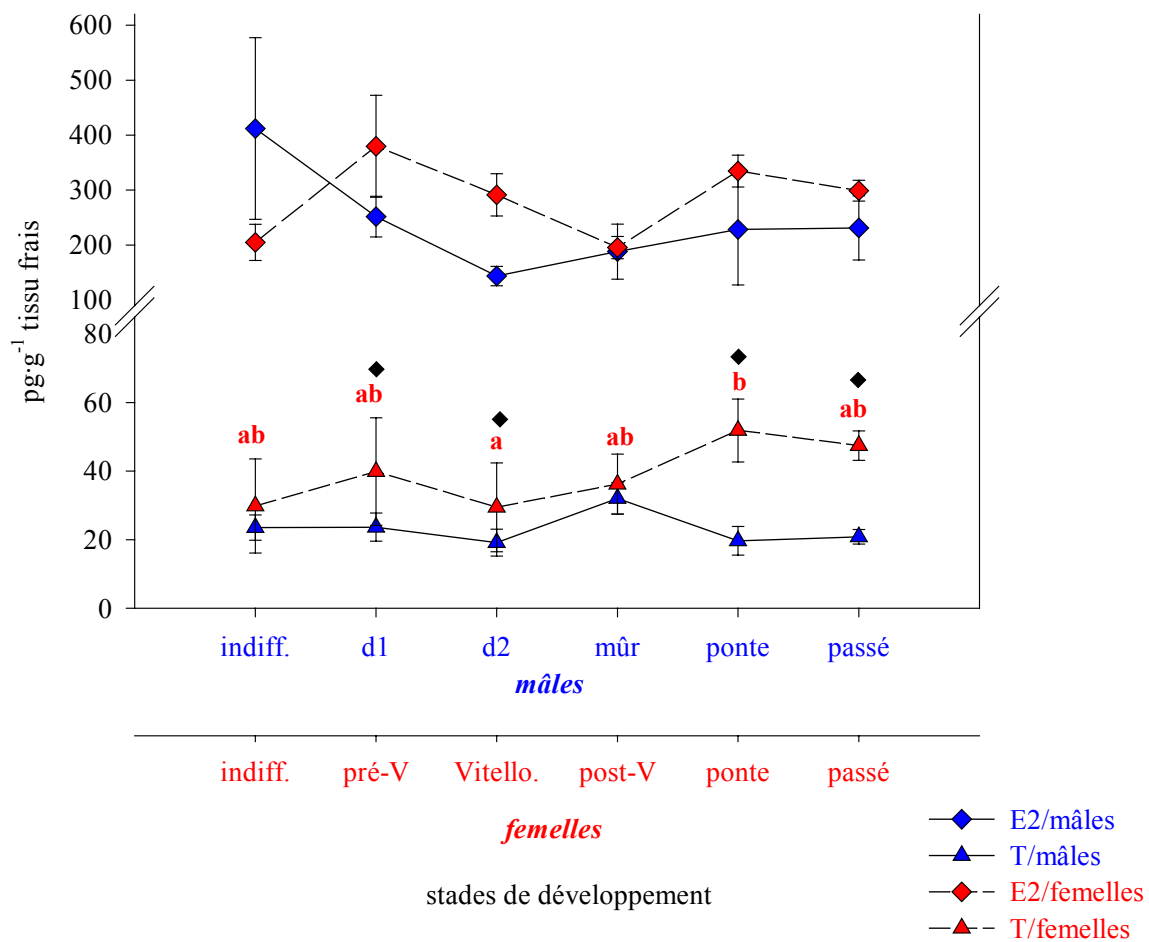
**Figure 4-3:** Valeurs moyennes du ratio ARN/ADN dans la gonade mâle ( $\pm$  erreur type) a) de mai à novembre 1999 et b) pour chaque stade de développement de la gonade.

*Légende:* les moyennes marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ).



#### 4.3.3. Concentrations en $17\beta$ -œstradiol et en testostérone dans les gonades de mâles et de femelles durant la gamétogenèse

La figure 4-6 représente les concentrations moyennes en testostérone (T) et en  $17\beta$ -œstradiol (E2) déterminées dans la gonade des mâles et des femelles de myes pour les différents stades de développement de la gonade considérés comme équivalent (tableau 4-3). En premier lieu nous pouvons remarquer que les concentrations en E2 sont plus importantes que celles en T chez les mâles comme chez les femelles. D'autre part, contrairement à nos attentes et aux observations réalisées chez *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis* (Matsumoto *et al.*, 1997), les différences de concentrations en E2 ne sont pas très importantes entre les mâles et les femelles et ne nous permettraient pas de discriminer les deux sexes au cours de la gamétogenèse. Pour la testostérone, une ANOVA à deux facteurs (sexe; stade) montre cependant un effet combiné du sexe et du stade de développement ( $F=2.68$ ;  $p<0.05$ ). Une comparaison de moyenne entre les deux sexes pour des stades de développement équivalents rapporte que les concentrations en testostérone des femelles sont significativement ( $p<0.05$ ) plus élevées que celles des mâles lorsque la gonade est au stade pré-vitellogénique, vitellogénique, ponte et passé. Il est important de souligner que les concentrations en E2 et en T que nous rapportons ici en  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$  dans la gonade des myes sont très inférieures aux concentrations en progestérone (de l'ordre de 1,5 à 5  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais) déterminées dans la gonade par Siah *et al.* (2002, 2003). Un faible taux de métabolisation de la progestérone pourrait alors expliquer cette différence mais aucune étude de l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse chez *Mya arenaria* ne nous permet de confirmer cette hypothèse ou de faire une comparaison entre ce métabolisme et celui d'autres bivalves mentionnés dans le tableau 2-1.



**Figure 4-1:** Concentrations moyennes ( $\pm$  erreur type) en  $17\beta$ -œstradiol (E2) et en testostérone (T) dans la gonade mâle et femelle suivant son stade de développement.

*Légende:* les moyennes marquées par des lettres différentes sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ); "◆" indique une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les mâles et les femelles pour un stade de développement comparable.

Le tableau 4-4 présente des concentrations en E2 et T rapportées dans la littérature chez d'autres bivalves. Les concentrations que nous avons déterminées en  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$  sont du

**Tableau 4-1:** Concentrations en testostérone et en 17 $\beta$ -œstradiol rapportées dans la littérature durant la gamétogenèse chez différents bivalves et différents tissus, ou déterminées pour un mois donné ou un certain stade de développement de la gonade indiqué entre parenthèses.

espèce	tissu	méthode	stéroïde	concentrations ng/g poids frais	auteur
<i>Mya arenaria</i>	gonade	ELISA	testostérone	F de 0.029 (vitello) à 0.051 (ponte) M de 0.019 (d2) à 0.032 (indifférent)	nos résultats
			17 $\beta$ -œstradiol	F de 0.195 (post-vitello) à 0.379 (ponte) M de 0.143 (d2) à 0.411 (indifférent)	
<i>Mytilus edulis</i>	biomasse totale	RIA	testostérone	F: 0.20 (décembre) et 0.51 (février) M: 0.16 (décembre) et 0.72 (février)	Reis-Henriques <i>et al.</i> (1990)
			17 $\beta$ -œstradiol	F: 0.023 (décembre) et 0.053 (février) M: 0.021 (décembre) et 0.038 (février)	
	gonade	RIA	testostérone	2.1 au stade II et 5.4 au stade III	De Longcamp <i>et al.</i> (1974)
			17 $\beta$ -œstradiol	4.2 au stade III	
<i>Pecten yessoensis</i>	biomasse totale	HPLC	17 $\beta$ -œstradiol	F: $\pm$ 1.1 à 0.55 avant et après la ponte M: $\pm$ 0.1 et 0.2 avant et après la ponte	Matsumoto <i>et al.</i> (1997)
<i>Elliptio buckleyi</i>	manteau	RIA	testostérone	F de $\pm$ 0.25 à 0.8 M de $\pm$ 0.75 à 1.75	Gross <i>et al.</i> (2003)
			17 $\beta$ -œstradiol	F de $\pm$ 0.75 à 1.8 M de $\pm$ 0.5 à 0.2	
<i>Crassostrea gigas</i>	bio tc	129 HPLC	17 $\beta$ -œstradiol	F $\pm$ 1.5 (avant la ponte) à 0.7 M $\pm$ 0.5 (avant la ponte) à 0	Matsumoto <i>et al.</i> (1997)

même ordre de grandeur que celles rapportées chez *Mytilus edulis* pour la biomasse totale (Reis-Henriques *et al.*, 1990). Chez la moule, ces concentrations sont d'ailleurs comparables chez les mâles et les femelles. Les autres études réalisées durant la gamétogenèse et mentionnées dans le tableau 4-4 rapportent cependant des concentrations de l'ordre du  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissus chez *Crassostrea gigas*, *Patinopecten yessoensis* et *Elliptio buckleyi* (Matsumoto *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 2003). Elles montrent également chez ces bivalves une augmentation des concentrations en stéroïdes au cours de la maturation de la gonade jusqu'au moment de la ponte et des concentrations différentes chez les mâles et les femelles. L'implication des hormones stéroïdiennes dans le contrôle de la reproduction des bivalves pourrait varier d'une espèce à une autre. La sensibilité pourrait aussi être différente d'un organisme à l'autre vis à vis de ces hormones ce qui rend toute conclusion difficile quant à l'importance que pourrait avoir une hormone plutôt qu'une autre chez un bivalve par rapport à autre en ne considérant que la concentration de cette hormone chez différentes espèces. Du début du développement des gamètes jusqu'à la ponte, la variation des concentrations en stéroïdes chez les myes est moins importante et moins longue dans le temps que chez l'huître et le pétoncle (Matsumoto *et al.*, 1997). Les variations les plus importantes que nous ayons pu observer chez *Mya arenaria* concernent les femelles. Les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone les plus importantes ont été observées respectivement au stade pré-vitellogénique ( $379,6 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais) et au stade de ponte ( $334,4 \text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissu frais). Au moment de la ponte, l'augmentation est d'ailleurs significative pour E2 par rapport au stade post-vitellogénique et la concentration en T est aussi significativement plus élevée (ANOVA 1 facteur,  $F=3.213$ ;  $p<0.05$ ) que celle déterminée au stade vitellogénique. Les deux hormones stéroïdiennes pourraient donc

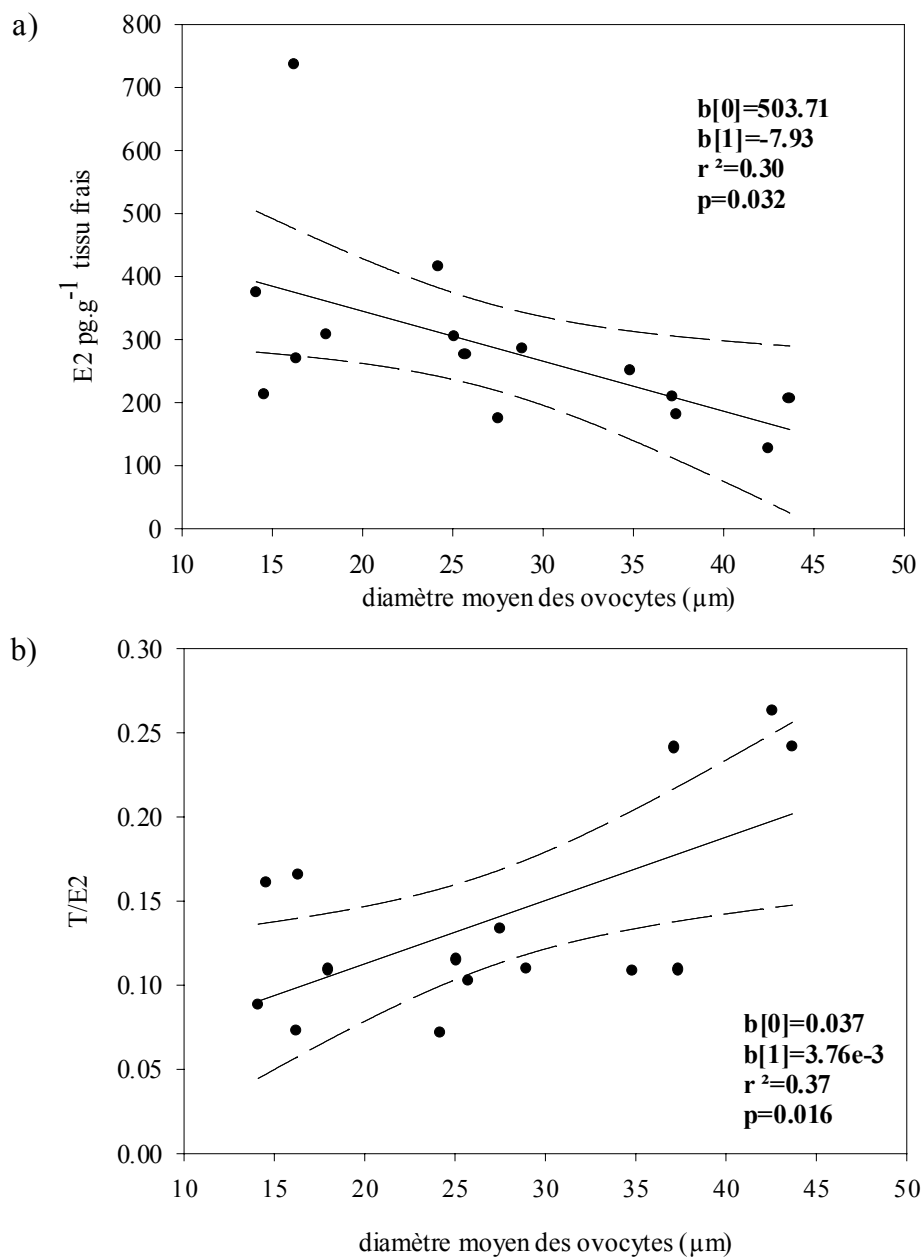
jouer un rôle dans la reproduction des femelles durant ces deux phases de la gamétogenèse. Au stade pré-vitellogénique, l'augmentation de la concentration en E2 pourrait refléter le rôle de cet œstrogène dans l'induction de la synthèse de vitellines alors que Blaise *et al.* (1999) ont pu observer avec une augmentation de la concentration en protéines de type vitellogénine dans l'hémolymphe de myes exposées à E2. Chez *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis*, bien que les concentrations rapportées dans la gonade soient supérieures à celles que nous observons chez *Mya arenaria* (tableau 4-4), une augmentation de la concentration en E2 dans la gonade a également lieu respectivement au début de l'augmentation du diamètre des ovocytes et au moment de l'augmentation de l'indice gonadosomatique (Matsumoto *et al.*, 1997). Ceci illustrerait chez *Mya* comme chez d'autres bivalves, l'implication de cette hormone stéroïdienne dans le contrôle de la vitellogenèse. Li *et al.* (1998) ont en effet clairement montré dans la gonade de *Crassostrea gigas* l'inductibilité de la synthèse des vitellines par le 17 $\beta$ -œstradiol. Cette synthèse de vitellines nécessite la mobilisation de réserves énergétiques et Mori (1980) a également montré chez les femelles *C. gigas* que le 17 $\beta$ -œstradiol peut induire la glycolyse dans les tissus interstitiels de la gonade et accélérer son processus de maturation (Mori, 1969). Li *et al.* (1998) n'ont fait que constater l'augmentation des concentrations en vitellines à la suite d'une exposition des pétoncles à du 17 $\beta$ -œstradiol. Cet effet inducteur du E2 pourrait résulter de son action directe sur le gène codant pour les vitellines à l'image de la synthèse de la vitellogénine chez les vertébrés ovipares (figure 2-6) et/ou de l'induction de la mobilisation des réserves énergétiques via des enzymes du catabolisme du glycogène ou des lipides. De plus, Moore *et al.* (1978) ont pu montrer que le 17 $\beta$ -œstradiol et la testostérone peuvent induire la déstabilisation de la membrane lysosomale chez *Mytilus edulis*. A l'époque,

ces auteurs soulignaient cependant le fait que cette induction pouvait être indirecte via l'action d'autres hormones. Plus tard, Moore (1991) a également montré que les prostaglandines de type  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) pouvaient aussi induire la déstabilisation de la membrane lysosomale. Compte-tenu du contrôle dans la gonade de la concentration des  $PGF_{2\alpha}$  par le  $17\beta$ -œstradiol décrit par Osada & Nomura (1990), ce dernier pourrait être impliqué dans un des systèmes de contrôle de la mobilisation des réserves énergétiques en agissant de manière indirecte et via le contrôle des concentrations en prostaglandines sur la déstabilisation de la membrane lysosomale.

Après le stade pré-vitellogénique, la concentration moyenne en  $17\beta$ -œstradiol diminue de 51 % jusqu'au stade post-vitellogénique. La figure 4-7a montre clairement une corrélation négative ( $r^2=0,30$ ,  $p<0,05$ ) entre le diamètre moyen des ovocytes et la concentration en E2 durant la vitellogenèse. Sur la figure 4-7b en revanche, la corrélation entre le rapport testostérone/ $17\beta$ -œstradiol et le diamètre des ovocytes est positive ( $r^2=0,37$ ,  $p<0,05$ ). La concentration en testostérone augmente d'ailleurs de 22 % du stade vitellogénique au stade post-vitellogénique (figure 4-6). Une certaine modulation de la stéroïdogénèse pourrait être à l'origine de la variation des concentrations en stéroïdes au cours de la vitellogenèse avec notamment un rétrocontrôle de l'activité de l'aromatase du cytochrome P450. L'augmentation de la concentration en testostérone et du rapport T/E2 au stade post- vitellogénique (figure 4-8) résulterait alors d'une diminution de la conversion de la testostérone en  $17\beta$ -œstradiol. Un tel rétrocontrôle a déjà pu être mis en évidence dans les ovocytes vitellogéniques de la truite arc-en-ciel lorsque la quantité de vitellogénine augmente (Reis-Henriques *et al.*, 2000). Il est également possible que l'augmentation de la

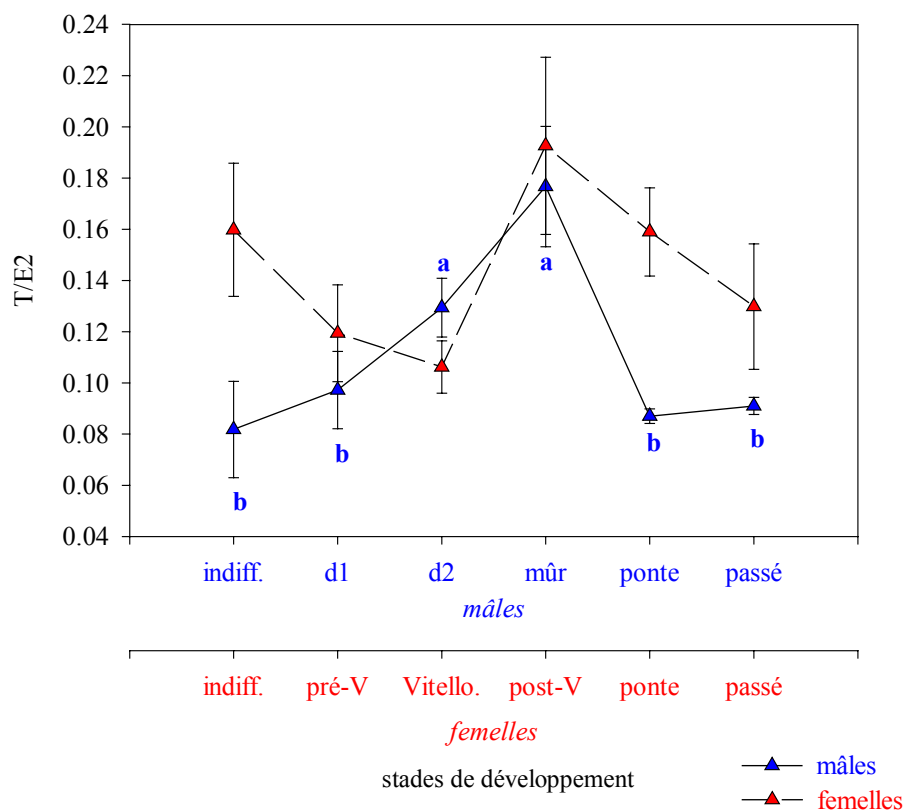
concentration en testostérone chez les femelles au stade post-vitellogénique soit nécessaire pour induire le stockage d'autres hormones impliquées dans le déclenchement de la ponte comme cela a pu être observé chez le poisson chat *Heteropneustes fossilis* avec l'induction du stockage de gonadotropines (Sundararaj *et al.*, 1982). Chez *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis*, une diminution significative des concentrations en E2 a également été observée lorsque respectivement le diamètre des ovocytes cesse d'augmenter (avant que la ponte ne se produise) et avant que l'indice gonado-somatique n'ait atteint son maximum (Matsumoto *et al.*, 1997). Chez les mâles, la légère augmentation de la concentration en E2 durant le stade mûr pourrait assurer une certaine mobilité des spermatozoïdes et favoriser la fécondation ultérieure des ovocytes comme cela a pu être observé avec les spermatozoïdes de *Crassostrea gigas* exposés au  $17\beta$ -œstradiol (Mori, 1968b).

Au moment de la ponte, la concentration en E2 augmente chez les femelles et la concentration en testostérone est significativement supérieure à celle au stade vitellogénique (ANOVA 1 facteur,  $F=3.21$ ;  $p<0.05$ ). Nous avons présenté à la figure 2-4 les diverses interactions entre les catécholamines, les prostaglandines et le  $17\beta$ -œstradiol au moment du déclenchement de la ponte. L'augmentation de la concentration en E2 chez *Mya arenaria* pourrait alors s'inscrire dans un processus de contrôle du déclenchement de la ponte semblable à celui décrit chez *Patinopecten yessoensis*. Le  $17\beta$ -œstradiol pourrait alors contrôler l'action régulatrice des prostaglandines de type  $PGE_2$  (Osada & Nomura, 1990) dont l'implication dans le processus de ponte chez le pétoncle (Osada *et al.*, 1989) résulterait du contrôle de la concentration en sérotonine (Matsutani & Nomura, 1987; Osada & Nomura, 1989b). Une fois la ponte déclenchée,



**Figure 4-2:** Régressions linéaires entre le diamètre moyen des ovocytes durant la vitellogenèse et a) la concentration moyenne en  $17\beta$ -œstradiol (E2) dans la gonade ou b) la valeur du ratio testostérone/ $17\beta$ -œstradiol (T/E2) dans la gonade.





**Figure 4-3:** Valeurs moyennes ( $\pm$  erreur type) du ratio T/E2 pour chaque stade de développement de la gonade mâle et femelle.

*Légendes:* "a" est significativement ( $p < 0,05$ ) différent de "b".

la concentration en E2 reste significativement supérieure au stade post-vitellogénique de la gonade des myes ce qui pourrait refléter le rétrocontrôle du  $17\beta$ -œstradiol vis-à-vis des concentrations en dopamine et en noradrénaline déjà observées chez *Patinopecten yessoensis* (Osada & Nomura, 1990). Les concentrations en catécholamines diminuent en effet lorsque la ponte est effective chez le pétoncle puis augmentent de nouveau durant les premiers stades de la différenciation cellulaire. Chez les myes, si le  $17\beta$ -œstradiol régule les concentrations en catécholamines, une augmentation de celles-ci pourrait également être observée au début d'un nouveau cycle de reproduction puisque la concentration moyenne en E2 au stade indifférent est significativement inférieure à

celle déterminée dans les gonades au stade passé. Aussi, nous pouvons remarquer que la diminution dans la gonade de *Mya arenaria* des concentrations en  $17\beta$ -œstradiol du stade post-vitellogénique chez les femelles entraîne une augmentation de la valeur du ratio testostérone/ $17\beta$ -œstradiol (T/E2) (figure 4-8). Alors que la diminution de 25 % du ratio T/E2 chez les femelles au stade pré-vitellogénique résulte principalement de l'augmentation de 85 % de la concentration en E2 déjà mentionnée plus haut. Chez les mâles, une ANOVA à un facteur montre une augmentation significative ( $F=5.39$ ;  $p<0.05$ ) du ratio au stade mûr mais une ANOVA à 2 facteurs (sexe, stade) ne montre aucun effet combiné du sexe et du stade de développement. Tout comme les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone, le ratio T/E2 ne nous permet donc pas de différencier les mâles des femelles au cours de la reproduction, que ce soit par sa valeur ou par ses variations. A titre indicatif, nous avons réalisé quelques dosages de testostérone et de  $17\beta$ -œstradiol dans la glande digestive de femelles du stade indifférent au stade post-vitellogénique. Les résultats de ces dosages apparaissent au tableau 4-5. Compte-tenu de la grande variabilité des résultats et du faible nombre d'analyse, nous considérons que ces concentrations sont comparables à celles déterminées dans la gonade pour chacun des stades. Cette similitude nous permet d'ailleurs de comprendre comment les concentrations que nous avons déterminées dans la gonade des myes peuvent être du même ordre de grandeur que celles déterminées par Reis-Henriques *et al* (1990) dans la totalité de la biomasse des moules *Mytilus edulis* (tableau 4-4). La glande digestive des bivalves possède un certain potentiel de synthèse de stéroïdes avec la présence de nombreuses enzymes de la stéroïdogénèse (tableau 2-1). Les stéroïdes qui peuvent y être détectés y sont probablement synthétisés. Chez les

**Tableau 4-2:** Concentrations moyennes ( $\pm$  écart-type) en  $17\beta$ -œstradiol (E2) et en testostérone (T) déterminées dans la glande digestive de femelles à différents stades de la gamétogenèse.

Stade de développement	E2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tissu frais	T $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tissu frais
indifférent	476 (n=2)	41,9 $\pm$ 12,2 (n=3)
pré-vitellogénique	335 $\pm$ 65 (n=3)	40,5 $\pm$ 4,8 (n=3)
vitellogénique	435 $\pm$ 120 (n=3)	42,5 $\pm$ 4,6 (n=)
post-vitellogénique	654 $\pm$ 409 (n=3)	55,1 $\pm$ 18,1 (n=3)

myes, la proximité de la glande digestive avec la gonade ne nous ne permet pas d'exclure l'existence d'un transfert de stéroïdes entre ces deux organes. La présence d'enzymes de la stéroïdogénèse au sein de la gonade a toutefois été rapportée chez de nombreux bivalves (tableau 2-1 du chapitre 2) et les concentrations en hormones stéroïdiennes déterminées dans la gonade de *Crassostrea gigas*, *Patinopecten yessoensis*, *Elliptio buckleyi* et *Mya arenaria* (tableau 4-4) nous confortent dans l'idée que les stéroïdes présents dans la gonade de *Mya arenaria* y sont synthétisés. L'expérimentation de Mori (1968a) qui a montré l'action spécifique du  $17\beta$ -œstradiol vis à vis de la respiration de la gonade chez *Crassostrea gigas* (sans qu'aucun effet ne soit observé dans la glande digestive) ne peut d'ailleurs que conforter notre conviction que chez les bivalves une hormone doit principalement être synthétisée là où son action régulatrice doit avoir lieu. L'absence d'une circulation fermée de l'hémolymphe chez les bivalves ne facilite pas le transfert spécifique d'un composé actif d'un organe à un autre. Un transfert de stéroïdes entre les deux organes pourrait cependant avoir lieu et serait facilité par leur proximité immédiate sur une surface de contact relativement importante par rapport au volume de la glande digestive. Ce transfert de stéroïdes via l'hémolymphe

est d'autant plus plausible qu'il a déjà été rapporté pour plusieurs neurotransmetteurs tels que les catécholamines chez *Placopecten magellanicus* (Pani & Croll, 2000), les prostaglandines chez *Patinopecten yessoensis* (Osada & Nomura, 1990) et les facteurs qui stimulent la mitose dans la gonade de *Mytilus edulis* (Mathieu *et al.*, 1988). Le dosage de stéroïdes dans l'hémolymphe de même que la recherche de récepteur ou de protéines de transfert seraient restés malgré tout nécessaires pour vérifier ce phénomène.

#### **4.4. CONCLUSION**

Ce chapitre 4 avait pour but de décrire la variation des concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone dans la gonade des myes durant la reproduction afin d'estimer l'implication de ces hormones dans le contrôle de la reproduction mais la redéfinition des stades de développement de la gonade mâle nous a tout d'abord permis de discriminer six stades de développement, distincts d'après l'activité synthétique de la gonade, et comparables en terme de développement de la gonade à ceux définis chez les femelles dans le chapitre 2. Une telle redéfinition était nécessaire pour comparer les concentrations en hormones stéroïdiennes des mâles et des femelles, compte-tenu du décalage temporel de la gamétogenèse entre les deux sexes. Les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone rapportées dans la gonade sont faibles par rapport aux concentrations en progestérone décrites par Siah *et al.* (2002, 2003). Les concentrations en testostérone rapportées chez les femelles sont plus importantes que chez les mâles mais leur patron de distribution au cours de la gamétogenèse, de même celles en  $17\beta$ -œstradiol ne permettent pas de distinguer clairement les mâles des femelles. Cette similitude a également été observée dans la gonade d'autres invertébrés comme l'étoile

de mer *Asterias vulgaris* (Hines *et al.*, 1992a) bien que chez *Patinopecten yessoensis* et *Crassostrea gigas* les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol soient beaucoup plus importantes chez les femelles que les mâles. Le rapport testostérone/ $17\beta$ -œstradiol ne nous permet pas non plus de distinguer clairement les deux sexes. L'augmentation de la concentration en  $17\beta$ -œstradiol que nous avons observée chez les femelles au stade pré-vitellogénique semble montrer l'implication de cet œstrogène dans l'initiation de la vitellogenèse des myes. Cette augmentation est en accord avec les inductions de synthèses de vitellines ou de protéines de type vitellogénine observées chez *Crassostrea gigas* (Li *et al.*, 1998) et *Mya arenaria* (Blaise *et al.*, 1999). Malgré nos résultats et ceux des deux auteurs cités, nous ne sommes pas en mesure de montrer si le rôle du  $17\beta$ -œstradiol durant la vitellogenèse résulte de l'induction directe du gène codant pour des vitellines ou si cette induction est indirecte en stimulant la mobilisation des réserves énergétiques comme le suggèrent les études de Mori (1980) et de Moore *et al.* (1978). L'augmentation des concentrations en  $17\beta$ -œstradiol au moment de la ponte chez les mâles et les femelles suggèrent également son rôle dans le déclenchement de celle-ci. Le  $17\beta$ -œstradiol pourrait alors interagir avec les prostaglandines pour moduler les concentrations en catécholamines (sérotonine) et contrôler indirectement le déclenchement de la ponte (Matsutani & Nomura, 1987; Osada *et al.*, 1989; Osada & Nomura, 1990). Ces résultats nous permettent de confirmer que le  $17\beta$ -œstradiol et la testostérone sont présentes dans la gonade de *Mya arenaria*. Le  $17\beta$ -œstradiol pourrait principalement participer au contrôle de l'initiation de la vitellogenèse chez les femelles et au déclenchement de la ponte pour les deux sexes d'après les variations de ses concentrations durant la gamétogenèse. Le mode d'action du  $17\beta$ -œstradiol reste cependant à définir dans la régulation hormonale de la reproduction à laquelle

participent également d'autres hormones comme les prostaglandines et les catécholamines avec lesquelles le  $17\beta$ -œstradiol est capable d'interagir.

## **CHAPITRE V**

**EFFETS DE L'EXPOSITION *IN VIVO* DE *MYA ARENARIA*  
AU 17 $\beta$ -ŒSTRADIOL SUR L'ACTIVITÉ VITELLOGÉNIQUE  
ET LA MOBILISATION DES RÉSERVES EN GLYCOGÈNE.**

## 5.1. INTRODUCTION

Grâce au suivi durant la gamétogenèse des concentrations en  $17\beta$ -œstradiol (E2) et en testostérone dans la gonade des myes présenté au chapitre 5, nous avons pu observer une augmentation de la concentration en E2 au début du développement des gamètes. Cette augmentation de la concentration en E2 dans la gonade de *Mya arenaria* durant le stade pré-vitellogénique pourrait être liée chez les femelles à l'effet inducteur du E2 durant la vitellogenèse pour la synthèse de vitellines et/ou la mobilisation des réserves énergétiques. Blaise *et al.* (1999) ont montré une augmentation des concentrations en protéines de type vitellogénine dans l'hémolymphe de myes exposées à différents composés œstrogéniques. Li *et al.* (1998) ont démontré pour leur part l'effet inducteur du E2 sur la synthèse de vitellines dans la gonade de *Patinopecten yessoensis*. La synthèse de protéines de réserves nécessite cependant la mobilisation de réserves énergétiques et chez les bivalves, Mori (1980) est le seul auteur à avoir montré qu'une exposition au  $17\beta$ -œstradiol était capable d'induire une diminution de la quantité du glycogène dans le tissu interstitiel et le tissu conjonctif du manteau de *Crassostrea gigas*. Cette mobilisation du glycogène durant la gamétogenèse est bien connue chez les bivalves (Bayne, 1976; Gabbott, 1975). Chez *Mya arenaria* nous avons déjà constaté dans la gonade une diminution des concentrations en glycogène durant la gamétogenèse (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Dans la gonade de l'huître *Crassostrea gigas*, la diminution des concentrations en glycogène est inversement proportionnelle à l'augmentation du diamètre des ovocytes, des concentrations en protéines et en ARN (Li *et al.*, 2000). Chez les poissons (*Platichthys flesus*, *Salmo gairdnerii*), l'effet inducteur du  $17\beta$ -œstradiol sur le métabolisme énergétique et en particulier de la mobilisation du



glycogène a également été rapporté dans le foie (Petersen *et al.*, 1983). Cette mobilisation du glycogène est d'ailleurs concomitante à l'augmentation de la concentration en vitellogénine, en protéines et en ARN (Emmersen *et al.*, 1979; Haux & Norberg, 1985). Nous avons donc choisi d'exposer des myes mâles et femelles *in vivo* au  $17\beta$ -œstradiol et d'observer l'effet de cette exposition sur la mobilisation du glycogène, l'activité synthétique de la gonade et son contenu relatif en protéines de type vitelline reconnues par l'antisérum anti-FSP de pétoncle que nous avons déjà utilisé dans les expériences décrites dans le chapitre 2. Cette exposition a pour but de confirmer si les concentrations les plus élevées en  $17\beta$ -œstradiol observées au début du développement des gamètes au chapitre 4 résultent de l'implication des œstrogènes dans la mobilisation des réserves énergétiques pour le développement des gamètes. L'utilisation de l'antisérum anti-FSP de pétoncle nous permettra également d'observer si les protéines qu'il reconnaît dans la gonade des femelles durant la gamétogenèse ont une synthèse inductible par le  $17\beta$ -œstradiol et si cette induction est également effective chez les mâles par analogie avec l'augmentation des protéines de type vitellogénique dans le sérum des vertébrés ovipares mâles exposés à des œstrogènes.

Puisque les résultats du chapitre 4 tendent à démontrer que l'augmentation des concentrations en  $17\beta$ -œstradiol au stade pré-vitellogénique reflète son implication dans l'induction du développement des gamètes via l'induction de la mobilisation des réserves énergétiques et/ou de la synthèse de vitellines, il était important que la condition physiologique des myes utilisée durant cette exposition *in vivo* leur permette de répondre à une induction potentielle de la vitellogenèse. Les organismes devaient donc disposer des réserves énergétiques en glycogène et leurs gamètes ne devaient pas

être trop développés pour répondre à une stimulation de leur développement. Chez l'étoile de mer *Asterias rubens*, l'inductibilité du processus vitellogénique par le 17 $\beta$ -œstradiol ne s'avère d'ailleurs effective que pour des ovocytes en début de développement (Schoenmakers *et al.*, 1981), bien qu'un certain seuil de taille soit cependant nécessaire (Van der Plas *et al.*, 1982). Nous avons donc réalisé cette exposition au 17 $\beta$ -œstradiol avec des myes échantillonnées durant le mois de septembre 2000 puisque d'après le suivi saisonnier présenté au chapitre 3 et les travaux réalisés en 1998 (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002) le développement des gamètes est en cours et les réserves énergétiques sont déjà importantes.

## **5.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE**

### **5.2.1. Protocole d'exposition des myes au 17 $\beta$ -œstradiol**

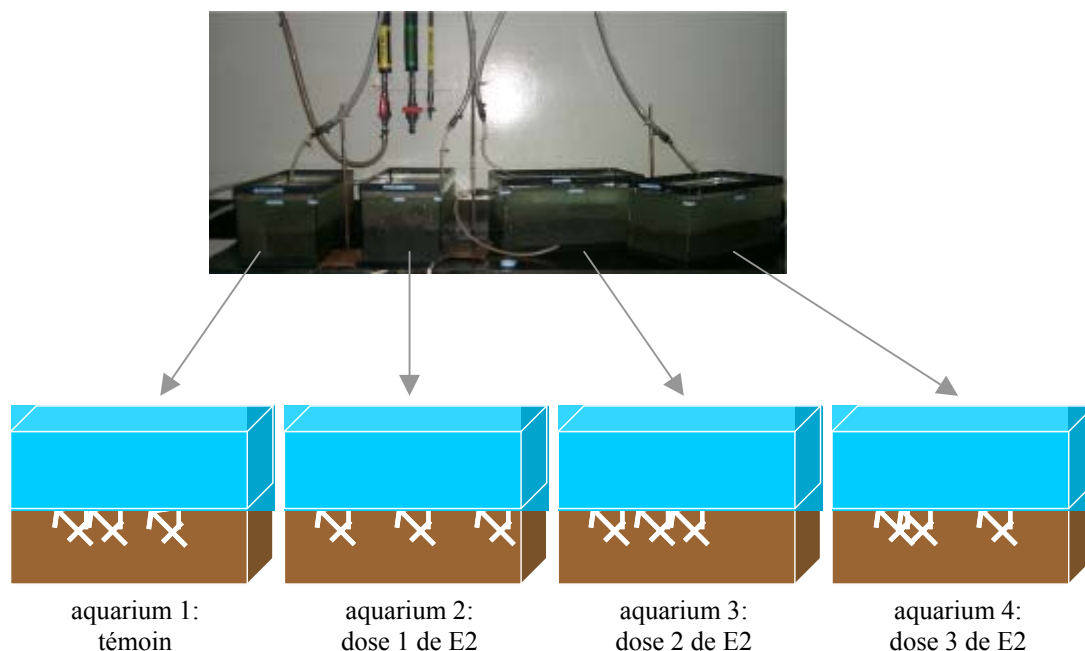
L'exposition *in vivo* des myes nécessitait la mise en place d'un protocole expérimental qui nous permette de les maintenir vivantes et de minimiser le stress induit par la captivité. Il était donc nécessaire de les enfouir dans du sédiment durant une période d'acclimatation et la période d'exposition. Ce protocole a été mis en place à la station aquicole de l'ISMER localisée à Pointe au Père à 10 km en aval de Rimouski sur la rive du Saint-Laurent. Quatre aquariums ont été installés: un pour les témoins expérimentaux et les trois autres pour chacune des trois doses testées durant l'exposition au 17 $\beta$ -œstradiol. Du sédiment de la Baie de Métis sur Mer a été récolté pour en déposer une couche dans chaque aquarium de 45 L et y enfouir les myes. Comme pour les chapitres 2 et 3, ce site a été choisi puisque nous le considérons comme un site témoin exempt d'une contamination urbaine ou agricole. Une fois rapporté au laboratoire, le sédiment a été tamisé sur une maille de 0,9 cm pour enlever les organismes de plus

grosse taille (*Nereis sp*, *Macoma baltica*, jeunes myes, etc) et les plus grosses roches, puis homogénéisé et réparti dans chacun des aquariums à raison d'une couche d'une épaisseur équivalente au tiers de la hauteur des aquariums (10 à 15 cm). Ceux-ci ont ensuite été alimentés en eau de mer pompée dans le Saint-Laurent et filtrée. Durant toutes les périodes d'acclimatation et d'exposition, le débit dans chaque aquarium a été de 1 à 1,25 L·min.<sup>-1</sup> et la température de l'eau est restée entre 7 et 9,5 °C pour une salinité de 28 à 30 ppm. Les aquariums étaient placés dans une pièce où la photopériode était de 14 h de jour pour 10 h de nuit. La figure 5-1 présente les aquariums et le principe de leur utilisation.

#### 5.2.1.1. Échantillonnage des myes

Les myes qui ont été utilisées pour cette expérience ont été échantillonnées dans la Baie de Métis sur Mer présentée au chapitre 3 (section 3.2.1.1). Pour l'exposition, 80 myes ont été échantillonnées en début du mois de septembre 2000 et 80 autres au milieu du même mois pour réaliser des réplicats pour chacune des doses et pour le témoin. Toutes ont été choisies dans la même classe de taille que les myes des chapitres 3 et 4 (6,5 à 7,5 cm de longueur) afin de travailler durant toute la durée de cette thèse avec des individus provenant de la même population et ayant un âge équivalent tout en provenant du même site de référence.

Une fois échantillonnées, 20 myes ont été réparties aléatoirement dans chacun des 4 aquariums, enfouies et pour une période d'acclimatation de 10 jours avant le début de l'exposition au 17 $\beta$ -œstradiol.



**Figure 5-1:** Montage expérimental utilisé pour l'exposition des myes aux trois doses de  $17\beta$ -œstradiol (E2).

#### 5.2.1.2. Mode d'administration et durée de l'exposition au $17\beta$ -œstradiol

L'administration des doses de  $17\beta$ -œstradiol a été faite par injection dans le muscle adducteur. Ce mode d'exposition au  $17\beta$ -œstradiol par injection a déjà été utilisé chez les myes par Blaise *et al.* (1999) mais aussi chez *Mytilus edulis* (Moore *et al.*, 1978), *Crassostrea gigas* (Mori, 1969; Mori *et al.*, 1969) et *Patinopecten yessoensis* (Osada & Nomura, 1989b; Li *et al.*, 1998). Trois doses de  $17\beta$ -œstradiol ont été choisies: 10 nmoles, 20 nmoles et 40 nmoles. Elles ont été choisies d'après les résultats obtenus par Blaise *et al.* (1999) qui avaient observé une augmentation significative des concentrations en protéines apparentées à la vitellogénine dans l'hémolymphe des myes exposées à 12,5 et 25 nmoles de E2. Contrairement à l'utilisation par Blaise *et al.* (1999) du DMSO pour dissoudre le  $17\beta$ -œstradiol, nous avons choisi l'éthanol qui est

métabolisable par les organismes. Schoenmakers *et al.* (1981) avaient également fait ce choix pour injecter du  $17\beta$ -œstradiol dans des étoiles de mer *Asterias rubens*. Une photographie de l'injection est présentée sur la figure (5-2). Les organismes témoins ont été exposés à 25  $\mu$ L d'éthanol absolu et après l'injection, les myes ont été replacées dans le sédiment de chaque aquarium où elles avaient été acclimatées. La durée de l'exposition a été de 48 h au terme de laquelle les myes ont été disséquées.



**Figure 5-1:** Photographie de l'injection de  $17\beta$ -œstradiol dans le muscle adducteur des myes.

#### 5.2.1.3. Prélèvements biologiques réalisés au terme des 48 h d'exposition au $17\beta$ -œstradiol

Au terme des 48 h d'exposition, la gonade a été prélevée pour chaque mye exposée ou témoin pour réaliser les dosages biochimiques et les coupes histologiques. Pour le deuxième groupe d'expositions réalisées pour avoir des répliqués expérimentaux (pour chaque dose et pour les témoins), l'hémolymphe des myes a également été recueillie pour 5 organismes de chaque groupe avant les dissections pour une étude

d'immunocompétence. Les ponctions ont été réalisées avec une seringue de 3 mL munie d'une aiguille de type 23G.

### **5.2.2. Sexage par un examen histologique**

Une étude histologique telle que décrite dans la section 3.2.2. du chapitre 3 nous a permis de sexer les myes. L'ensemble des myes utilisées pour cette expérience ayant été échantillonné dans l'espace de 15 jours nous n'avons pas déterminé leur stade de développement.

### **5.2.3. Dosages biochimiques réalisés pour la gonade**

#### 5.2.3.1. Évaluation de l'activité synthétique des gonades

Les concentrations en protéines, en ARN et en ADN ont été déterminées pour chaque individu. Les protocoles utilisés ont été les mêmes que ceux décrits dans la section 3.2.3 du chapitre 3.

#### 5.2.3.2. Évaluation de la mobilisation du glycogène

La mobilisation potentiellement du glycogène induite par l'exposition au E2 a été déterminée en évaluant la quantité en glycogène de la gonade et l'activité de la glycogène phosphorylase dans chacun des groupes exposés en les comparant au groupe témoin.

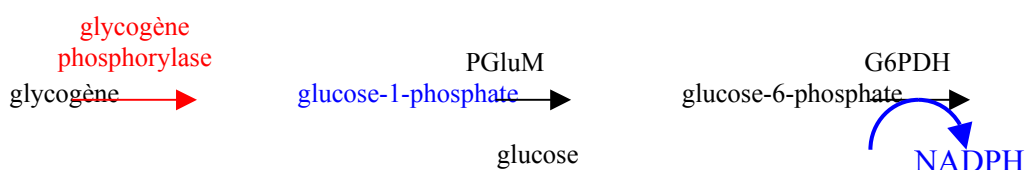
#### *Dosage du glycogène*

Le protocole utilisé est celui de Carr & Neff (1984) et les tissus ont été homogénéisés dans du tampon Citrate 0,1 M, pH 5 pour réaliser le dosage. Le principe de ce dosage est de digérer le glycogène en présence d'amyloglucosidase (Sigma, A3042) dans un

sous-échantillon et par différence avec la quantité de glucose libre présent dans un autre sous-échantillon de déterminer la quantité de glucose engendrée par la digestion du glycogène. Le même principe de digestion est réalisé avec un standard de glycogène ce qui nous permet d'exprimer nos résultats non pas en unités de glucose mais en quantité de glycogène. Le standard utilisé est du glycogène d'huître (Sigma, type II, G8751). Pour réaliser le dosage, 400  $\mu\text{L}$  d'homogénat sont incubés entre 18 et 24 h avec 10  $\mu\text{L}$  (0.42 unités) d'amyloglucosidase. Après la période d'incubation, 20  $\mu\text{L}$  d'homogénat incubé avec l'amyloglucosidase ou non incubé (pour doser le glucose libre dans l'homogénat avec le glycogène non digéré) sont additionnés de 200  $\mu\text{L}$  de tampon citrate (0,1M pH 5) et 1,6 mL d'une solution contenant de la glucose oxydase (type 2, Sigma G-6125), de la O-dianosine (Sigma D-3252) et de la peroxydase de type 1 (Sigma-P-8125). Les digestions enzymatiques sont ensuite stoppées par l'ajout de 60  $\mu\text{L}$  de HCl 5 N et les lectures sont réalisées au spectrophotomètre à 420 nm. La courbe standard avec le glycogène d'huître est obtenue selon ce même protocole.

#### *Dosage de l'activité de la glycogène phosphorylase*

L'activité de la glycogène phosphorylase a été déterminée selon un protocole modifié de Murat (1976). Le principe du dosage est de suivre au spectrophotomètre et de manière indirecte la cinétique de dégradation du glycogène par la glycogène phosphorylase, en mesurant la quantité de NADPH produit au terme de la dégradation du glucose-1-phosphate en présence de phosphoglucomutase (PGluM) et de glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH):



Une unité d'activité enzymatique de la glycogène phosphorylase équivaut alors à une mole de glycogène-1-phosphate produite et donc à une mole de NADPH détectée dans le milieu en présence de PGluM et de G6PDH.

Pour réaliser le dosage, la gonade est tout d'abord homogénéisée dans du tampon phosphate 50 mM, pH 7,2 contenant de l'EDTA (5 mM) et du NaF (20nM). Après centrifugation à 15 000 g pendant 20 minutes, 50  $\mu$ L du surnageant sont placés dans une cuvette en quartz de spectrophotomètre de 1,5 mL. Après ajout de 350  $\mu$ L de tampon réactionnel 1 (NaCl 125 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  40 mM, imidazole 5 mM, EDTA 2 mM, DTT 1.4 mM et Mg-acétate 5 mM, pH 7) et 350  $\mu$ L de tampon réactionnel 2 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, glucose-1-6-phosphate, NADP 0,6 mM, glycogène 2 mg, AMP 2 mM, pH 7). La gluco-phosphomutase (PGluM) (Böehringer Mannheim, 2  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) est alors ajouté (8  $\mu$ L) ainsi que la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Böehringer Mannheim, 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) (1,84  $\mu$ L). L'incubation se fait à 25°C et le suivi de la production de NADPH a lieu durant 3 minutes, à 340 nm et la pente de la courbe de production du NADPH est calculée. Le calcul de l'activité de la glycogène phosphorylase est alors le suivant:

**phosphorylase U/mL d'homogénat** =  $[(\text{DO}\cdot\text{min.}^{-1}) \times \text{volume total dans la cuvette (mL)} \times \text{facteur de dilution de l'homogénat}] / [(\epsilon=6,22) \times \text{volume d'homogénat pour le dosage}]$ , avec DO la densité optique et  $\epsilon$  le coefficient d'extinction du NADPH.

L'activité de la glycogène phosphorylase est ensuite normalisée par la quantité de protéines présentes dans les 50  $\mu$ l du surnageant de l'homogénat centrifugé et utilisés au moment du dosage:



**phosphorylase U/mg protéines** = (U·mL<sup>-1</sup> de surnageant)/(mg de protéines·mL<sup>-1</sup> de surnageant).

Les concentrations en protéines du surnageant ont été déterminées pour chaque fraction cytosolique des homogénats selon le protocole de Bradford (1976).

#### 5.2.3.3. Évaluation de l'immunoréactivité des gonades avec l'antisérum anti-FSP de pétoncle

Le protocole de dosage par ELISA de l'immunoréactivité des vitellines avec l'antisérum anti-FSP de *Patinopecten yessoensis* est le même que celui décrit à la section 3.2.4 du chapitre 3. En ce qui concerne l'expression des résultats, le principe est le même que celui décrit dans la section 3.2.4. le potentiel d'immunoréactivité des vitellines de mye, vis à vis de l'antisérum anti-FSP de pétoncle a été exprimé en pourcentage par rapport à la valeur [luminescence/quantité de protéines] la plus élevée et déterminée chez les femelles du groupe témoin.

### **5.2.4. Évaluation de l'immunocompétence des myes**

#### 5.2.4.1. Viabilité des hémocytes

La viabilité cellulaire a été évaluée par cytométrie en flux avec le principe d'exclusion du iodure de propidium (Sigma, P4170). L'iodure de propidium (PI) se fixe sur les acides nucléiques des cellules mortes et est très fluorescent. Pour réaliser cette mesure, 1 µL de solution de PI (1 mg·mL<sup>-1</sup>) est ajouté à chaque suspension cellulaire dont la concentration cellulaire est ajustée à 1,1 x 10<sup>6</sup> cellules·mL<sup>-1</sup>. L'émission de la fluorescence est mesurée à 625 nm pour 10 000 événements par échantillon et exprimée en terme de pourcentage de cellules viables par mL et pour un individu.

#### 5.2.4.2. Évaluation de la capacité phagocytaire des hémocytes

La phagocytose a été évaluée avec une méthode de cytométrie en flux développée pour les hémocytes de bivalves (Brousseau *et al.*, 1999). Les hémocytes sont mis en contact avec des billes vert-jaune fluorescentes d'un diamètre de 1,2  $\mu\text{m}$  (FluoSphere de chez Molecular Probes Inc, Eugene, OR, USA) selon un ratio 1/100 : hémocyte/billes. Une fois les hémocytes et les billes en contact, une incubation de 18h a lieu à l'obscurité et à 20°C. Après l'incubation, 0,5 mL de chaque suspension est déposé sur un gradient de protéines de sérum bovin 0,3 % dans un milieu de type RPMI. Les cellules sont alors séparées des billes non phagocytées par centrifugation à 150 g pour une durée de 8 minutes à 4°C. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 0,5 mL d'une solution pour cytométrie en flux (Fisher, Montréal, Canada) et les mesures sont réalisées avec un cytomètre FACScan (Becton Dickinson, Immunocytotechnology Systems, Mountain View, CA, USA) avec un laser produisant une excitation à 488 nm. Les données collectées sont traitées avec le programme LYSIS-II (Brousseau *et al.*, 1999). Les données sont alors exprimées en terme de nombre de cellules ayant phagocyté une bille et plus, pour évaluer le nombre d'hémocytes ayant la capacité de phagocyter, ou le nombre de cellules ayant phagocyté trois billes et plus pour distinguer le nombre d'hémocytes considérés comme les plus actifs pour avoir une bonne efficacité de la phagocytose.

#### **5.2.5. Traitements statistiques des données**

Cette exposition au 17 $\beta$ -œstradiol a dû être répétée pour obtenir des répliquats expérimentaux. Nous avons dû réaliser la comparaison des résultats pour les différents groupes avec une analyse ANOVA à deux facteurs (dose, expérience) ou trois facteurs

(dose, expérience, sexe) pour comparer les résultats obtenus pour un sexe ou pour les deux sexes respectivement dépendamment de la dose d'exposition. Dans tous cas, la normalité de la répartition des données était vérifiée et le seuil de significativité a été fixé à  $p < 0,05$ . Pour l'étude de l'immunocompétence des myes, une ANOVA à un facteur (dose) a été réalisée puisque les myes n'étaient pas sexées et que cette étude immunologique n'a pu avoir lieu que pour le deuxième réplicat expérimental.

### **5.3. RÉSULTATS ET DISCUSSION**

Compte tenu de la masse de chair totale de chacune des myes exposées à chacune des doses de  $17\beta$ -œstradiol, les trois doses administrées aux myes équivalaient à  $0,31 \pm 0,09 \mu\text{g E2}\cdot\text{g}^{-1}$  de chair fraîche pour l'injection de 10 nmoles,  $0,61 \pm 0,2 \mu\text{g E2}\cdot\text{g}^{-1}$  de chair fraîche pour l'injection de 20 nmoles et  $1,2 \pm 0,3 \mu\text{g E2}\cdot\text{g}^{-1}$  de chair fraîche pour l'injection de 40 nmoles. La plus forte dose que nous avons utilisée ( $1,2 \mu\text{g E2}\cdot\text{g}^{-1}$  de chair fraîche) est un peu plus faible que celle testée par Li *et al.* (1998) lors de l'exposition la plus courte (20 jours) qu'ils ont réalisée avec le pétoncle ( $\sim 4,52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  chair fraîche). Nos deux plus fortes doses sont cependant du même ordre de grandeur que les deux plus petites doses ( $0,5$  à  $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  chair fraîche et  $1$  à  $4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  chair fraîche) utilisées par Mori *et al.* (1969) en considérant que le poids moyen de chair fraîche de leurs huîtres était de 40 g. Ces doses sont d'ailleurs comparables à celles utilisées chez les poissons pour des injections péritonéales avec des périodes d'exposition de 1 à 2 semaines (Emmersen *et al.*, 1979; Sand *et al.*, 1980; Haux and Norberg, 1985).

#### **5.3.1. Immunocompétence des myes exposées au $17\beta$ -œstradiol**

Bien que l'immunocompétence des myes n'ait été déterminée que pour le deuxième groupe d'expérience, les résultats nous montrent que la condition des myes était

satisfaisante du début à la fin de l'expérience (tableau 5-1). En effet, chez les témoins la viabilité et capacité de phagocytose des hémocytes sont comparables avec les témoins utilisés dans d'autres travaux avec les myes (Fournier *et al.*, 2002). La capacité de phagocytose des myes exposées à 10 et 20 nmoles de E2 est cependant significativement plus faible que celle des myes témoins. Ce résultat suggère que E2 pourrait agir sur la régulation de l'immunocompétence des myes. Les hormones pourraient donc contrôler la capacité phagocytaire des hémocytes de myes et E2 intervenir dans un processus de rétrocontrôle d'après nos résultats.

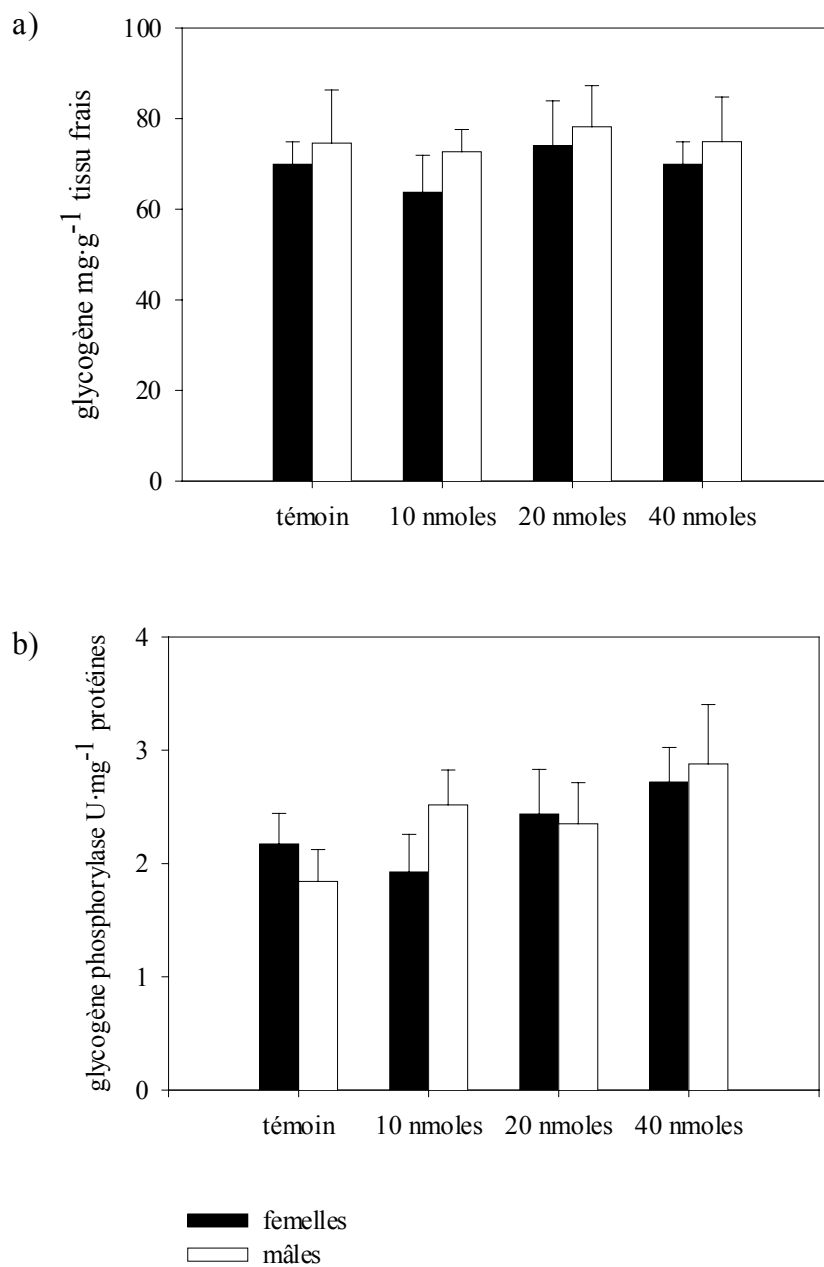
**Tableau 5-1:** Résultats de l'évaluation de l'immunocompétence des myes au terme de l'exposition au 17 $\beta$ -œstradiol.

paramètre	témoin	10 nmoles E2	20 nmoles E2	40 nmoles E2
Viabilité cellulaire %	68,7 (7,3)	64,7 (10,7)	68,2 (8,5)	78,5 (2,9)
cell. phagocytaires % (1 bille et plus)	71,5 (2,8) <i>a</i>	46,8 (4,3) <i>b</i>	49,7 (7,5) <i>b</i>	71,5 (1,0) <i>a</i>
cell. phagocytaires % (3 billes et plus)	59,3 (2,96) <i>a</i>	35,9 (3,5) <i>b</i>	38,6 (5,8) <i>b</i>	57,9 (1,8) <i>a</i>

*Légendes:* les résultats représentent les moyennes avec l'écart-type entre parenthèses et "*a*" est significativement ( $p < 0,05$ ) différent de "*b*".

### 5.3.2. Effets de l'exposition des myes au 17 $\beta$ -œstradiol sur la mobilisation du glycogène et la synthèse de protéines de type vitelline dans la gonade

Les concentrations en glycogène et l'activité de la glycogène phosphorylase sont présentées aux figures 5-3 a) et b) respectivement. Nous pouvons tout d'abord souligner que les concentrations moyennes en glycogène déterminées chez les groupes témoins ( $69,9 \pm 23,1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissus frais pour les femelles et  $74,5 \pm 49,7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$  tissus frais pour les mâles) sont importantes par rapport aux concentrations déjà rapportées chez les

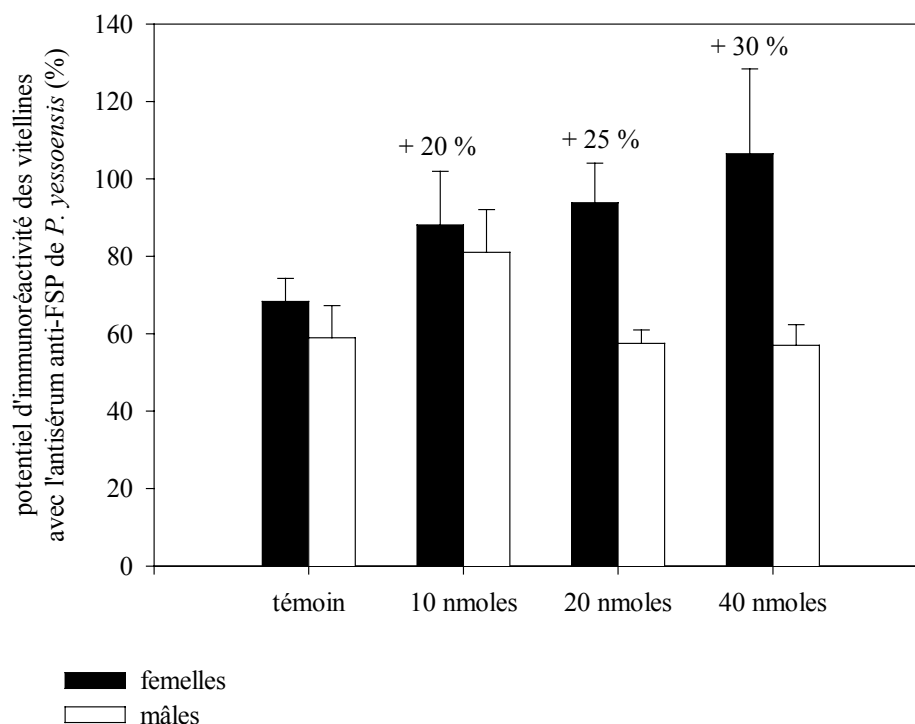


**Figure 5-1:** a) Concentrations moyennes en glycogène ( $\pm$  erreur type) et b) Activité moyenne de la glycogène phosphorylase ( $\pm$  erreur type) dans la gonade des myes mâles et femelles témoins et exposées au  $17\beta$ -œstradiol.

myes durant la même période de l'année (Gauthier-Clerc *et al.*, 2002). Ces concentrations en glycogène témoignent d'une quantité de réserves énergétiques importante et apte à soutenir le développement des gamètes. Malgré l'exposition des myes au  $17\beta$ -œstradiol, la quantité de glycogène n'est pas différente entre les différents groupes. L'activité de la glycogène phosphorylase présentée à la figure 5-3 b) augmente cependant chez les groupes exposés au  $17\beta$ -œstradiol. Pour les groupes témoins sa valeur moyenne ( $\pm$  erreur-type) est de  $2,1 \pm 0,27 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  protéines chez les femelles et  $1,8 \pm 0,28 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  chez les mâles mais elle augmente de 36 % chez les mâles exposés à 10 nmoles, de 25 et 12 % chez les mâles et femelles exposés à 20 nmoles et enfin de 56 et 25 % chez les mâles et femelles exposés à 40 nmoles. Cette activité que nous avons dosée en présence d'AMP correspond à l'activité totale de la glycogène phosphorylase présente dans la gonade, la forme b inactive ayant été activée sous sa forme a en présence de l'AMP. Ces résultats montrent donc bien une réelle augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase provoquée par une augmentation de la quantité d'enzyme et non pas d'un changement dans le rapport [forme activée de l'enzyme/forme inactive de l'enzyme] comme cela a pu être observé chez la plie exposée au  $17\beta$ -œstradiol (Petersen *et al.*, 1983). Le fait que l'augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase chez les myes exposées au  $17\beta$ -œstradiol ne soit pas accompagnée par une diminution de la quantité du glycogène pourrait s'expliquer par le fait que la phosphorylase n'est capable d'hydrolyser le glycogène qu'à ses extrémités non réductrices. Son activité est donc effective mais si l'ensemble des enzymes responsables de l'hydrolyse du glycogène (phosphorylases *a* et *b*, transférases et glucosidases) ne sont pas activées, la dégradation du glycogène n'est peut être pas suffisante pour être détectée. Nous pouvons également penser que cette augmentation de la glycogène

phosphorylase succède en fait à l'induction de la voie glycolytique pour fournir l'énergie nécessaire à la vitellogenèse. Petersen *et al.* 1983 ont montré chez le Flet *Platichthys flesus* L. qu'une exposition répétée à une dose de 100 µg de E2 pouvait augmenter l'activité de la glucose-6-phosphate (G6P) déshydrogénase. Sand *et al.* (1980) ont également rapporté pour la même espèce exposée que l'activité de la pyruvate kinase était inductible par E2 alors que celle de la glycogène phosphorylase ne variait pas. Chez *Mytilus edulis*, San Juan Serrano *et al.* (1998) ont montré que le glucose-6-phosphate (et non pas le glucose) était le principal régulateur de la glycogène phosphorylase b dans le manteau. Si tel était le cas chez la mye, il est possible que l'exposition au 17β-œstradiol ait d'abord induit une augmentation de la glucose 6-phosphate déshydrogénase et que la diminution subséquente du G6P circulant ait permis dans un second temps la levée de l'inhibition de la glycogène phosphorylase b. Dans ce cas, la quantité de glycogène dégradée au bout de nos 48 h d'exposition pourrait encore être insuffisante pour être détectée par notre technique de dosage. Enfin, nous pouvons noter que l'augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase est effective pour les deux sexes ce qui révèle probablement une similitude de l'effet induit par l'exposition et/ou une similitude des mécanismes de régulation de cette enzyme chez les mâles et les femelles. Cette similitude serait d'ailleurs en accord avec l'augmentation des concentrations en sucre détectées chez les mâles et les femelles *Elliptio complanata* exposés à des effluents œstrogéniques (Gagné *et al.*, 2001a).

Bien que nous ne détectons pas une diminution de la quantité de glycogène dans la gonade des myes exposées au 17β-œstradiol (E2), la figure 5-4 montre une augmentation du potentiel d'immunoréactivité des protéines de type vitelline dans la



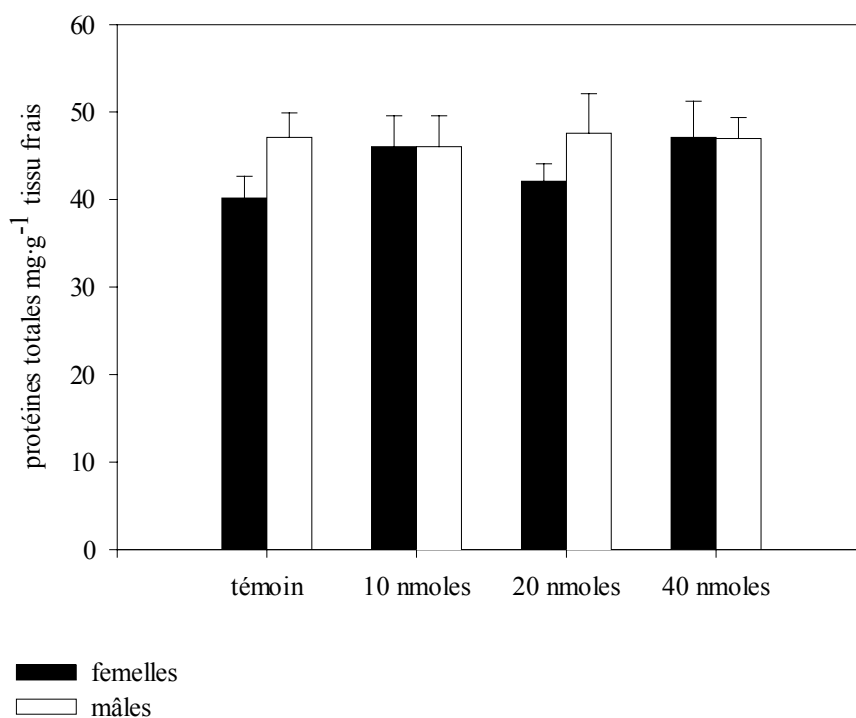
**Figure 5-2:** Potentiel d'immunoréactivité moyen ( $\pm$  erreur type) des vitellines dans les gonades des myes mâles et femelles témoins et exposées au  $17\beta$ -œstradiol.

*Légende:* "\*" indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les mâles et les femelles du même groupe.

gonade des femelles. Cette augmentation représente 20 % pour la dose la plus faible en E2 mais 25 % pour les femelles exposées à 20 nmoles de E2 et enfin près de 30 % pour le groupe exposé à 40 nmoles de E2. La réaction croisée entre l'antisérum et les constituants de la gonade semble une nouvelle fois montrer que l'antisérum reconnaît une protéine spécifique aux femelles de myes bien que le manque de spécificité de l'antisérum pour cette protéine entraîne la détection d'un signal chez les mâles. Contrairement aux résultats obtenus chez les poissons avec une induction de la synthèse de vitellogénine dans le foie des deux sexes, nos résultats ne révèlent aucune



augmentation de l'immunoréactivité avec l'anticorps chez les mâles. Bien que l'analyse multivariées (sexe, dose et expérience) ne mettent pas en évidence d'effet significatif de l'exposition sur le potentiel d'immunoréactivité des myes, la réalisation d'un test t entre les résultats obtenus chez les mâles et les femelles exposés à 20 et 40 nmoles de E2 montre que cette immunoréactivité est significativement plus élevée chez les femelles que chez les mâles. La durée de l'exposition n'a peut-être pas été assez longue pour observer une quelconque augmentation chez les mâles. Gagné *et al.* (2001a) ont en effet montré l'augmentation des protéines de type vitellogénine chez les femelles et les mâles *Elliptio complanata* exposés à des effluents œstrogéniques. Cette quantité de protéines de type vitellogénine était cependant plus faible chez les mâles ce qui pourrait résulter d'une induction plus tardive que chez les femelles. L'apparente induction que nous observons chez les femelles corrobore malgré tout les résultats de Blaise *et al.* (1999). Nous n'observons pas non plus d'augmentation de la concentration en protéines totales de la gonade comme le montre la figure 5-5. Dans le chapitre 3, nous avons déjà rapporté le manque de corrélation entre les concentrations en protéines dans la gonade des myes et l'immunoréactivité des vitellines avec l'antisérum anti-FSP de *P. yessoensis*. Ces résultats sont d'ailleurs similaires au manque de corrélation entre les concentrations en protéines totales et celles en protéines de type vitellogénine observé par Blaise *et al.* (1999) chez *Mya arenaria* et Gagné *et al.* (2001a) chez *Elliptio complanata*. Ce constat tend une nouvelle fois à montrer qu'un stock de protéines pourrait déjà être présent chez la mye et la moule d'eau douce et que l'augmentation de la voie de la glycolyse et de la glycogénolyse sous l'induction du  $17\beta$ -œstradiol pourrait résulter de l'existence d'un processus de glycosylation de ces protéines. Notons que comme chez les vertébrés ovipares une phosphorylation doit également être effective puisque la technique de



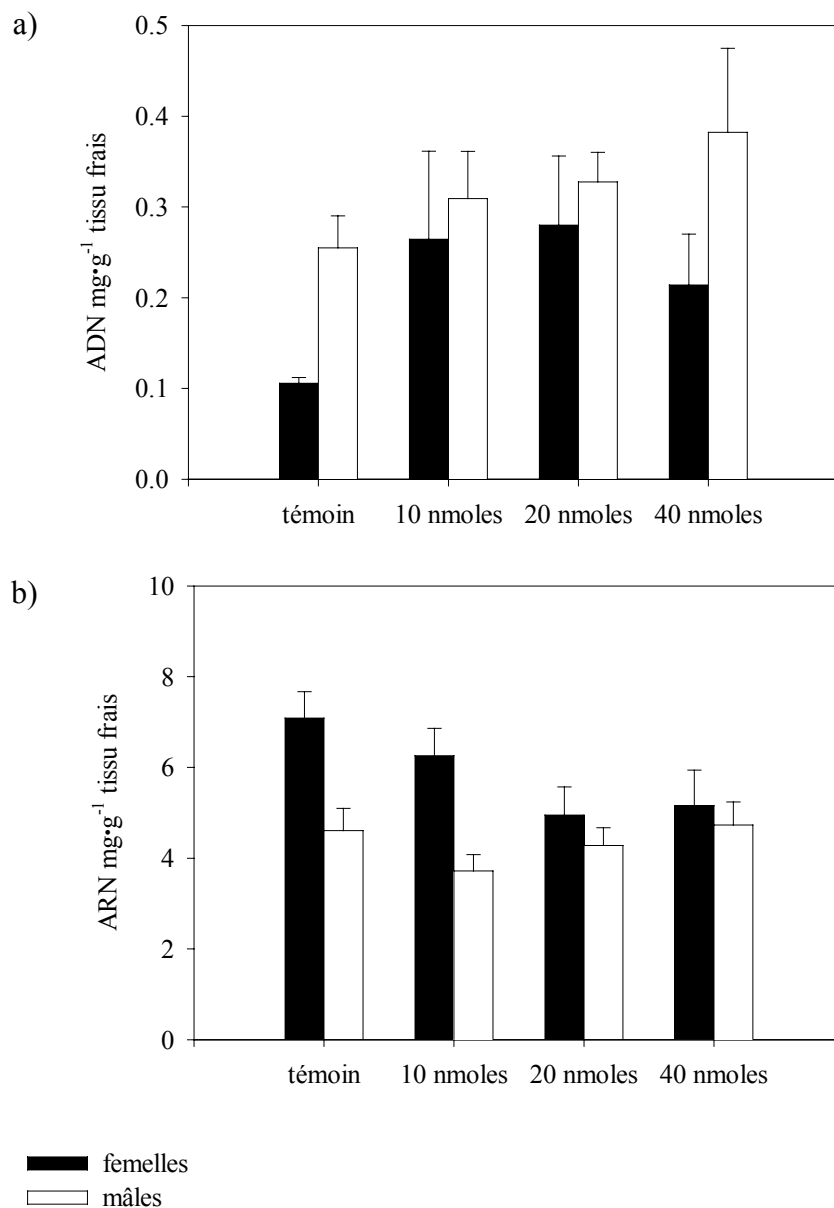
**Figure 5-3:** Concentrations moyennes ( $\pm$  erreur type) en protéines dans les gonades des myes mâles et femelles témoins et exposées au  $17\beta$ -œstradiol.

dosage de Blaise *et al.* (1999) et Gagné *et al.* (2001a) détermine la quantité de phosphate labile en milieu alcalin et lié aux protéines de type vitellogénine dont la concentration augmente lors d'une exposition à l'œstradiol. Ces deux processus de glycosylation et de phosphorylation sont en effet présents chez les vertébrés ovipares et participent à la synthèse de la vitellogénine (Gottlieb & Wallace, 1981, 1982). L'existence de ces deux processus chez la mye durant la synthèse de protéines de type vitelline pourrait d'ailleurs expliquer l'augmentation de la quantité de protéines de très grande masse moléculaire ( $> 400$  kDa) dans les gonades de femelles comme cela a pu être observé avec l'électrophorèse de la fraction S15 présentée au chapitre 3 (figure 3-9). Ces transformations biochimiques de protéines déjà présentes dans la gonade des myes

au début du cycle de reproduction démontreraient la présence d'une véritable hétérosynthèse de vitellines chez *Mya arenaria* comme nous le suggérons au chapitre 3.

### **5.3.3. Effet de l'exposition des myes au 17 $\beta$ -œstradiol sur l'activité synthétique de la gonade**

La figure 5-6 présente les concentrations moyennes en ADN (figure 5-6a) et en ARN (figure 5-6b) dans la gonade des myes témoins et exposées. La différence significative entre les concentrations en ADN dans les gonades des témoins mâles et femelles s'explique aisément par le nombre de gamètes plus important chez les mâles comme nous l'avons déjà observé au cours de la gamétogenèse et mentionné au chapitre 4. Une certaine augmentation des concentrations en ADN apparaît chez les individus exposés au 17 $\beta$ -œstradiol bien qu'elle ne soit pas significative. Cette augmentation est plus importante chez les femelles. Cette différence entre les deux sexes pourrait révéler une sensibilité plus grande des femelles au E2. Cette plus grande sensibilité pourrait cependant être la simple conséquence d'un nombre plus grand de récepteurs œstrogéniques chez les femelles. L'exposition des myes au 17 $\beta$ -œstradiol a en effet été réalisée en septembre et la majorité des myes devait alors être aux stades pré-vitellogénique et vitellogénique pour les femelles et aux stades d1 et d2 pour les mâles d'après les suivis saisonniers de la gamétogenèse chez les femelles (figure 3-4) et les mâles (figure 5-2). Hors, nous avons montré dans le chapitre précédent que la concentration en 17 $\beta$ -œstradiol est plus importante chez les femelles que chez les mâles au début du développement des gamètes (stades pré-vitellogénique et vitellogénique pour les femelles et stades d1 et d2 pour les mâles)(figure 4-6). Le nombre de récepteurs



**Figure 5-1:** Concentrations moyennes ( $\pm$  erreur type) a) en ADN et b) en ARN dans les gonades des myes mâles et femelles témoins et exposés au  $17\beta$ -œstradiol.

œstrogéniques des gonades de femelles doit donc être supérieur à celui des gonades de mâles pour ces stades. Dans ce cas, nous pouvons donc penser que le nombre de récepteurs œstrogéniques était effectivement plus important dans la gonade des femelles

que dans celles des mâles durant l'exposition au  $17\beta$ -œstradiol. Ceci peut alors expliquer une plus grande sensibilité des femelles au E2 et des effets plus importants induits par l'exposition bien que les mécanismes de régulation mis en jeu par le  $17\beta$ -œstradiol puissent être les mêmes pour les deux sexes. Cette plus grande sensibilité des femelles vis à vis des œstrogènes a également été rapportée chez *Elliptio complanata* (Gagné *et al.*, 2001a). Bien que les concentrations en ADN montrent une sensibilité des myes au  $17\beta$ -œstradiol, les concentrations en ARN n'ont pas varié au cours de l'exposition. Ceci est contraire aux observations réalisées chez les poissons dont les synthèses protéiques sont induites (Emmersen *et al.*, 1979; Haux & Norberg, 1985). Chez l'étoile de mer, l'augmentation des concentrations en ARN observée dans le cœlome pylorique exposé *in vitro* à du  $17\beta$ -œstradiol n'a cependant pas été confirmée durant une exposition *in vivo* (Van der Plas *et al.*, 1982). Chez les myes exposées au  $17\beta$ -œstradiol l'absence d'une augmentation de l'activité synthétique est cependant cohérente avec l'absence d'induction de synthèse protéique. Cela n'exclut pas que le  $17\beta$ -œstradiol ait pu induire des changements métaboliques n'impliquant pas de contrôle génomique comme cela a déjà été évoqué par Gagné *et al.* (2001a) chez le mâle *Elliptio complanata* exposés à des effluents œstrogéniques.

#### **5.4. CONCLUSION**

L'exposition des myes au  $17\beta$ -œstradiol a principalement induit des effets chez les femelles *Mya arenaria* avec l'augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase et du potentiel d'immunoréactivité des vitellines avec l'antisérum anti-FSP de pétoncle. Les 48h d'exposition des myes au E2 ont probablement été trop courtes pour que nous observions des variations significatives plus nombreuses tout comme une diminution

des réserves en glycogène. Nos observations concordent cependant avec l'augmentation de la glycogénolyse observée par Mori (1980) chez *Crassostrea gigas* exposée *in vivo* au E2 et l'augmentation des concentrations en protéines de type vitellogénine dans l'hémolymphe des myes exposées à divers œstrogènes (Blaise *et al.*, 1999) ou encore celle des vitellines chez le pétoncle *Patinopecten yessoensis* (Li *et al.*, 1998) exposés *in vivo* au E2. Ces effets du 17 $\beta$ -œstradiol observés sur la mobilisation des réserves en glycogène et la synthèse de protéines de réserve de bivalves exposés à des œstrogènes ne décrivent cependant pas son mode d'action. Le 17 $\beta$ -œstradiol pourrait interagir avec d'autres types d'hormones comme les neurosécrétions impliquées dans la mobilisation du glycogène (Lubet *et al.*, 1987; Lubet & Mathieu, 1990; Robbins *et al.*, 1990a, 1991) ou encore les hormones capables d'induire la synthèse d'ADN identifiées chez *Crassostrea gigas* (Pazos & Mathieu, 1999). Nos résultats suggèrent cependant que la sensibilité des femelles au 17 $\beta$ -œstradiol est plus importante que celle des mâles. Un nombre plus important de sites de liaison spécifique avec le 17 $\beta$ -œstradiol pourrait en être la cause puisque la présence de tels sites de liaison a déjà été mise en évidence dans la gonade des myes par Gagné *et al.* (2003). L'absence d'une augmentation du potentiel d'immunoréactivité des gonades mâles avec antisérum anti-FSP de *P. yessoensis* suggère également que l'antisérum ne reconnaît que des protéines spécifiques aux femelles *Mya arenaria* dont la synthèse est inductible par les œstrogènes. Cette hypothèse concorde avec les résultats du chapitre 2 mais ne pourra être confirmée que lorsque nous serons capables d'isoler une ou des protéines présentes exclusivement chez les femelles durant la vitellogenèse dont la synthèse est inductible par les œstrogènes.

Dans le but d'isoler et de purifier ce ou ces protéines de type vitelline(s) nous avons réalisé trois autres séries d'expositions *in vivo* de myes au  $17\beta$ -œstradiol. Ces expositions ont été réalisées avec différents groupes exposés à différentes doses de E2 et sur différentes périodes de temps. Notre but était d'optimiser les conditions expérimentales pour que les myes synthétisent des protéines de type vitelline inductibles par le E2. Toutes les conditions expérimentales de ces expositions figurent en annexe 1. Toutes les myes exposées au  $17\beta$ -œstradiol ont été sexées mais aucune protéine inductible par le  $17\beta$ -œstradiol n'a pour l'instant été isolée chez les femelles. L'utilisation de l'antisérum anti-FSP de pétoncle pourrait nous aider à visualiser sur le gel d'électrophorèse les protéines de type vitelline induites chez la mye.

## **CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES**



Durant ce travail de thèse, nous avons tout d'abord examiné l'activité synthétique de la gonade des myes au cours de la gamétogenèse en nous attardant plus spécialement sur l'activité vitellogénique chez les femelles. Cette approche écophysiologique de la gamétogenèse des myes nous a permis de montrer qu'il était possible de décrire avec plus d'acuité que les études rapportées jusqu'alors, le développement des gamètes. Chez les femelles, une séquence vitellogénique traduit de manière significative l'accroissement du diamètre des ovocytes. Trois classes de taille distinctes du diamètre moyen des ovocytes permettent de classer les femelles au stade pré-vitellogénique (diamètre  $< 20 \mu\text{m}$ ), au stade vitellogénique ( $20 \mu\text{m} < \text{diamètre moyen des ovocytes} < 40 \mu\text{m}$ ) ou au stade post-vitellogénique ( $40 \mu\text{m} < \text{diamètre moyen des ovocytes}$ ) durant la maturation de la gonade. Une telle mesure du diamètre moyen des ovocytes représente donc un moyen pertinent d'évaluer le degré de la maturation sexuelle des myes femelles tout comme Lango-Reynoso *et al.* (2000) ont déjà pu le préconiser chez les femelles de *Crassostrea gigas*. Chez les mâles, deux stades de développement (d1 et d2) ont également été distingués selon que les spermatogonies sont les seuls gamètes visibles ou que les spermatocytes ont déjà débuté leur migration vers le centre de l'alvéole. L'augmentation des concentrations en ADN et en ARN dans les gonades en développement démontre que chacun de ces stades de développement est représentatif d'une activité synthétique distincte et croissante chez les deux sexes. De tels dosages en acides nucléiques n'avaient encore jamais été entrepris dans la gonade de myes, mais ces observations montrent que le dosage dans la gonade des concentrations en ADN et plus particulièrement en ARN, représente un intérêt certain pour rendre compte de l'avancement de la gamétogenèse durant un suivi saisonnier chez *Mya arenaria*. La corrélation entre les concentrations en ARN et le

diamètre moyen des ovocytes chez les femelles est d'ailleurs la plus significative ( $R=0,75$ ;  $p<0,05$ ). A la suite de cette description histologique et biochimique de la gamétogenèse des mâles et des femelles *Mya arenaria*, nous avons réalisé le dosage de la testostérone et du  $17\beta$ -œstradiol dans la gonade tout au long de la gamétogenèse. Ces deux hormones sont présentes dans la gonade à des concentrations de l'ordre du  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissu frais alors que les concentrations en progestérone rapportées par Siah *et al.* (2002; 2003) sont de l'ordre du  $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  de tissu. Les concentrations en E2 sont près de 10 fois supérieures à celles en T mais elles restent du même ordre de grandeur chez les deux sexes au cours de la gamétogenèse. Ces données sont les premières à rapporter des concentrations en T et E2 chez *Mya arenaria* durant la gamétogenèse et pour une aussi longue période de temps chez un bivalve. Les concentrations en E2 n'augmentent pas significativement durant la vitellogenèse mais l'exposition des myes à différentes doses de  $17\beta$ -œstradiol a permis de montrer que cette hormone induisait une augmentation de l'activité de la glycogène phosphorylase, ce qui laisse présager de son implication dans le contrôle de la mobilisation des réserves énergétiques dans un processus de maturation de la gonade comme cela a été observé chez *Crassostrea gigas* (Mori *et al.*, 1980) et *Patinopecten yessoensis* (Li *et al.*, 1998). L'exposition de 48 h au  $17\beta$ -œstradiol a cependant été trop courte pour observer une diminution de la concentration en glycogène et l'augmentation de l'activité synthétique de la gonade.

L'utilisation de l'antisérum anti-FSP de *Patinopecten yessoensis* durant le suivi de la gamétogenèse et l'exposition au  $17\beta$ -œstradiol nous a permis d'observer une réaction croisée avec la gonade des myes femelles. Cette réaction croisée reflète chez les femelles la présence de protéine(s) de type vitelline apparentée(s) à celles du pédoncle

tout comme Osada *et al.* (1992) ont déjà pu le rapporter chez *Mytilus edulis* et *Chlamys farreri nipponensis*. L'antisérum semble cependant reconnaître un précurseur de vitelline chez *Mya arenaria*, présent au début du développement de la gonade (stade pré-vitellogénique). Cette observation nous conduit d'ailleurs à formuler l'hypothèse de la présence d'un précurseur de type vitellogénine synthétisé dans les cellules folliculaires. Cette (ou ces protéines) reconnue par l'antisérum de pétoncle a également été induite par l'exposition des myes au  $17\beta$ -œstradiol. Ce résultat est des plus encourageant pour confirmer la pertinence de l'utilisation potentielle des protéines de type vitelline chez *Mya arenaria* comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes au même titre que la vitellogénine chez les poissons. Comme nous l'avons proposé au chapitre 3, l'utilisation de billes de Séphadex nous permettrait d'isoler la ou les protéines reconnues par l'antisérum anti-FSP de *Patinopecten yessoensis* et de caractériser le degré de spécificité de l'antisérum vis à vis des protéines de *Mya arenaria*. Afin de disposer d'un antisérum spécifique aux vitellines de myes dont la synthèse est inductible par le  $17\beta$ -œstradiol, nous ne pourrions cependant nous contenter de l'antisérum anti-FSP de pétoncle. Nous devons isoler cette ou ces protéines de type vitelline chez des myes exposées au  $17\beta$ -œstradiol. Les différentes expositions de myes au  $17\beta$ -œstradiol mentionnées à la fin du chapitre 5 et décrites dans l'annexe 3 ne nous ont pas pour l'instant permis d'aboutir dans ce projet. Le principe de l'isolement de vitellines induites par le  $17\beta$ -œstradiol reste cependant indispensable dans la perspective de produire un antisérum qui nous permette de mettre en évidence leur induction avec un dosage par ELISA chez les myes exposées à des xéno-œstrogènes. L'isolement et la purification des protéines reconnues par l'antisérum anti-FSP de pétoncle et des vitellines spécifiques à *Mya arenaria* nous permettraient également de caractériser leur

masse moléculaire tout comme leur composition biochimique. Les vitellines sont des lipoprotéines, mais les travaux de Blaise *et al.* (1999) ont montré qu'une (ou plusieurs) protéine phosphorylée de type vitellogénine est présente chez la mye et inductible par les œstrogènes. La ou les vitellines de myes pourraient donc être des lipoglycophosphoprotéines ou des lipophosphoprotéines comparables à la phosvitine des vertébrés ovipares (figure 2-9 du chapitre 2). La production d'un antisérum spécifique aux vitellines de *Mya arenaria* nous permettrait alors de visualiser leur lieu de synthèse avec des techniques immunohistologiques. En revanche, si les protéines reconnues par l'antisérum de pétoncles sont différentes des vitellines isolées dans la gonade, elles pourraient effectivement être des précurseurs de ces vitellines. De plus, si le lieu de synthèse des vitellines de *Mya arenaria* est l'ovocyte alors que les protéines reconnues par l'antisérum de pétoncle se trouvent dans les cellules folliculaires, ces observations seraient des arguments supplémentaires pour justifier l'existence d'une hétérosynthèse de vitellines chez *Mya arenaria* tel que nous le suggérons au chapitre 3. Osada *et al.* (2003) privilégient d'ailleurs l'existence d'un tel processus hétérosynthétique dans les cellules auxiliaires proches des ovocytes de *Patinopecten yessoensis* grâce à l'utilisation de l'antisérum anti-FSP lors d'une étude immunohistologique. La démonstration d'un processus hétérosynthétique et/ou autosynthétique des protéines dans la gonade des myes pourrait également être entreprise en incubant des cultures d'ovocytes avec de la leucine tritiée. Cette dernière serait en effet incorporée par les ovocytes si ceux-ci ont une capacité synthétique (autosynthétique). Une autoradiographie des ovocytes permettrait aussi de visualiser en leur sein les protéines synthétisées. Une telle expérience a déjà été réalisée avec l'écrevisse *Orconectes immunis* par Ganion & Kessel (1972). La confirmation de cette

capacité d'autosynthèse de protéines des ovocytes serait d'ailleurs définitive en vérifiant son inhibition en présence de cycloheximide. L'induction de la synthèse de protéines par le 17 $\beta$ -œstradiol pourrait également être confirmée avec ce type d'incubation de culture d'ovocytes en présence de la leucine tritiée ou même dans l'organisme entier. Coupler cette approche cellulaire avec une étude immunohistochimique de coupes de gonades des mêmes individus en utilisant un anticorps anti-vitelline ne laisserait plus aucun doute quand à la capacité autosynthétique des ovocytes et du rôle du 17 $\beta$ -œstradiol dans l'induction de la synthèse de vitellines. D'autre part, si le 17 $\beta$ -œstradiol induit la synthèse de protéines au sein des cellules folliculaires, l'autoradiographie de coupes de gonades nous le confirmerait également avec l'utilisation de la leucine tritiée et l'existence d'une hétérosynthèse serait alors indéniable. Enfin, compte tenu du caractère lipidique des vitellines, ces protéines sont susceptibles de se lier à des contaminants lipophiles et de les transférer en grande partie au futur embryon comme le suggèrent Lee & None (1995) et Oberdörster *et al.* (2000) chez les crustacés. Le développement d'un anticorps anti-vitelline permettrait alors d'étudier le rôle de ces protéines d'un point de vue toxicologique dans le cadre d'une étude mécanistique de transfert de contaminants au sein même des myes.

Le dosage par ELISA de vitellines chez les femelles *Mya arenaria* permettrait de développer de nombreux outils pour l'étude de la reproduction d'un point de vue écophysiological. L'une des premières applications les plus simples serait de développer un indice gonado-somatique (IGS) avec une approche quantitative du potentiel reproducteur des bivalves. A ce jour le calcul traditionnel de cet indice (masse de la gonade/masse totale de chair fraîche) ne permet pas d'observer chez la mye des variations importantes au cours de la gamétogenèse. La gonade est un site de stockage

de réserves énergétiques important alors bien que son volume et sa texture changent au cours de la gamétogenèse, sa masse ne varie pas de manière importante. De plus, contrairement aux huîtres ou aux moules, les myes sont des organismes endobentiques. La présence de particules sédimentaires dans leur appareil digestif et en particulier dans le siphon, introduit un certain biais dans la mesure de la masse réelle de chair humide. Ce biais peut d'ailleurs varier d'un site d'échantillonnage à l'autre ou même d'un niveau de plage à un autre sur une même zone intertidale dépendamment de la nature sablo-vaseuse de la matrice sédimentaire. Hawkins & Rowell (1987) préconise d'ailleurs de "purger" les myes pour minimiser ce biais pour le calcul d'indice de condition, mais le stress induit par une telle pratique ne nous permet pas de l'appliquer sur des individus devant faire l'objet d'une étude biochimique ou encore d'un diagnostic immunologique. Choi *et al.* (1993) et Kang *et al.* (2003) ont d'ores et déjà isolé des protéines spécifiques aux ovocytes pour produire un anticorps spécifique chez *Crassostrea virginica* et *Crassostrea gigas* respectivement. Ces auteurs n'ont pas caractérisé la nature de ces protéines mais leur dosage par ELISA avec une gamme standard pour différentes quantités d'ovocytes, dont elles contribuent pour 40 % du poids, permet de quantifier la masse totale des ovocytes dans les gonades. Choi *et al.* (1993) ont aussi appliqué cette méthode avec les protéines spécifiques des spermatozoïdes pour évaluer leur quantité totale dans la gonade. Une telle évaluation "biochimique" de la masse totale des gamètes permet de calculer un indice gonado-somatique en terme de masse d'ovocytes ou de spermatozoïdes/masse de la gonade. Cet IGS permet également de s'affranchir du biais que peut introduire la présence d'un bloom phytoplanctonique en milieu naturel. Ce dernier peut en effet entraîner l'augmentation de la masse de la chair totale, et donc la diminution de l'IGS, alors que la masse des œufs n'est pas nécessairement différente

avant et après le bloom. D'autre part, un tel dosage des protéines ovocytaires permettrait d'estimer la fécondité des femelles en divisant le nombre d'œufs à maturité (calculé à partir de leur masse) par le poids moyen d'un œuf. Enfin, il a été montré par différents auteurs que les variations de température accélèrent ou retardent le taux de développement de la gonade alors que la quantité et la qualité de la nourriture détermine la quantité et la qualité des gamètes des bivalves (Napolitano *et al.*, 1992; Ruiz *et al.* 1992; Pazos *et al.*, 1996). De plus, il est reconnu que la qualité des œufs prédétermine le taux d'éclosion et la survie des larves (Gallager & Mann, 1986; Massapina *et al.*, 1999). Avec un dosage par ELISA des vitellines de *Mya arenaria* nous pourrions alors évaluer de manière qualitative leur potentiel reproducteur. Une application directe de ce diagnostic dans le domaine de l'aquaculture serait de choisir un site de prélèvement d'adultes ayant des œufs de bonne qualité avec une quantité optimale de vitellines et donc un fort potentiel reproducteur pour des écloséries. La qualité et la quantité nutritionnelle d'un site naturel d'élevage offrant un fort potentiel de croissance ainsi qu'un bon potentiel de maintien du stock avec des organismes ayant un fort potentiel reproducteur, pourrait également être sélectionné en évaluant la qualité et la quantité des œufs des organismes. Lubet & Mathieu (1999) ont répertorié les connaissances actuelles sur la biologie des mollusques bivalves applicables en aquaculture. Le dosage des vitellines n'en fait pas encore partie, mais l'importance physiologique des vitellines pour décrire la qualité des œufs nécessaire au bon développement des larves d'une part, et la spécificité et la sensibilité de leur dosage par ELISA d'autre part, ne font nul doute que les vitellines pourraient faire l'objet de nouveaux développements en aquaculture. Enfin si leur inductibilité par le  $17\beta$ -œstradiol est confirmée, elles pourraient être utilisées en

écotoxicologie comme biomarqueur d'exposition aux xéno-œstrogènes au même titre que la vitellogénine chez les poissons.

La présence de testostérone et de  $17\beta$ -œstradiol dans la gonade des myes montre que ces deux hormones doivent remplir une fonction physiologique au cours de la reproduction et potentiellement comparable chez les deux sexes puisque leurs concentrations y sont comparables durant la gamétogenèse. La concentration en  $17\beta$ -œstradiol augmente au début du développement et au moment de la ponte mais les concentrations en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone ne varient pas de manière importante durant la gamétogenèse. Contrairement aux profils de concentrations en progestérone chez *Mytilus edulis* (Reis-Henriques & Coimbra, 1990) ou en  $17\beta$ -œstradiol et en testostérone chez *Elliptio buckleyi* (Gross *et al.*, 2003) durant la gamétogenèse, nous ne pouvons pas déduire le sexe ou le stade de développement de la gonade des myes en fonction des concentrations en hormones stéroïdiennes. Si le  $17\beta$ -œstradiol et la testostérone participent à la régulation de la reproduction, leur rôle respectif pourrait être indirect en régulant l'action d'autres hormones telles que les catécholamines ou les prostaglandines comme nous le proposons dans le chapitre 3. Des études seraient donc nécessaires pour comprendre les interactions de ces différentes hormones durant la reproduction, que ce soit pour réguler la mobilisation des réserves énergétiques ou contrôler la multiplication des gamètes. Toutefois, si les hormones stéroïdiennes participent de manière significative à la régulation de la maturation de la gonade chez les bivalves, elles pourraient être utilisées en aquaculture comme outil de contrôle de la maturation dans des écloséries tout comme le suggère Mathieu *et al* (1991) pour les



neurotransmetteurs. L'exposition des myes au  $17\beta$ -œstradiol tend en effet à montrer qu'il induit la mobilisation du glycogène via la glycogène phosphorylase et la synthèse de protéines de type vitellines reconnues par antisérum anti-FSP de pétoncle. Ces résultats sont compatibles avec l'induction de la synthèse de vitellines chez *Crassostrea gigas* exposée au  $17\beta$ -œstradiol (Li *et al.*, 1998) mais dans les deux cas il est difficile de savoir si l'induction de la synthèse de vitelline précède la mobilisation des réserves énergétiques ou si l'induction des enzymes de la glycogénolyse et même celles de la lipogénèse permettent la synthèse de ces lipoprotéines. Ghosh & Ray (1994) ont en effet observé une induction de l'activité lipogénique dans la gonade de la crevette *Macrobrachium rosenbergii* exposée au  $17\beta$ -œstradiol tout comme chez le poisson où la lipogénèse augmente dans le foie des individus exposés au  $17\beta$ -œstradiol (De Vlaming *et al.*, 1977). Une des façons de vérifier si le  $17\beta$ -œstradiol contrôle l'activité des enzymes de la lipogénèse (comme la glucose-6-phosphate déshydrogénase) et celle de la glycogénolyse serait d'exposer un groupe d'individus à du  $17\beta$ -œstradiol et un deuxième groupe à la même dose de  $17\beta$ -œstradiol mais en présence d'un anti-œstrogène comme le Tamoxifen. Si l'augmentation de l'activité des enzymes est effective dans le premier groupe mais pas dans le deuxième nous pourrions alors déduire que le  $17\beta$ -œstradiol agit sur le contrôle de ces activités. Ce résultat n'exclurait pas pour autant le fait que le  $17\beta$ -œstradiol puisse aussi agir sur l'induction de la synthèse de vitellines mais dans ce cas l'induction du gène codant pour ce ou ces protéines et l'augmentation de la quantité de leur ARN messenger devront être vérifiées.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbott, R.T., 1968. Guide des coquillages de l'Amérique du nord. Broquet M. (Ed.), La Prairie, Québec (Canada), 288p.
- Albertini, L., 1985. Recherches cytologiques et expérimentales sur l'ovogénèse. Thèse de doctorat de Université de Caen, 125p.
- Allen, W.V. & Conley, H., 1982. Transport of lipids in the blood of the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 71B(2): 201-207.
- Allen, Y., Scott, A.P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J.E. & Feist, S., 1999. Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(8): 1791-1800.
- Arnold, S.F., Klotz, D.M., Collins, B.M., Vonier, P.M., Guillette Jr, L.J. & McLachlan, J.A., 1996. Synergistic activation of estrogen receptor with combination of environmental chemicals. *Science*, 272(5267): 1489-1492.
- Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T. & Goksoyr, A., 1998. Plasma levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-nonylphenol and *o,p'*-DDT treated juvenile atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Environmental Research*, 46(1-5): 133-136.
- Ashfield, L., Pottinger, T.G. & Sumpter, J.P., 1998. Exposure of female juvenile rainbow trout to alkylphenol compounds results in modifications to growth and ovosomatic index. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(3): 679-686.
- Baranyi, I.B. & Salanki, J., 1967. Changes in the secretory activity of the central nervous system of *Anodonta cygnea* upon the action of chemical agents. *Acta Biologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 18(2): 93-103.
- Baranyi, I.B., 1973. A tavikagylo (*Anodonta cygnea* L.) neuroszekrecios tevekenysegenek elektronmikroskopos vizsgala osztradiolpropionat hatasara. *Biologi Kozl.*, 21: 27-30.

- Barber, B.J. & Blake, N.J., 1981. Energy storage and utilization in relation to gametogenesis in *Argopecten irradians concentricus* (Say). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 52(2-3): 121-134.
- Bayne, B.L., 1976. Aspects of reproduction in bivalve molluscs. Dans M. Wiley (Ed.), *Estuarine processes*, NY (USA), pp. 432-448.
- Bechmann, R.K., 1999. Effect of the endocrine disruptor nonylphenol on the marine copepod *Tisbe battagliai*. *The Science of the Total Environment*, 233(1-3): 33-46.
- Bennett, E.R. & Metcalfe, C.D., 2000. Distribution of degradation products of alkylphenol ethoxylates near sewage treatment plants in the lower great lakes, North America. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(4): 784-792.
- Bennie, D.T., Sullivan, C.A., Lee, H.B., Peart, T.E. & Maguire, R.J., 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes and the upper St. Lawrence River. *The Science of the Total Environment*, 193(3): 263-275.
- Bettin, C., Oehlmann, J. & Stroben, E., 1996. TBT-induced imposex in marine neogasteropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 50(3): 299-317.
- Billinghurst, Z., Clare, A.S., Fileman, T., McEvoy, J., Readman, J. & Depledge, M.H., 1998. Inhibition of barnacle settlement by the environmental oestrogen 4-nonylphenol and the natural oestrogen 17 $\beta$ -oestradiol. *Marine Pollution Bulletin*, 36(10): 833-839.
- Billinghurst, Z., Clare, A.S., Matsumura, K. & Depledge, M.H., 2000. Induction of cypris major protein in barnacle larvae by exposure to 4-n-nonylphenol and 17 $\beta$ -oestradiol. *Aquatic Toxicology*, 47(3-4): 203-212.
- Black, D.E., Gutjahr-Gobell, R., Prudell, R.J., Bergen, B., Mills, L. & McElroy, A.E., 1998. Reproduction and polychlorinated biphenyls in *Fundulus heteroclitus*

- (Linnaeus) from new Bedford harbor, Massachusetts, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(7): 1405-1414.
- Blackburn, M.A., Kirby, S.J. & Wal, M.J., 1999. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK. *Marine Pollution Bulletin*, 38(2): 109-118.
- Blaise C., Pellerin-Massicotte J. & Hansen, P.D., 1996. Molluscan shellfish biomarker study of the Saguenay Fjord, Québec, Canada. Fourth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety, Metz, France, 25-28 August, abstract C41.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J. & Hansen, P.D., 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environmental Toxicology*, 14(5): 455-465.
- Botticelli, C.R., Hisaw, F.L. & Wotiz, H.H., 1961. Estrogens and progesterone in the sea urchin (*Strongylocentrotus franciscanus*) and Pecten (*Pecten hericius*). *Proceedings of the Society for the Experimental Biology and Medicine*, 106: 887-889.
- Bradbury, S.P., Mekenyan, O.G. & Ankley, G.T., 1996. Quantification structure-activity relationships for polychlorinated hydroxybiphenyl estrogen receptor binding affinity : an assessment of conformer flexibility. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(11): 1945-1954.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Chemistry*, 72: 249-251.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boernaus, H., Flipo, D. & Fournier, M., 1999. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida (USA).
- Byard, E.H. & Aiken, D.E., 1984. The relationship between molting reproduction and a

- hemolymph female-specific protein in the lobster, *Homarus americanus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77A(4): 749-757.
- Carr, R.S. & Neff, J.M., 1984. Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 77B(3): 447-449.
- Choi, K.S., Lewis, D.H., Powell, E.N. & Ray, S.M., 1993. Quantitative measurement of reproductive output in the american oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin), using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Aquaculture and Fisheries Management*, 24(3): 299-322.
- Christensen, L.J., Korsgaard, B. & Bjerregaard, P., 1999. The effect of 4-nonylphenol on the synthesis of vitellogenin in the flounder *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology*, 46(3-4): 211-219.
- Clayton, M.E., 1996. Lipoproteins and heat shock proteins as measures of reproductive physiology in the soft shell clam *Mya arenaria*. Thèse de doctorat de l'Institut de Technologie du Massachusetts (MIT), Institut Océanographique de Woods Hole, 196pp.
- Coe, W.R. & Turner, H.J.J., 1938. Development of the gonads and gametes in the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *Journal of Morphology*, 62(1): 91-111.
- Colborn, T. & Clement, C., 1992. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection, Princeton Scientific Publishing Co. Inc, New Jersey (USA), 403p.
- Colborn, T., Vom Saal, F.S. & Soto, A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5): 378-384.
- Conn, D.B., Lee, S.J. & Shoen, K.A., 1991. Ultrastructure characteristics of developing and ovulated oocytes of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *National*

*Shellfisheries Association*, 19-22: 221-222.

- Couch, E.F., Hagino, N. & Lee, J.W., 1987. Changes in estradiol and progesterone immunoreactivity in tissue of the lobster *Homarus americanus*, with developing and immature ovaries. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87A(3): 765-770.
- Crain, D.A. & Guillette Jr., L.J., 1997. Endocrine-disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife. *Reviews in Toxicology*, 1(5-6): 47-90.
- Crain, D.A., Rooney, A.A., Orlando, E.F. & Guillette, L.J.J., 2000. Endocrine-disrupting contaminants and hormone dynamics: lessons from wildlife. Dans L.J.J. Guillette Jr & D.A. Crain (Ed.), *Environmental endocrine disrupters: an evolutionary perspective*, Princeton Scientific Publishing Co. Inc, New Jersey (USA), pp. 1-21.
- Croisille, Y., Junera, H., Mensy, J-J & Charniaux-Cotton, H., 1974. The female-specific protein (vitellogenic protein) in crustacea with particular reference to *Orchestia gammarella* (Amphipoda). *American Zoologist*, 14(4): 1219-1228.
- Czech, P., Weber, K. & Dietrich, D.R., 2001. Effects of endocrine modulation substances in reproduction in the hemaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L. *Aquatic Toxicology*, 53(2): 103-114.
- Danzo, B.J., 1997. Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroids receptors and binding proteins. *Environmental Health and Perspectives*, 195(3): 294-301.
- Davis, W.P. & Bortone, S.A., 1992. Effects of kraft effluent on the sexuality of fishes: an environmental early warning? Dans T. Colborn & C. Clement (Ed.), *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*, Princeton Scientific Publishing Co. Inc, New Jersey (USA), pp. 113-128.

- De Longcamp, D., Lubet, P. & Drosdowsky, M., 1974. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *General and Comparative Endocrinology*, 22(1): 116-127.
- De Longcamp, P.D., Drosdowsky, M. & Lubet P., 1970. Endocrinologie des invertébrés - Biosynthèse des stéroïdes chez les mollusques. Mise en évidence d'une 17- $\beta$ -hydroxystéroïde déshydrogénase dans les gonades de *Mytilus edulis* L. (Mollusques bivalves). *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris - Série D*, 271: 1564-1566.
- De Vlaming, V.L., Shing, J., Paquette, G., & Vuchs, R., 1977. *In vivo* and *in vitro* effects of  $\alpha$ -estradiol-17 $\beta$  on lipid metabolism in *Notemigonus crysoleucas*. *Journal of Fish Biology*, 10(3): 273-285.
- De Vlaming, V.L., Wiley, H.S., Delahunty, G. & Wallace, R.A., 1980. Goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin : induction, isolation, properties and relationship to yolk proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 67B(4): 613-623.
- De Zwann, A. & Zandee, D.I., 1972. Body distribution and seasonal changes in the glycogen content of the common mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 43A(1): 53-58.
- Den Besten, P.J., Herwig, H.J., Smaal, A.C., Zandee, D.I. & Voogt, P.A., 1990. Interference of polychlorinated biphenyl (Clophen A50) with gametogenesis in the sea star, *Asterias rubens* L. *Aquatic toxicology*, 18(4): 231-246.
- Den Besten, P.J., Elenbaas, J.M.L., Maas, J.R., Dieleman, S.J., Herwig, H.J. & Voogt, P.A., 1991a. Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens* L. *Aquatic Toxicology*, 20(1-2): 95-110.
- Den Besten, P.J., Maas, J.R., Livingstone, D.R., Zandee, D.I. & Voogt, P.A., 1991b. Interference of benzo[a]pyrene with cytochrome P-450 mediated steroid metabolism in pyloric caeca microsomes of the sea star *Asterias rubens* L.



*Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C (1/2): 165-168.

- Denslow, D.D., Chow, M.C., Kroll, K.J. & Green, L., 1999. Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogen or estrogen mimics. *Ecotoxicology*, 8(5): 385-398.
- Depledge, M.H. & Billingham, Z., 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-12): 32-38.
- Deridovich, I.I. & Reunova, O.V., 1993. Mini review. Prostaglandins: reproduction control in bivalve molluscs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 104A(1): 23-27.
- Desrosiers, G. & Brêthes, J.C., 1984. Étude bionomique de la communauté à *Macoma balthica* de la batture de Rimouski. *Sciences et Techniques de l'eau*, 17: 25-30.
- Donohoe, R.M. & Curtis, L.R., 1996. Estrogenic activity of chlordecone, *o,p'*-DDT and *o,p'*-DDE in juvenile rainbow trout : induction of vitellogenesis and interaction with the hepatic estrogen binding sites. *Aquatic Toxicology*, 36(1-2): 31-52.
- Dorange, G. & Le Pennec, M., 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Marine Biology*, 103(3): 339-348.
- Drèze, V., Monod, G., Cravedi, J.P., Biagiante-Risbourg, S. & Le Gac, F., 2000. Effects of 4-nonylphenol on sex differentiation and puberty in Mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Ecotoxicology*, 9(1-2): 93-103.
- Duax, W.L. & Griffin, J.P., 1985. Structure-activity relationships of estrogenic chemicals. Dans J.A. Mc Lachlan (Ed.), *Estrogens in the Environment II. Influence on development, Proceedings of the symposium, Estrogens in the Environment*, Raleigh, North California (USA), Elsevier, New York (USA), pp. 13-21.
- Eckelbarger, K.J. & Blades-Eckelbarger, P.I., 1989. Structure of the ovotestis and evidence for heterosynthetic incorporation of yolk precursors in the oocytes of

- the Nusibranch Mollusc, *Spurilla neopolitana*. *Journal of Morphology*, 201: 105-118.
- Eckelbarger, K.J. & Davis, C.V., 1996. Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. *Marine Biology*, 127(1): 79-87.
- Ekelund, R., Bergman, Å., Granmo, Å. & Berggren, M., 1990. Bioaccumulation of 4-nonylphenol in marine animals - A re-evaluation. *Environmental Pollution*, 64(2): 107-120.
- Emmersen, B.K. & Emmersen, J., 1976. Protein, RNA and DNA metabolism in relation to ovarian vitellogenic growth in the flounder *Platichthys flesus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 55B(2): 315-321.
- Emmersen, B.K. & Petersen, I.M., 1976. Natural occurrence, and experimental induction by estradiol-17 $\beta$  of a lipophosphoprotein (vitellogenin) in flounder (*Platichthys flesus*, L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 54B(4): 443-446.
- Emmersen, J., Korsgaard, B. & Petersen, I., 1979. Dose response kinetics of serum vitellogenin, liver DNA, RNA, protein and lipids after induction by estradiol-17 $\beta$  in male flounders (*Platichthys flesus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 63B(1): 1-6.
- EPA., 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Prepared for the Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency, D.C. 20460, Washington (USA), 111p.
- Epp, J., Bricelj, V.M. & Malouf, R.E., 1988. Seasonal partitioning and utilization of energy reserves in two age classes of the bay scallop *Argopecten irradians irradians* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 121(2): 113-136.
- Facemire, C.F., 2000. Bioaccumulation, storage, mobilization of endocrine-altering contaminants. Dans L.J.J. Guillette Jr. & D.A. Crain (Ed.), *Environmental*

*Endocrine Disrupters: an evolutionary perspective*, Taylor & Francis, NY (USA,) pp. 52-81.

Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B. & Valotaire, Y., 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*, 15(2): 143-151.

Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M., Crain, D.A., Enblom, J., Marcino, J. & Guillette Jr, L.J., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentration in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives*, 104(10): 1096-1101.

Förlin, L. & Anderson, T., 1984. Influence of biological and environmental factors on hepatic steroid and xenobiotic metabolism in fish : interaction with PCB and  $\beta$ -naphthoflavone. *Marine Environmental Research*, 14(1-4): 47-58.

Fournier, M., Pellerin, J., Lebeuf, M., Brousseau, P., Morin, Y. & Cyr, D., 2002. Effects of exposure of *Mya arenaria* and *Mactromeris polynyma* to contaminated marine sediments on phagocytic activity of hemocytes. *Aquatic toxicology*, 59(1-2): 83-92.

Gabbott, P.A. & Bayne, B.L., 1973. Biochemical effects of temperature and nutritive stress on *Mytilus edulis* L. *Journal of Marine Biology Association of the United Kingdom*, 53(2): 269-286.

Gabbott, P.A., 1975. Storage cycles in marine bivalve molluscs: a hypothesis concerning the relationship between glycogen metabolism and gametogenesis. Dans A. Barnes (Ed.), *Proceedings of the 9th European Marine Biology Symposium*, Aberdeen University Press, pp 191-211.

Gagné, F. & Blaise, C., 1998. Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent *in situ* hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 44(1-2): 83-91.

- Gagné, F., Blaise, C., Salazar, M., Salazar, S. & Hansen, P.D., 2001a. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 128C(2): 213-225.
- Gagné, F., Marcogliese, D.J., Blaise, C. & Gendron, A.D., 2001b. Occurrence of compounds estrogenic to freshwater mussels in surface waters in an urban area. *Environmental Toxicology*, 16(3): 260-268.
- Gagné, F., Blaise, C., Lachance, B., Sunahara, G.I. & Sabik, H., 2001c. Evidence of coprostanol estrogenicity to the freshwater mussel *Elliptio complanata*. *Environmental Pollution*, 115(1): 97-106.
- Gagné, F., Blaise, C., Aoyaa, I., Luo, R., Gagnon, C., Couillard, Y., Campbell, P. & Salazar, M., 2002a. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. *Environmental Toxicology*, 17(3): 149-159.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J. & Gauthier-Clerc, S., 2002b. Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in *Mya arenaria* at contaminated sites. *Marine Environmental Research*, 53(3): 295-310.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Pelletier, E., Douville, M., Gauthier-Clerc, S. & Viglino, L., 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) observed in an intertidal zone of the Saint-Lawrence River (Québec, Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 134C(2): 189-198.
- Gallager, S. & Mann, R., 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*, 56(2): 105-121.
- Ganion, L.R. & Kessel, R.G., 1972. Intracellular synthesis transport and packaging of proteinaceous yolk in oocytes of *Orconectes immunis*. *The Journal of Cell Biology*, 52(2): 420-437.
- Gauthier-Clerc, S., 1998. Étude diagnostique de la condition physiologique et du potentiel reproducteur de *Mya arenaria* (Mollusque bivalve) dans le fjord du

- Saguenay. Maîtrise de l'Université du Québec à Rimouski, 138p.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C. & Gagné, F., 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada): a consequence of endocrine disruptors? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131C(4): 457-467.
- Ghosh, D. & Ray, A.K., 1994. Estrogen stimulated lipogenic activity in the ovary of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 25(1): 43-47.
- Gillesby, B.E. & Zacharewski, T.R., 1998. Exoestrogens : mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1-2): 3-14.
- Ginet, A., 1996. Corrélation entre différents biomarqueurs (immunocompétence et réserves énergétiques) pour évaluer le degré de sensibilité de *Mya arenaria* (Mollusca bivalvia) exposée à une pollution diffuse et multiple dans le fjord du Saguenay. Maîtrise de l'Université du Québec à Rimouski. 138p.
- Grassé, P.P., Poisson, R.A. & Tuzet, O., 1970. Embranchement des Mollusques. Dans *Précis de Zoologie: Invertébrés*, Masson et Cie, Paris (France), pp. 411-425.
- Gray, M.A. & Metcalfe, C.D., 1997. Induction of testis-ova in japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(5): 1082-1086.
- Gross, T.S., Wieser, C.M., Kernaghan, N.J. & Ruessler, D.S., 2003. Development and validation of procedures for monitoring endocrine and reproductive function in freshwater mussels:  
<http://cars.er.usgs.gov/posters/ecotoxicologie/endrocine/endrocine.html>.
- Gottlieb, T.A. & Wallace, R.A., 1981. Intracellular phosphorylation of vitellogenin in the liver of estrogen-stimulated *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(8): 4116-4123.

- Gottlieb, T.A. & Wallace, R.A., 1982. Intracellular glycosylation of vitellogenin in the liver of estrogen-stimulated *Xenopus laevis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 257(10): 95-103.
- Guillette Jr, L.J.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Perceval, 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 and Perspectives*, 102(8): 680-688.
- Guillette, L.J.J., Rooney, A.A., Crain, D.A. & Orlando, E.F., 1999. Steroid hormones as a biomarker of endocrine disruption in wildlife. Dans D.S. Henshel, M.C. Black, and M.C. Harrass (Ed.), *Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of biomarkers for endocrine Disruption and Environmental Assessment*, West Conshohocken, PA (USA), pp. 254-270.
- Guillette Jr, L.J.J. & Crain, D.A., 2000. Environmental endocrine disruptors: an evolutionary perspective. Taylor & Francis, NY (USA), 355p.
- Hagerman, D.D., Wellington, F.M. & Villet, C.A., 1957. Estrogens in marine invertebrates. *Biological Letters*, 1112: 180-183.
- Hall, P.F., 1986. A steroids review. Cytochromes P-450 and the regulation of steroid synthesis. *Steroids*, 48(3-4): 131-196.
- Hansen, P.D., Dizer, H., Hock, B., Marx, A., Sherry, J., Mc Mater, M., & Blaise C., 1998. Vitellogenin - a biomarker for endocrine disruptors. *Trends in Analytical Chemistry*, 17(7): 448-451.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J.P., Tyler, T. & Zaman, N., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(3): 534-542.
- Harries, J.E., Janbakhsh, A., Jobling, S., Matthiessen, P., Sumpter, J.P. & Tyler, C.R.,

1999. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(5): 932-937.
- Harrington, F.E. & Easton, D.P., 1982. A putative precursor to the major yolk protein of the sea urchin. *Developmental biology*, 94(2): 505-508.
- Harrington, F.E. & Ozaki, H., 1986. The major yolk glycoprotein precursor in echinoids is secreted by coelomocytes into the coelomic caeca. *Cell Differentiation*, 19: 51-57.
- Hathaway, R.R., 1965. Conversion of estradiol-17 $\beta$  in sperm preparations of sea urchins and oysters. *General and Comparative Endocrinology*, 5(5) : 504-508.
- Haux, C. & Norberg, B., 1985. The influence of estradiol-17 $\beta$  on the liver content of protein, lipids, glycogen and nucleic acids in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdnerii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81A(2): 275-279.
- Hawkins, C.M. & Rowell, T.W., 1987. The importance of cleansing in the calculation of condition index in the soft-shell clam, *Mya arenaria* (L.). *Journal of Shellfish Research*, 6(2): 85-88.
- Heppell, S.A., Denslow, N.D., Folmar, L.C. & Sullivan, C.V., 1995. Universal assay of vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. *Environmental Health Perspectives*, 103(suppl. 7): 9-15.
- Hines, G.A., Watts, S.A., Sower, S.A. & Walker, C.W., 1992a. Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. *General and Comparative Endocrinology*, 87(3): 451-460.
- Hines, G.A., Watts, S.A., Walker, C.W. & Voogt, P.A., 1992b. Androgen metabolism in somatic and germinal tissues of the sea star *Asterias vulgaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 102B(3): 521-526.
- Houtteville, P. & Lubet, P., 1974. Analyse expérimentale, en culture organolytique. *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris - Série D*, 278: 2469-2472.

- Idler, D.R., Sangalang, G.B. & Kanzawa, A., 1969. Steroid desmolase in gonads of a marine invertebrate, *Placopecten magellanicus* Gmelin. *General and Comparative Endocrinology*, 12(2): 222-230.
- Idler, D.R. & Wiseman, P., 1971. Sterols in Molluscs. *International Journal of Biochemistry*, 2(11): 516-528.
- Jarzebski, A., 1985. Major sterols of bivalve molluscs from the inner puck Bay, southern Baltic. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81B(4): 989-991.
- Jen, S.S., Wan, W.C.M. & Chang, C.F., 1978. Existence of an estrogen-like compound in the ovary of the shrimp *Parapenaeus fissurus*. *General and Comparative Endocrinology*, 36: 211-214.
- Jha, A.N., Hagger, J.A. & Hill, S.J., 2000. Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the mussel *Mytilus edulis*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(4): 343-350.
- Jobling, S. & Sumpter, J.P., 1993. Detergent components in sewage effluents are weakly oestrogenic to fish : an *in vitro* study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 27(3-4): 361-372.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P. & Sumpter, J.P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(2): 194-202.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G. & Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, 32(17): 2498-2506.
- Joose, J. & Geraerts, W.P.W., 1983. Endocrinology. Dans A.S.M. Saleuddin & Wiburg K.M., (Ed.), *The Mollusca*, New-York (USA), pp. 317-406.
- Kang, S.G., Choi, K.S., Bulgakov, A.A., Kim, Y. & Kim, S.Y., 2003. Enzyme-linked



- immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 282(1-2): 1-21.
- Kavlock, R.J., 1999. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere*, 39(8): 1227-1236.
- Kelley, R.N., Ashwood-Smith, M.J. & Ellis, D.V., 1982. Duration and timing of spermatogenesis in a stock of the mussel *Mytilus californianus*. *Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom*, 62: 509-519.
- Khotimchenko, Y.S. & Deridovich, I.I., 1989. The effect of dopamine and galiperidol on cyclic AMP in the gonad of the bivalve mollusc *Mizuhopecten yessoensis* and the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 92C(1): 23-26.
- Kime, D.E., Nash, J.P. & Scott, A.P., 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, 177(1-4): 345-352.
- Kirchin, M.A., Wiseman, A. & Livingstone, D.R., 1988. Studies on the mixed-function oxygenase system of the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 24: 117-118.
- Kirchin, M.A., Wiseman, A. & Livingstone, D.R., 1992. Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101C(1): 81-91.
- Kluytmans, J.H., Brands, F. & Zandee, D.I., 1988. Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research*, 24(1-4): 189-192.
- Knudsen, F.R. & Pottinger, T.G., 1999. Interaction of endocrine disrupting chemical, singly and combination, with estrogen-, androgen-, and corticosteroid-binding sites in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 44(4): 259-

170.

- Korsgaard, B. & Pedersen, K.L., 1998. Vitellogenin on *Zoarcetes viviparus* : purification, quantification by ELISA and induction by estradiol-17 $\beta$  and 4-nonylphenol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120C(1): 159-166.
- Kramer, V.J., Miles-Richardson, S., Pierens, S.L. & Giesy, J.P., 1998. Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 $\beta$ -estradiol. *Aquatic Toxicology*, 40(4): 335-360.
- Lagadic, L., Caquet, T. & Amiard, J.-C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. Dans L. Lagadic, T. Caquet & J.-C. Amiard (Ed.), *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*, Masson, Paris, 1-9 pp.
- Lamoureux, P., 1974. Inventaire des stocks commerciaux de myes (*Mya arenaria* L.) au Québec, Direction des pêches maritimes, Direction de la recherche, Québec (Canada).
- Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J.C. & Le Penec, M., 2000. Oocyte size a mean to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 190(1-2): 183-199.
- Leblanc, G.A., Campbell, P.M., den Besten, P., Brown, R.P., Chang, E.S., Coats, J.R., deFur, P.L., Dhadialla, T., Edwards, J., Riddiford, L.M., Simpson, M.G., Snell, T.W., Thorndyke, M. & Matumura, F., 1999. The endocrinology of invertebrates. Dans P.L. deFur, M. Crane, C. Ingersoll, & L. Tattersfield (Ed.), *Endocrinology disruption in invertebrates: endocrinology, testing, and assessment*, A technical Publication of the SETAC, USA, pp. 23-106.
- Leblanc, G.A., 2000. Steroid hormone-regulated processes in invertebrates and their susceptibility to environmental endocrine disruption. Dans L.J.J. Guillette Jr & D.A. Crain (Ed.), *Environmental endocrine disruptors: an evolutionary perspective*, Taylor & Francis, NY (USA), pp. 126-154.

- Le Curieux-Belfond, O., Moslemi, S., Mathieu, M. & Séralini, G.E., 2001. Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas*: evidence for 17 $\beta$ -HSD activities and characterization of an aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 78: 359-366.
- Lee, R.F. & Heffernan, P.B., 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oyster *Crassostrea gigas* (Gmelin, 1791) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria*, 1758). *Journal of Shellfish Research*, 10(1): 203-206.
- Lee, R.F., Sweeney, M. & Walker, R., 1994. Vitellogenesis in the hard clam, *Mercenaria mercenaria*; synthesis and utilization of vitellin. *Journal of Shellfish Research*, 13(1): 300.
- Lee, R.F. & Noone, T., 1995. Effect of reproductive toxicants on lipovitellin in female blue crabs, *Callinectes sapidus*. *Marine Environmental Research*, 39(1-4): 151-154.
- Lee, C.Y. & Watson, D., 1995. *In vitro* study of vitellogenesis in the blue crab (*Callinectes sapidus*): site and control of vitellin synthesis. *The Journal of Experimental Zoology*, 271(5): 364-372.
- Lehoux, J.G. & Sandor, T., 1970. The occurrence of steroids and steroid metabolizing enzymes in invertebrates. A review. *Steroids*, 16(2): 141-171.
- Le Menn, F., Rochefort, H. & Garcia, M., 1980. Effect of androgen mediated by the estrogen receptor of fish liver: vitellogenin accumulation. *Steroids*, 35(3): 315-328.
- Le Pennec, M., Beninger, P.G., Dorange, G. & Paulet, Y.M., 1991. Trophic sources and pathways to the developing gametes of *Pecten maximus* (Bivalva: Pectinidae). *Journal of the Marine Biological Association of The United Kingdom*, 71(2): 451-463.
- Li, Q., Osada, M., Suzuki, T. & Mori, K., 1998. Changes in vitellin during oogenesis

- and effect of estradiol-17 $\beta$  on vitellogenesis in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 33(1): 87-93.
- Li, Q., Osada, M. & Mori.K., 2000. Seasonal biochemistry variations in Pacific oyster gonadal tissue during sexual maturation. *Fisheries Science*, 3: 502-508.
- Livingstone, D.R. & Farrar, S.V., 1984. Tissue and subcellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo[a]pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis*. *Science of the Total Environment*, 39(3): 209-235.
- Livingstone, D.R., 1988. Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrome P-450 in the digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorina littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants. *Marine Ecology Progress Series*, 46(1-3): 37-43.
- Livingstone, D.R., Farrar, S.V., Fossi, C., Kirchin, M.A. & Moore, M.N., 1988. Responses of the digestive gland cyt.P-450 monooxygenase system of the common mussel (*Mytilus edulis*) to 3-methylcholanthrene and sodium phenobarbital. *Marine Environmental Research*, 24(1-4): 118-119.
- Lubet, P., 1959. Recherche sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés. *Revue des Travaux. Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (Rev Trav Inst STPM Paris)*, 23(4): 396-545.
- Lubet, P., Herlin, P., Mathieu, M. & Collin, F., 1976. Tissu de réserve et cycle sexuel chez les Lamellibranches. *Haliotis*, 7: 59-63.
- Lubet, P. & Mathieu, M., 1982. The action of internal factors on gametogenesis in pelecypodes molluscs. *Malacologia*, 22(1-2): 131-136.
- Lubet, P., Albertini, L. & Robbins, I., 1986. Endocrinologie. - Recherches expérimentales au cours de cycles annuels sur l'action gonadotrope exercée par les ganglions cérébroïdes sur la gamétogénèse femelle chez la moule *Mytilus edulis* L. (Mollusque bivalve). *Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de*

- Paris*, t. 303, Série III,(13): 575-580.
- Lubet, P., Mathieu, M. & Lenoir, F., 1987. Contrôle endocrinien de la reproduction chez les Mollusques bivalves. *Océanis*, 13(3): 291-304.
- Lubet, P. & Mathieu, M., 1990. Les régulations endocriniennes chez les Mollusques bivalves. *L'année biologique*, 29(4): 235-252.
- Lubet, P.E. & Mathieu, M., 1999. Applications à la conchyliculture des récentes acquisitions sur la biologie des mollusques bivalves. *L'Année Biologique*, 38: 27-50.
- Lye, C.M., Frid, C.L.J., Gill, M.E., Cooper, D.W. & Jones, D.M., 1999. Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediment, and waters from the U.K. Tyne and Tees estuaries. *Environmental Science and Technology*, 33(7): 1009-1014.
- MacDonald, B.A., Bacon, G.S. & Ward, J.E., 1998. Physiological responses of infaunal (*Mya arenaria*) and epifaunal (*Placopecten magellanicus*) bivalves to variations in the concentration and quality of suspended particles II. Absorption efficiency and scope for growth. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 219(1-2): 127-141.
- Martel, L., Gagnon, M.J., Massé, R., Leclerc, A. & Tremblay, L., 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from the Saguenay fjord, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(1): 133-140.
- Massapina, C., Jiaquim, S., Matias, D. & Devauchelle, N., 1999. Oocyte and embryo quality in *Crassostrea gigas* (Portuguese strain) during a spawning period in Algarve, South Portugal. *Aquatic Living Resources*, 12(5): 327-333.
- Mathieu, M. & Lubet, P., 1980. Analyse expérimentale, en cultures d'organes, de l'action des ganglions nerveux sur la gonade adulte de la moule, *Mytilus edulis* Linné (Mollusque lamelibranche). *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 105(1): 149-153.

- Mathieu, M., Lenoir, F. & Robbins, I., 1988. A gonial mitosis-stimulation factor in cerebral ganglia and hemolymph of the marine mussel *Mytilus edulis* L. *General and Comparative Endocrinology*, 72(2): 257-263.
- Mathieu, M., Robbins, I. & Lubet, P., 1991. The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, 94(2-3): 213-223.
- Mathieu, M., 1994. Endocrine control of carbohydrate metabolism in Molluscs. *Perspectives in Comparative Endocrinology*, 471-474.
- Matsumoto, T., Osada, M., Osawa, Y. & Mori, K., 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 118B(4): 811-817.
- Matsutani, T. & Nomura, T., 1986. Pharmacological Observations on the mechanism of spawning in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(9): 1589-1594.
- Matsutani, T. & Nomura, T., 1987. *In vitro* effects of serotonin and prostaglandins on release of eggs from the ovary of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *General and Comparative Endocrinology*, 67(1): 111-118.
- Matthiessen, P. & Gibbs, E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1): 37-43.
- Matthiessen, P., Reynoldson, T., Billingham, Z., Brassard, D.W., Cameron, P., Chandler, G.T., Davies, I.M., Horiguchi, T., Mount, D.R., Oehlman, J., Pottinger, T.G., Sibley, P.K., Thompson, H.M. & Vethaak, A.D., 1999. Field assessment for endocrine disruption in invertebrates. Dans P.L. deFur, M. Crane, C.G. Ingersoll, & L.J. Tattersfield (Ed.), *Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing, and assessment*, A technical publication of the SETAC, USA, pp. 119-270.

- Mayrand, E., Guderley, H. & Dutil, J.D., 1998. Effect of morphometric maturity and size on enzyme activities and nucleic acid ratios in the snow crab *Chionoecetes opilio*. *Journal of Crustacean Biology*, 18(2): 232-242.
- McLachlan, J.A. & Arnold, S.F., 1996. Environmental estrogens. *American Scientist*, 84: 452-462.
- Mc Leese, D.W., Zitko, V., Sergeant, D.B., Burridge, L. & Metcalfe, C.D., 1981. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere*, 10(7): 723-730.
- Mommsen, T. P. & Walsh, P. J., 1988. Vitellogenesis and oocyte assembly. Dans W.S., Hoar & D.J. Randall (Ed.), *Fish Physiology, Vol. XI, The Physiology of developing fish, Part A. Eggs and Larvae*, Academic Press, London (England), Chap. 5, pp. 347-406.
- Moore, M.N., Lowe, D.M. & Fieth, P.E.M., 1978. Responses of lysosomes in the digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, to sex steroid and cortisol. *Cell and Tissue Research*, 188: 1-9.
- Moore, M.N., 1991. Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreas cells to extracellular signals. *Histochemical Journal*, 23(10): 495-500.
- Moore, C.G. & Stevenson, J.M., 1991. The occurrence of intersexuality in harpacticoid copepods and its relationship with pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 22(2): 72-74.
- Morcillo, Y., Ronis, M.J.J. & Porte, C., 1998. Effect of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titers of the clam *Ruditapes decussata*. *Aquatic Toxicology*, 42(1): 1-13.
- Morcillo, Y., Albatat, A. & Porte, C., 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution : bioaccumulation and effect on P450-mediated aromatase activity.

*Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(6): 1203-1209.

- Morcillo, Y. & Porte, C., 2000. Evidence of endocrine disruption in clams -*Ruditapes decussata*- transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environmental Pollution*, 107(1): 47-52.
- Mori, K., Tamate, H. & Ima, T., 1965a. Presence of  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase activity in the tissues of maturing oysters. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 15(3): 269-277.
- Mori, K., Tamate, H. & Imai, T., 1965b. Presence of 17 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase activity in tissues of maturing oysters. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 16(2): 147-153.
- Mori, K., Tamate, H. & Imai, T., 1966. Histological study on the change of 17 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase activity in the oyster during the stages of sexual maturation and spawning. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 17(2): 179-191.
- Mori, K., 1968a. Effect of steroid on oyster –I. Activation of respiration in gonad by estradiol-17 $\beta$ . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 34(10): 915-919.
- Mori, K., 1968b. Effect of steroid on oyster -II. Increase in rates of fertilization and development by estradiol-17 $\beta$ . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 34(11): 997-999.
- Mori, K., 1969. Effect of steroid on oyster –IV. Acceleration of sexual maturation in female *Crassostrea gigas* by estradiol 17 $\beta$ . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 35(11): 1077-1079.
- Mori, K., Muramatsu, T. & Nakamura, Y., 1969. Effect of steroid on oyster-III. Sex reversal from male to female in *Crassostrea gigas* by estradiol-17 $\beta$ . *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 35(11): 1072-1076.



- Mori, K., 1980. Physiological effects of  $17\beta$ -estradiol on the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Proceedings of the North Pacific Aquaculture Symposium*, Anchorage, Alaska (USA), 305-317.
- Motavkine, P.A. & Varaksine, A.A., 1989. La reproduction chez les mollusques bivalves. Rôle du système nerveux et régulation, traduit du russe par C. Bellon-Humbert, Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER, France, 247p.
- Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.I., Mc Master, M.E. & Portt, C.B., 1992. Reproductive dysfunction MFO activity in three species of fish exposed to bleached kraft mill effluent at Jackfish Bay, Lake Superior. *Water Quality Research Journal of Canada*, 27(3): 439-446.
- Munkittrick, K.R., Van Der Kraak, G.V., Mc Master, M.E., Portt, C.B., Van Den Heudel, M.R. & Servos, M.R., 1994. Survey of receiving-water environmental impacts associated with discharges from pulp mills. 2- gonad size, liver size, hepatic EROD activity & plasma sex steroid levels in the white sucker. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(7): 1089-1101.
- Murat, J.C., 1976. Studies on glycogenolysis in carp liver: evidence for an amylase pathway for glycogen breakdown. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 55B(3): 461-465.
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenklink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J. & Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(1): 16-23.
- Nagabhushanam, R., 1964. Effect of removal of neurosecretory cells on spawning in the mussel *Modiolus demissus* (Mollusca: Lamellibranchiata). *Current Sciences*, 33(7): 215-216.
- Nagler, J.J., Ruby, S.M., Idler, D.R. & So, Y.P., 1987. Serum phosphoprotein phosphorus and calcium levels as reproductive indicators of vitellogenin in highly vitellogenic mature female and estradiol-injected immature rainbow trout

- (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Zoology*, 65(10): 2421-2425.
- Napolitano, G.E., MacDonald, B.A., Thompson, R.J., & Ackman, R.G., 1992. Lipid composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. *Marine Biology*, 113(1): 71-76.
- Nice, H.E., Thorndyke, M.C., Morritt, D., Steele, S. & Crane, M., 2000. Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin*, 40(6): 491-496.
- Nicolas, J.M., 1999. Vitellogenesis in fish and effect of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminants. *Aquatic Toxicology*, 45(2-3): 77-90.
- Nimrod, A.C. & Benson, W.H., 1996. Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Critical Reviews in Toxicology*, 26(3): 335-364.
- Oberdörster, E., Rice, C.D. & Irwin, L.K., 2000. Purification of vitellin from grass shrimp *Palaemonetes pugio*, generation of monoclonal antibodies, and validation for the detection of lipovitellin in Crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 127C: 199-201.
- Oberdörster, E. & Cheek, A.O., 2001. Gender blenders at the beach : endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1): 23-36.
- Olsson, P.E., Kling, P., Petterson, C. & Silversand, C., 1995. Interaction of cadmium and oestradiol-17 $\beta$  on metallothionein and vitellogenin synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemistry*, 307(1): 197-203.
- Ono, K., Osada, M., Matsutani, T., Mori, K. & Nomura, T., 1982. Gonadal prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  profile during sexual maturation in the oyster, *Crassostrea gigas* Thunberg. *Marine Biology Letters*, 3(4-5): 223-230.
- Osada, M. & Nomura, T., 1989a. Seasonal variations of catecholamine levels in the tissue of the japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Comparative Biochemistry and*

- Physiology*, 93C(1): 171-173.
- Osada, M. & Nomura, T., 1989b. Estrogen effect on the seasonal levels of catecholamines in the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 93C(2): 349-353.
- Osada, M., Nishikawa, M. & Nomura, T., 1989. Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 94C(2): 595-601.
- Osada, M. & Nomura, T., 1990. The levels of prostaglandins associated with the reproductive cycle of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *Prostaglandins*, 40(3): 229-239.
- Osada, M., Unuma, T. & Mori, K., 1992. Purification and characterization of a yolk-protein from the scallop ovary. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58(12): 2283-2289.
- Osada, M., Takamura, T., Sato, H. & Mori, K., 2003. Vitellogenesis synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17 and central nervous system. *Journal of Experimental Zoology*, 299A(4): 172-179.
- Ozaki, H., 1980. Yolk proteins of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Development, Growth and Differentiation*, 22(3): 365-372.
- Ozaki, H., Moriya, O. & Harrington, F.E., 1986. A glycoprotein in the accessory cell of the echinoid ovary and its role in vitellogenesis. *Roux's Archives of Developmental Biology*, 195: 74-79.
- Palmer, B.D., Huth, L.K., Pioto, D.L. & Selcer, K.W., 1998. Vitellogenin as a biomarker for xenobiotic estrogens in an amphibian model system. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(1): 30-36.
- Pani, A.K. & Croll, R.P., 2000. Catechol concentrations in the hemolymph of the scallop, *Placopecten magellanicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 118(1): 48-56.

- Paulet, Y.M., Donval, A. & Bekhadra, F., 1993. Monoamines and reproduction in *Pecten maximus*, a preliminary approach. *Invertebrate Reproduction and Development*, 23(2-3): 89-94.
- Paulus, J.E. & Laufer, H., 1987. Vitellogenocytes in the hepatopancreas of *Carcinus maenas* and *Libinia emarginata* (Decapoda brachyura). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 11(1): 29-44.
- Pazos, A.J., Ruíz, C., García-Marín, O., Abad, M. & Sánchez, J.L., 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia, N.W. Spain. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114B(2): 171-179.
- Pazos, A.J., Román, G., Acosta, C.P., Sánchez, J.L. & Abad, M., 1997. Lipid classes and fatty acids composition in the female gonad of *Pecten maximus* in relation to reproductive cycle and environmental variables. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111B(3): 393-402.
- Pazos, A.J. & Mathieu, M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspension of marine bivalve gonad : stimulation of gonial DNA synthesis. *General and Comparative Endocrinology*, 113(1): 112-120.
- Petersen, I.M., Sand, O. & Korsgaard, B., 1983. A time course study of the effect of repetitive doses of estradiol-17 $\beta$  on serum glucose and lipids, liver glycogen and some carbohydrate metabolizing enzymes in liver of male flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 74B(3): 459-466.
- Pipe, R.K., 1987a. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: an ultrastructural study. *Marine Biology*, 95: 405-414.
- Pipe, R.K., 1987b. Ultrastructural and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 96: 519-528.

- Pollero, R.J., Ré, M.E. & Bremner, R.R., 1979. Seasonal changes of the lipids of the mollusc *Chlamys tehuelcha*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 64A(2): 257-263.
- Pollero, R.J., Guca, G. & Brenner, R.R., 1985. Role of hemocytes and plasma on lipid transport in the freshwater mollusc *Diplodon delodontus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 82A(2): 339-343.
- Pollero, R.J., 1987. Transport of cholesterol in the hemolymph of the mollusc *Diplodon delodontus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 88A(3): 577-580.
- Porte, C., Solé, M., Albaigés, J. & Livingstone, D.R., 1991. Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* sp. to organic pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C(1-2): 183-186.
- Porte, C., Lemaire, P., Peters, L.D. & Livingstone, D.R., 1995. Partial purification and properties of cytochrome P450 from digestive gland microsomes of the common mussel, *Mytilus edulis* L. *Marine Environmental Research*, 39(1-4): 27-31.
- Porte, C., Biosca, M., Solé, M. & Albaigés, J., 2001. The integrated use of chemical analysis, cytochrome P450 and stress proteins in mussel to assess pollution along the Galician coast (NW Spain). *Environmental Pollution*, 112(2): 261-268.
- Purdom, C.E., Hardiman, P.A., Bye, V.J., Eno, N.C., Tyler, C.R. & Sumpter, J.P., 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology*, 8(4): 275-285.
- Quackenbush, L.S., 1989a. Vitellogenesis in the shrimp, *Penaeus vannamei*: in vitro studies of the isolated hepatopancreas and ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 94B(2): 253-261.
- Quackenbush, L.S., 1989b. Yolk protein production in the marine shrimp *Penaeus vannamei*. *Journal of Crustacean Biology*, 9(4): 509-516.

- Reis-Henriques, M.A. & Coimbra, J., 1990. Variation in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95A(3): 343-348.
- Reis-Henriques, M.A., Le Guellec, D., Remy-Martin, J.P. & Adessi, G.L., 1990. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95B(2): 303-309.
- Reis-Henriques, M.A., Ferreira, M., Silva, L. & Dias, A., 2000. Evidence for an involvement of vitellogenin in the steroidogenic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenic oocytes. *General and Comparative Endocrinology*, 117: 260-267.
- Robbins, I., Lenoir, F. & Mathieu, M., 1990a. A putative neuroendocrine factor that stimulates glycogen mobilization in isolated glycogen cells from the marine mussel *Mytilus edulis*. *General and Comparative Endocrinology*, 79(1): 123-129.
- Robbins, I., Lubet, P. & Besnard, J.Y., 1990b. Seasonal variations in the nucleic acid content and RNA:DNA ratio of the gonad of the scallop *Pecten maximus*. *Marine Biology*, 105(1): 191-195.
- Robbins, I., Lenoir, F. & Mathieu, M., 1991. Neuroendocrine factors affecting the glycogen metabolism of purified *Mytilus edulis* glycogen cells: partial characterization of the putative glycogen mobilization hormones. Demonstration of a factor that stimulates glycogen synthesis. *General and Comparative Endocrinology*, 82(1): 45-52.
- Ronis, M.J.J. & Mason, A.Z., 1996. The metabolism of testosterone by the Periwinkle (*Littorina littorea*) *in vitro* and *in vivo*: effects of tributyl tin. *Marine Environmental Research*, 42(1-4): 161-166.

- Ropes, J.W. & Stickney, A.P., 1965. Reproductive cycle of *Mya arenaria* in New England. *Biology Bulletin of Marine Biology*, Woods Hole Massachusetts, 128: 315-327.
- Roseberry, L., Vincent, B. & Lemaire, C., 1991. Croissance et reproduction de *Mya arenaria* dans la zone intertidale de l'estuaire du St Laurent. *Canadian Journal of Zoology*, 69: 724-732.
- Routledge, E.J. & Sumpter, J.P., 1996. Estrogenic activity of surfactant and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3): 241-248.
- Ruiz, C., Martinez, D., Mosquera, G., Abad, M. & Sánchez, J.L., 1992. Seasonal variations in condition, reproductive activity and biochemical composition of the flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrán (Galicia, Spain). *Marine Biology*, 112(1): 67-74.
- Ruiz, J.M., Bryan, G.W., Wigham, G.D. & Gibbs, P.E., 1995. Effects of tributyltin (TBT) exposure on the reproduction and embryonic development of the bivalve *Scorbicula plana*. *Marine Environmental Research*, 40(4): 363-379.
- Saliot, A. & Barbier, M., 1971. Sur l'isolement de la progestérone et de quelques cétostéroïdes de la partie femelle des gonades de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus*. *Biochimie*, 53(2): 265-266.
- Sánchez, P. & Tarazona, J.V., 2002. Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*. *Aquatic Toxicology*, 60(3-4): 249-256.
- Sand, O., Petersen, I.M. & Korsgaard-Emmersen, B., 1980. Changes in some carbohydrate metabolizing enzymes and glycogen in liver, glucose and lipid in serum during vitellogenesis and after induction by estradiol-17 $\beta$  in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 65B(2): 327-332.

- Sangalang, G. & Jones, G., 1980. Oocytes in testis and intersex in Lobsters (*Homarus americanus*) from Nova Scotian sites: natural or Site-Related Phenomenon? *Canadian Technical Reports of the Fisheries and Aquatic Sciences*, 2163: 49.
- San Juan Serrano, F., Sanchez Lopez, J.L. & Garcia Martin L.O., 1998. ATP and energy charge regular glycogen phosphorylase from *Mytilus galloprovincialis* mantle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120B(3): 483-491.
- Schoenmakers, H.J.N., Van Bohemen, C.G. & Dieleman, S.J., 1981. Effects of oestradiol-17 $\beta$  on the ovaries of the starfish *Asterias rubens*. *Developmental Growth and Differentiation*, 23(2): 125-135.
- Scholz, S. & Gutzeit, H.O., 2000. 17- $\alpha$ -ethinylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 50(4): 363-373.
- Schultz, T.W., Kraut, D.H., Sayler, G.S. & Layton, A.C., 1998. Estrogenicity of selected biphenyls evaluated using a recombinant yeast assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(9): 1727-1729.
- Segner, H., Carroll, K., Janssen, C.R., Maack, G., Pascoe, D., Schäfers, C., Vandenberg, G.F., Watts, M. & Wenzel, A., 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the european IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(3): 302-314.
- Servos, M.R., 1999. Review of the aquatic toxicology, estrogenic responses and bioaccumulation of alkylphenol and alkylphenol polyethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada*, 39(1): 123-177.
- Sherry, J., Gamble, A., Hodson, P., Solomon, K., Hock, B., Marx, A. & Hansen, P., 1999. Vitellogenin induction in fish as an indicator of exposure to environmental estrogens. Dans S.S. Rao (Ed.), *Impact assessment of hazardous aquatic contaminants. Concept and Approaches*, Lewis Publisher, NY (USA), pp. 123-160.



- Shimizu, K., Satuito, C., Saikawa, W. & Fusetani, N., 1996. Larval storage protein of the barnacle *Balanus amphitrite*: biochemical and immunological similarities to vitellin. *The Journal of Experimental Zoology*, 276(2): 87-94.
- Shyu, A.B., Raff, R.A. & Blumenthal, T., 1986. Expression of VTG vitellogenin gene in female and male sea urchin. *Proceedings of the Naturalist Academy of Sciences, USA*, 83: 3865-3869.
- Siah, A., Pellerin, J., Benosman, A., Gagné, J. & Amiard, J., 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132A(2): 499-511.
- Siah, A., Pellerin, J., Amiard, J.-C., Pelletier, E. & Viglino, L., 2003. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to *in situ* contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 135C(2): 145-156.
- Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W. & Goad, L.J., 1991. The effect of tributyltin upon steroid titers in the female dogwhelk *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Marine Environmental Research*, 32(1): 37-49.
- Stefano, G.B., Catapane, E. & Aiello, E., 1976. Dopaminergic agents: influence on serotonin in the molluscan nervous system. *Science*, 194(4264): 539-541.
- Stefano, G.B. & Catapane, E., 1977. Seasonal monoamine changes in the central nervous system of *Mytilus edulis* (Bivalvia). *Experientia*, 33(10): 1341-1342.
- Stefano, G.B. & Catapane, E.J., 1980. Norepinephrine: its presence in the central nervous system of the bivalve Mollusc, *Mytilus edulis*. *The Journal of Experimental Zoology*, 214: 209-213.
- Stegeman, J.J., 1985. Benzo[a]pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the western north atlantic. *Marine Biology*, 89(1): 21-30.

- Sumpter, J.P. & Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives*, 103(suppl. 7): 173-178.
- Sundararaj, B.I., Goswami, S.V. & Lamba, V.J., 1982. Role of testosterone, estradiol-17 $\beta$ , and cortisol during vitellogenin synthesis in the catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General and Comparative Endocrinology*, 48(3): 390-397.
- Sundelin, B. & Eriksson, A.K., 1998. Malformation in embryos of the deposit-feeding amphipod *Monoporeia affinis* in the Baltic sea. *Marine Ecology Progress Series*, 171: 165-180.
- Sunila, I., 1988. Pollution-related histopathological changes in the mussel *Mytilus edulis* L. in the baltic sea. *Marine Environmental Research*, 24(1-4): 277-280.
- Suzuki, T., Hara, A., Yamaguchi, K. & Mori, K., 1992. Purification and immunolocalization of a vitellin-like protein from the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology*, 113(2): 239-245.
- Tamura, T., Wainai, T., Truscott, B. & Idler, D.R., 1964. Isolation of 22-dehydrocholesterol from scallop. *Canadian Journal of Biochemistry*, 42: 1331-1337.
- Thomas, P., 1989. Effects of aroclor 1254 and cadmium on reproductive endocrine function and ovarian growth in the atlantic croaker. *Marine Environmental Research*, 28(1-4): 499-503.
- Thompson, R.J., 1977. Blood chemistry, biochemical composition, and the annual reproductive cycle in the giant scallop, *Placopecten magellanicus*, from Southeast Newfoundland. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 34(11): 2104-2116.
- Tirumalai, R. & Subramoniam, T., 1992. Purification and characterization of vitellogenin and lipovitellins of the sand crab *Emeita asiatica*. Molecular aspects of crab yolk protein. *Molecular Reproduction and Development*, 33(1): 16-26.

- Tollefsen, K.E., 2002. Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 56(3): 215-225.
- Tong, W., Perkins, R., Strelitz, R., Collantes, E.R., Keenan, S., Welsh, W.J., Branham, W.S. & Sheehan, D.M., 1997. Quantitative structure-reactivity relationships (QSARs) for estrogen binding to the estrogen receptor: prediction across species. *Environmental Health Perspectives*, 105(10): 1116-1124.
- Tremblay, A., 1992. Caractérisation de certains processus nutritionnels à différentes échelles temporelles chez deux bivalves vivant en zone intertidale dans l'estuaire du St Laurent. Maîtrise de l'Université du Québec à Rimouski. 138p.
- Tyler, C.R., Jobling, S. & Sumpter, J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*, 28(4): 319-361.
- Unuma, T., Suzuki, T., Kurokawa, T., Yamamoto, T. & Akiyama, T., 1998. A protein identical to the yolk protein is stored in the testis in male red sea urchin, *Pseudocentrotus depressus*. *Biology Bulletin*, 194: 92-97.
- Vandenbergh, G.F., Adriaens, D., Verslycke, T. & Janssen, C.R., 2003. Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyaella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2): 216-222.
- Van der Plas, A.J., Koenderman, A.H.L., Deibel-Van Shijndel, G.J. & Voogt, P.A., 1982. Effects of  $\alpha$ -estradiol-17 $\beta$  on the synthesis of RNA, proteins and lipids in the pyloric caeca of the female starfish *Asterias rubens*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73B(4): 965-970.
- Varaksina, G.S. & Varaksin, A.A., 1988. Localization of 17 $\beta$ -hydroxysteroid deshydrogenase in gonads of common mussel *Patinopecten yessoensis* (Jay) and *Crenomytilus grayanus* (Dunker). *Archivi Anatomii Gistologii i Embriologi*, 95(11): 79-82.
- Vassallo, M.T., 1973. Lipid storage and transfer in the scallop *Chlamys hericia* Gould.

- Comparative Biochemistry and Physiology*, 44A(4): 1169-1175.
- Voogt, P.A., Broertjes, J.J.S. & Oudejans, R.C.H.M., 1985. Vitellogenesis in sea star : physiological and metabolic implications. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 80A(2): 141-147.
- Voogt, P.A., Den Besten, P.J. & Jansen, M., 1991. Steroid metabolism in relation to the reproduction cycle in *Asterias rubens* L. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99B(1): 77-82.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J.V., Brandt, I. & Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the european situation. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(1): 71-133.
- Wallace, R.A., Walker, S.L. & Hauscheka, P.V., 1967. Crustacean lipovitellin. Isolation and characterization of the major high density lipoprotein from the eggs of decapods. *Biochemistry*, 6(6): 1582-1590.
- Wallace, R.A. & Jared, D.W., 1968. Studies on amphibian yolk. VII. Serum phosphoprotein synthesis by vitellogenic females and estrogen-treated males of *Xenopus laevis*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 46(8): 953-959.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P. & Parker, M.G., 1994. Environmental persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135(1): 175-182.
- White, P.A., Blaise, C. & Rasmussen, J.B., 1997. Detection of genotoxic substances in bivalve molluscs from the Saguenay Fjord (Canada), using SOS chromotest. *Mutation Research*, 392(3): 277-300.
- White, P.A., Rasmussen, J.B. & Blaise, C., 1998a. Genotoxic substances in the St.Lawrence system I: industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St.Lawrence, St Maurice and Saguenay Rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2): 286-303.

- White, P.A., Rasmussen, J.B. & Blaise, C., 1998b. Genotoxicity substances in the St. Lawrence system II: extracts of fish and invertebrates from the St. Lawrence and Saguenay Rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(2): 304-316.
- Willey, H.S. & Wallace, R.A., 1981. Multiple vitellogenins in *Xenopus laevis* give rise to multiple forms of the yolk proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 256(16): 8626-8634.
- Wolin, E.M., Laufer, H. & Albertini, D.F., 1973. Uptake of the yolk protein, lipovitellin, by developing crustacean oocytes. *Developmental Biology*, 35(1): 160-170.
- Wootton, A.N., Herring, C., Spry, J.A., Wiseman, A., Livingstone, D.R. & Goldford, P.S., 1995. Evidence for the existence of cytochrome P450 gene families (CYP1A, 3A, 4A, 11A) and modulation of gene expression (CYP1A) in the mussel *Mytilus* spp. *Marine Environmental Research*, 39(1-4): 21-26.
- Xu, R.A. & Barker, M.F., 1990. Annual changes in the steroid levels in the ovaries and the pyloric caeca of *Sclerasterias mollis* (Echinodermata: Asteroidea) during the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95A(1): 127-133.
- Yano, I., 1987. Effect of 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone on vitellogenin secretion in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Aquaculture*, 61(1): 49-57.
- Yano, I. & Chinzei, Y., 1987. Ovary is the site of vitellogenin synthesis in kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86B(2): 213-218.
- Yano, I., Krol, R.M., Overstreet, R.M. & Hawkins, W.E., 1996. Route of egg yolk protein uptake in the oocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 125: 773-781.
- Zandee, D.I., Kluytmans, J.H., Zurburg, W. & Pieters, H., 1980. Seasonal variations in

biochemical composition of *Mytilus edulis* with reference to energy metabolism and gametogenesis. *Netherlands Journal of Sea Research*, 14(1): 1-29.

Zou, E. & Fingerman, M., 1997. Effects of estrogenic xenobiotics on molting of the water flea, *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 38(3): 281-285.

## **ANNEXES**

## ANNEXE 1

### PROTOCOLE DE DOSAGE DES ACIDES NUCLÉIQUES AVEC LE THIAZOLE ORANGE

L'eau nanopure et les contenants utilisés pour les dosages ont été autoclavés avant leur utilisation. Les lectures de fluorescence ont été réalisées à température ambiante en utilisant un fluorimètre Perkin Elmer LS50B avec une fente de 3 mm pour la longueur d'onde d'excitation de 510 nm et une fente de 5 mm pour la longueur d'onde d'émission de 527 nm. La taille optimale des fentes tout comme la valeur optimale de la longueur d'onde d'excitation et d'émission sont propres au fluorimètre du laboratoire et ont été déterminées avec la solution de TO et à température ambiante puisque la fluorescence du TO varie avec la température.

Les solutions nécessaires au protocole ont été préparées comme suit:

- le tampon de Tris-calcium (Tris-Ca): 0,1 M NaCl, 0,1 M Tris-Ca,
- la solution de TO: 21 mM dans du tampon Tris-Ca,
- la solution d'héparine: 16,5 unités par mL diluées dans du tampon Tris-Ca,
- la solution d'ARNase: 12 unités d'ARNase de type III-A (Sigma, 5125) dans du Tris-Ca,
- la solution standard d'ADN: ADN de type 1 de thymus de veau (Sigma D1501) dans du tampon Tris-Ca,
- la solution standard d'ARN: ARN de levure (Sigma R7125) dans du tampon Tris-Ca.



Le protocole de dosage se déroule comme suit:

a) préparation des échantillons

Les gonades (100 à 200 mg) ont été homogénéisées dans 5 mL de tampon Tris-Ca et centrifugées 10 minutes à 3000 g pour recueillir le surnageant.

b) mesure de la fluorescence des acides nucléiques totaux:

- 1) ajouter à 1,7 mL de Tris-Ca, 0,5 mL de la solution d'héparine et 0,5 mL de surnageant,
- 2) ajouter 0,3 mL de la solution de TO et incuber dans un bain à 25°C jusqu'à ce que la température des échantillons ait atteint la température ambiante, puis faire les lectures de fluorescence

c) mesure de la fluorescence de l'ADN:

- 1) ajouter à 1,2 mL de Tris-Ca, 0,5 mL de la solution d'héparine, 0,5 mL de surnageant et 0,5 mL de la solution d'RNAse et incuber 20 minutes à 37°C
- 2) ajouter 0,3 mL de la solution de TO, incuber dans un bain à 25°C jusqu'à ce que la température des échantillons ait atteint la température ambiante et faire les lectures de fluorescence.

Les fluorescences résiduelles (bruit de fond) de l'homogénat seul (0,5 mL + 2,5 mL de Tris-Ca) d'une part, et de l'ensemble des réactifs utilisés pour le dosage d'autre part (0,5 mL de solution d'héparine + 0,3 mL de la solution de TO + 2,2 mL de Tris-Ca), ont été déterminées pour être soustraites aux valeurs déterminées pour le dosage des acides nucléiques totaux et de l'ADN des échantillons.

## ANNEXE 2

**RÉACTIONS CROISÉES DES ANTISÉRUM FOURNIS PAR LA COMPAGNIE  
CAYMAN DANS LES TROUSSE DE DOSAGE DE LE 17 $\beta$ -ŒSTRADIOL ET  
DE LA TESTOSTÉRONNE**

- réactivités croisées avec l'antisérum anti-17 $\beta$ -œstradiol (catalog No. 582251):

- 17-œstradiol 100 %
- 17 $\beta$ -œstradiol-3-glucoronide 17 %
- œstrone 4 %
- œstriol 0,57 %
- testostérone 0,1 %
- 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone 0,1 %
- 17 $\alpha$ -œstradiol 0,07 %
- progestérone 0,03 %

- réactivités croisées avec l'antisérum anti-testostérone (catalog No. 582701):

- testostérone 100 %
- 5 $\alpha$ -dihydrotestostérone 21 %
- 11-cétotestostérone 12,4 %
- 5 $\beta$ -dihydrotestostérone 10 %
- androstènedione 3,6 %
- 11-hydroxytestostérone 1,2 %
- 5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ ,17 $\beta$  diol 0,4 %
- 5 $\alpha$ -androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$  diol 0,2 %

5 $\beta$  androstane-3 $\alpha$ ,17 $\beta$  dione 0,08 %

### ANNEXE 3

#### **OBJECTIFS ET CONDITIONS EXPÉRIMENTALES LORS DE L'EXPOSITION DE TROIS SÉRIES DE MYES AU 17 $\beta$ -ŒSTRADIOL DANS LE BUT D'ISOLER DES PROTÉINES DE TYPE VITELLINE INDUCTIBLES CHEZ *MYA ARENARIA*.**

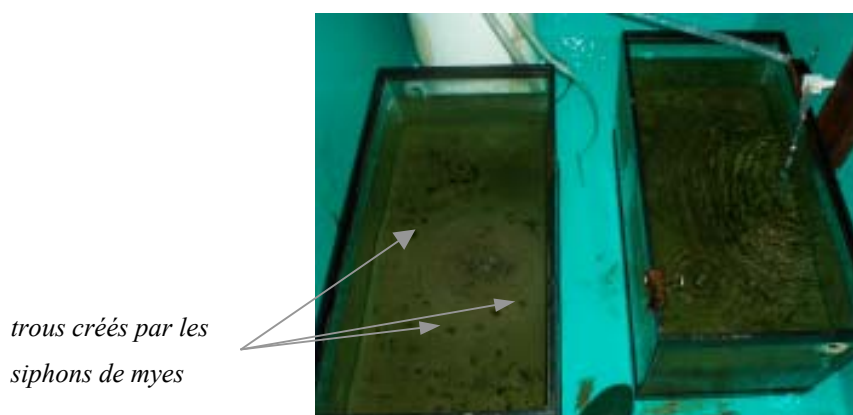
Ces expériences ont débuté en février 2002 avec un premier groupe de myes alors que celles-ci avaient été échantillonnées en décembre 2001 dans la baie de Métis sur Mer en l'absence exceptionnelle de glace sur les rives du Saint-Laurent. Il était important qu'elles ne soient plus physiologiquement en diapose et que leurs réserves énergétiques soient suffisantes pour répondre à une induction de synthèse de vitelline(s). Avant de les exposer au 17 $\beta$ -œstradiol, les myes de ce premier groupe ont dû être acclimatées en augmentant la température de l'eau des aquariums dans lesquelles elles étaient enfouies dans du sédiment et en les alimentant. Plus tard, d'autres myes ont été échantillonnées au printemps et ont également été placées dans des conditions de température et d'alimentation optimale pour favoriser leur métabolisme. Il fallait également essayer de trouver la fréquence d'exposition et la dose maximale (et réaliste) les plus adéquates pour ne pas provoquer une trop grande mortalité chez les organismes ce qui aurait réduit la quantité de tissu que nous aurions pu récupérer et donc potentiellement la quantité de vitelline(s). Différentes conditions expérimentales ont ainsi été testées en réalisant au total 3 séries d'exposition de myes au E2 dont les objectifs et les conditions expérimentales sont décrites ci-dessous.

*Objectifs de la première série de myes exposées au 17 $\beta$ -œstradiol pour isoler les protéines de type vitelline chez Mya arenaria:*

- exposer une première série de myes au E2 sur une période plus longue que 48h et avec des injections répétées de 17 $\beta$ -œstradiol

*Conditions expérimentales pour cette exposition:*

- échantillonnage de 100 myes à Métis sur Mer le 21 décembre 2001 alors que les myes sont en développement
- répartition des myes dans deux aquariums de 45 L contenant du sédiment de Métis sur Mer tamisé à environ 0,5 mm dans lequel elles sont enfouies (Figure A)
- alimentation des aquariums en eau de mer pompée dans le Saint-laurent dont la température ne dépasse pas 1°C.
- acclimatation des myes dans un aquarium pour favoriser la maturation de la gonade et la synthèse naturelle de protéine(s) de type vitelline(s) afin de constituer un stock de gonade contenant la ou des vitellines pour une purification ultérieure:
  - augmentation moyenne de la température de 1°C par jour jusqu'à atteindre la température de 10°C
  - alimentation avec de la spiruline
- les myes acclimatées sont disséquées après un mois et demi d'acclimatation (du 7 février au 25 mars) et après avoir vérifié par un examen histologique que le développement des ovocytes était suffisant pour que des vitellines soient présentes
- exposition au 17 $\beta$ -œstradiol de myes non acclimatées pour induire la production de vitellines dans le but de les isoler par électrophorèse
- exposition au E2 réalisée dans les conditions décrites dans le tableau A.



**Figure A:** Photographie des aquariums utilisés durant l'exposition des myes au  $17\beta$ -œstradiol dans le but de purifier les protéines de type vitellines.

**Tableau A:** Conditions expérimentales lors de l'exposition au  $17\beta$ -œstradiol (E2) du premier groupe de myes dans le but de purifier dans la gonade la ou les protéines de type vitelline dont la synthèse est inductible par les œstrogènes.

durée de l'exposition	conditions de l'expérience	dose de E2	myes exposées	myes témoins
		fréquence des injections		
20 jours	aquarium de 10 L débit d'eau $\sim 0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	50 nmoles tous les 3 jours	10	10
		4 injection au total		
9 jours	aquarium de 10 L débit d'eau $\sim 0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$	100 nmoles tous les 3 jours	11	8
		3 injections au total		

*Objectifs de la deuxième série de myes exposées au  $17\beta$ -œstradiol:*

- exposer des myes n'ayant pas subi une longue période de captivité préalable à l'expérience
- enfouir les myes dans du sable durant la période d'exposition pour minimiser le stress et réduire la dépense énergétique engendrée par l'allongement du siphon

lorsque les organismes sont placés dans l'eau comme pour l'exposition de la première série de myes

- réduire le temps entre les injections de E2 par rapport à l'exposition de la première série de myes
- augmenter la dose administrée sur une courte période de temps tout en allongeant la période post-injection pour favoriser l'apparition d'un potentiel effet inducteur sur la synthèse des protéines dans la gonade
- alimenter les myes durant l'exposition pour réduire l'effet du stress sur les réserves énergétiques induit par les conditions expérimentales et l'exposition au E2.

*Conditions expérimentales pour la deuxième série de myes exposées au 17 $\beta$ -œstradiol:*

- échantillonnage de 200 myes à Métis sur Mer le 29 avril 2002 et dissection de 93 myes pour disposer de gonades en développement
- acclimatation des myes restantes pendant 3 jours, enfouies dans du sable commercial dans les aquarium de 45 litres alimentés en eau (2 L·min.<sup>-1</sup>).
- exposition au E2 réalisée dans les conditions décrites dans le tableau B.

**Tableau B:** Conditions expérimentales lors de l'exposition au 17 $\beta$ -œstradiol du deuxième groupe de myes dans le but de purifier dans la gonade la ou les protéines de type vitelline dont la synthèse est inductible par les œstrogènes.

<b>durée de l'exposition</b>	<b>Conditions de l'expérience</b>	<b>dose de E2</b>	<b>myes exposées</b>	<b>myes témoins</b>
12 jours (j)	myes enfouies dans le sable débit d'eau ~ 2 L·min. <sup>-1</sup> alimentation avec 2,5 g de spiruline à j 6, j 7, j 10 température ~ 7,1 et 8°C salinité ~ 25,9 à 29,8 ppm	100 nmoles E2 injection à j 0, j 3, j 4	45	36

*Objectifs de la troisième série de myes exposées au 17 $\beta$ -œstradiol:*

- augmenter la période d'acclimatation par rapport à la série précédente
- augmenter la température de l'eau à 7°C qui était la température du sédiment au moment de l'échantillonnage des myes pour favoriser la maturation de la gonade
- augmenter la durée de l'exposition pour favoriser l'apparition d'un effet sur la maturation de la gonade
- augmenter la période de temps entre chaque injection pour réduire le stress induit par l'injection et la manipulation des myes sorties puis replacées dans le sédiment pour chaque injection
- alimenter les myes en spiruline tous les 3 jours pour minimiser l'utilisation des réserves énergétiques en réponse au stress induit par la captivité, les manipulations nécessaires et les injections nécessaires à l'exposition au E2.

*Conditions expérimentales pour la troisième série de myes exposées au 17 $\beta$ -œstradiol:*

- échantillonnage de 120 myes à Métis sur Mer
- acclimatation des myes pendant 8 jours à une température de 7°C (augmentation de 1,5°C au bout de 2 et 4 jours de captivité) et alimentation avec 2,5 g de spiruline tous les 3 jours
- exposition au E2 dans les conditions décrites dans le tableau C.

**Tableau C:** Conditions expérimentales lors de l'exposition au  $17\beta$ -œstradiol du troisième groupe de myes dans le but de purifier dans la gonade la ou les protéines de type vitelline dont la synthèse est inductible par les œstrogènes.

<b>durée de l'exposition</b>	<b>conditions de l'expérience</b>	<b>dose de E2 fréquence des injections</b>	<b>myes témoins</b>	<b>myes exposées au E2</b>
17 jours (j)	myes enfouies dans le sable débit d'eau $\sim 2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ alimentation avec 2,5 g de spiruline à j 6, j 7, j 10 température $\sim 7,1$ et $8,0^\circ\text{C}$ salinité $\sim 24,6$ à $29,8$ ppm	100 nmoles E2 injection à j 0, j 7, j 12	36	45



NOM : GAUTHIER-CLERC

PRENOM : Sophie

DATE DE NAISSANCE : 6 avril 1973

LIEU DE NAISSANCE : LYON (69) (France)

ADRESSE : 2 allée Colette, 69140 RILLIEUX La Pape

DIRECTEURS DE THESE : PELLERIN Jocelyne et AMIARD Jean-Claude

TITRE DE LA THESE :

**ACTIVITÉ VITELLOGÉNIQUE ET STÉROÏDIENNE CHEZ *MYA ARENARIA* (MOLLUSQUE BIVALVE) DURANT LA GAMÉTOGÈSE ET EN RÉPONSE À UNE EXPOSITION AU 17 $\beta$ -ŒSTRADIOL.**

RESUME :

*Mya arenaria* est un bivalve marin endobenthique et ubiquiste. Les connaissances écophysiologiques sur les changements biochimiques relatifs à la gamétogenèse et l'implication des hormones stéroïdiennes dans le contrôle hormonal de cette dernière sont encore limitées chez cette espèce. Cette thèse de doctorat rapporte de nouvelles connaissances sur le processus vitellogénique et la présence d'hormones stéroïdiennes (testostérone et 17 $\beta$ -œstradiol) dans la gonade des myes durant la gamétogenèse. L'accroissement du diamètre des ovocytes a permis de définir une séquence vitellogénique durant laquelle l'augmentation des concentrations en ADN et en ARN est significative et l'augmentation de la quantité de protéines de réserve (>400 kDa) est également effective. Les hormones stéroïdiennes apparaissent impliquées dans le contrôle hormonal de la gamétogenèse bien que leurs concentrations soient comparables chez les deux sexes et que leurs interactions avec les neurohormones restent à définir.

MOTS CLES :

Bivalve marin  
Mya  
Vitellogenèse  
Stéroïdogénèse  
Vitellines  
Testostérone  
17 $\beta$ -œstradiol

TITLE :

**VITELLOGENIC AND STEROIDOGENIC ACTIVITIES IN THE SOFT-SHELL CLAM *MYA ARENARIA* DURING GAMETOGENESIS AND AFTER AND EXPOSURE TO ESTRADIOL-17B.**

ABSTRACT :

*Mya arenaria* is a marine bivalve whose gametogenesis is not very well described although it is well commercially exploited and used as a bioindicator in ecotoxicology. Then we were interested in biochemical changes occurring during the oocyte growth called vitellogenesis and we also investigated the potential involvement of steroids (testosterone and estradiol-17 $\beta$ ) in the hormonal control of gametogenesis. Our results showed significant increases of RNA and DNA content in clam gonad during the increase of the oocyte diameter and a growing quantity of storage proteins of high molecular weight (>400 kDa) also called vitellin-type proteins. As expected, we noticed variations in steroid concentrations all along gametogenesis. Steroids must play a role in the hormonal control of clam reproduction although it can not be define here, especially in relation with neurohormones whose involvement is highly significant in the regulation of physiological processes of invertebrates.