

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

**RÔLE DE LA PROGESTÉRONE DANS LA MATURATION SEXUELLE DE MYA
ARENARIA ET ÉTUDE DE L'EFFET D'UN PERTURBATEUR ENDOCRINIEN : LE
TRIBUTYLÉTAÏN (TBT) SUR LE NIVEAU DES HORMONES STÉROÏDIENNES**

THÈSE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale CHIMIE BIOLOGIQUE

Discipline Océanographie

Spécialité ECOTOXICOLOGIE

*présentée
et soutenue publiquement par*

Ahmed SIAH

le 17 septembre 2003, devant le jury ci-dessous

<i>Président</i>	M. PELLETIER Emilien, Professeur, Université du Québec à Rimouski
<i>Rapporteurs</i>	M. PELLETIER Emilien, Professeur, Université du Québec à Rimouski M. LEBOULENGER François, Professeur, Université du Havre
<i>Examineurs</i>	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**

Les principaux objectifs de cette étude étaient de mettre en évidence l'influence de la progestérone sur la gamétogenèse et d'étudier l'effet du tributylétain (TBT) sur le niveau des hormones sexuelles (progestérone, testostérone et 17β -estradiol) chez *Mya arenaria*. Des études histologiques ont montré que les myes femelles de l'Anse à l'Orignal présentaient une maturation sexuelle précoce, avec une ponte en août et septembre 1998, alors que les mâles étaient au stade mature (préponte) pendant cette période. Cette période de forte activité gamétogénique est caractérisée par une diminution du niveau en lipides gonadiques. Ces lipides peuvent être utilisés comme source énergétique pour la gamétogenèse ou comme précurseurs de synthèse des hormones stéroïdiennes.

Après caractérisation de la progestérone dans la gonade chez *Mya arenaria*, un pic de cette hormone en relation avec la période de maturation sexuelle a été mesuré. Ces résultats démontrent, pour la première fois, que la progestérone pourrait intervenir dans la régulation de la gamétogenèse chez *Mya arenaria*. Une diminution du niveau de la progestérone dans la gonade aurait probablement une répercussion sur la maturation des cellules germinales.

Le second volet de cette étude est de vérifier si la présence de métaux lourds et de composés organoétains dans les gonades pouvaient affecter la maturation sexuelle et le niveau de progestérone gonadique chez les myes échantillonnées dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent. Les organismes récoltés proche du port de Rimouski présentent des concentrations élevées en tributylétain (TBT), dibutylétain (DBT) et cadmium (Cd) comparativement à l'Anse à l'Orignal et Les Capucins. Lors d'un suivi saisonnier *in situ* de la reproduction chez *Mya arenaria*, aucune mye de Rimouski n'a été observée au stade mûr et de ponte. Par contre, au cours de la même période d'échantillonnage, les gonades des

myes de l'Anse à l'Original étaient au stade mûr et de ponte. De plus, l'indice gonadosomatique et l'indice de maturité des organismes de Rimouski étaient plus faibles comparativement à l'Anse à l'Original. Des observations histologiques ont montré que quelques gonades de myes de Rimouski étaient dépourvues de cellules germinales. Comparativement à l'Anse à l'Original, le niveau de la progestérone est huit fois inférieur dans les gonades des myes prélevées à Rimouski. Le délai de la maturation sexuelle constaté chez les myes de Rimouski semblerait être lié aux faibles niveaux de la progestérone mesurés chez ces organismes. La présence des perturbateurs endocriniens tels que le TBT et DBT dans la gonade de ces myes pourrait être la cause des teneurs faibles en progestérone.

L'effet du TBT sur le niveau des hormones sexuelles chez *Mya arenaria* a été expérimenté en mésocosmes. Les mésocosmes ont été contaminés à différentes concentrations nominales: 0, 0.1, 1, 10 et 100 ng TBTCI par litre d'eau de mer. En parallèle, un suivi saisonnier des niveaux en progestérone, testostérone et 17 β -oestradiol a été réalisé chez les myes de l'Anse à l'Original. Chez les femelles, les trois hormones présentent un pic en septembre (stade indifférent) alors que chez le mâle, le niveau du 17 β -oestradiol est élevé au stade de ponte (en juillet).

Les organismes exposés à une contamination nominale de 100 ng TBTCI/L renferment dans leur gonade 491 ng Sn (TBT)/g (poids sec) après deux mois d'exposition et 1031 ng Sn/g après trois mois d'exposition. Les niveaux de testostérone augmentent de 50% chez les femelles exposées à 10 et 100 ng TBTCI/L après un mois d'exposition suivi par une augmentation du niveau en 17 β -oestradiol après trois mois d'exposition

comparativement aux contrôles. Chez les mâles, l'effet du TBT est moins important comparativement aux femelles. Le niveau du 17β -oestradiol augmente significativement après trois mois d'exposition à 100 ng TBTCI/L. De plus, aux fortes concentrations de contamination (100 ng TBTCI/L et après trois mois d'exposition), des alvéoles dépourvues en cellules germinales ont été observées.

En perspective, des études sur les mécanismes d'action du TBT sur la stéroïdogénèse sont nécessaires. L'analyse de l'expression des gènes impliqués dans la stéroïdogénèse et induite par le TBT pourrait présenter une nouvelle avenue de recherche pour la compréhension des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens tels que le TBT.

ABSTRACT

The goals of this study were to examine the link between progesterone and gametogenesis and Tributyltin (TBT) effects on steroid hormones (progesterone, testosterone and 17β -estradiol) in *Mya arenaria*. In August and September 1998, the female gonads were already in spawning stage while the male gonads were still in the ripe stage. In both gonads, the gonadal lipid reserves were depleted in this period of active gametogenesis. These lipids could be used as a substrate for the steroid hormones synthesis. Progesterone has been characterized in the gonad of *Mya arenaria* and for the first time the link has been established between the gametogenesis cycle and the level of progesterone in this species. The progesterone levels, for both sexes, showed a peak in September. We can therefore hypothesize that this hormone plays a key role in the regulation of gametogenesis cycle. Also, we can postulate that a perturbation of the progesterone level in the gonad by contaminants can cause a delay of the sexual maturation.

The second goal of this study was to verify if heavy metals and organotins could affect sexual maturation in *Mya arenaria* collected in the South coast of the St Lawrence River maritime estuary. Clams sampled near the Rimouski Harbor showed high levels of TBT, DBT and Cd in their gonad tissues in comparison to those from Anse à l'Original and Les Capucins. Our histological analysis has shown that none individual collected achieved the ripe and spawning stage during the period of sampling in Rimouski, while the gametogenesis was active in Anse à l'Original. This delay in the sexual maturation in *Mya arenaria* from Rimouksi was characterized by a lower gonado-somatic index and maturity index. Furthermore, our histological observations have shown that the gonads of clams

from the harbour site were devoid of mature germ cells. The level of progesterone in the gonad of *Mya arenaria* was 12% of those of levels found in Anse à l'Original. Inhibition of synthesis of progesterone by the presence of endocrine disruptors as TBT and DBT in the Rimouski gonad clams may cause the delay in the sexual maturation.

The hypothesis that TBT can cause the alterations of sex steroid hormones in clams constitutes the third part of this study. The experiments were carried out by using a mesocosm system. Flow-trough exposure experiments of TBTCI at nominal concentrations 0, 0.1, 1, 10 and 100 ng TBTCI/L of sea water. In the female gonads, progesterone, testosterone, and 17β -estradiol levels from Anse à l'Original showed a peak in September (indifferent stage). Whereas in males, 17β -estradiol levels were higher in spawning stage (July) in comparison to indifferent stage (August and September). The increase of these sex steroid hormones coincides with high sediment temperature and with the proliferation and differentiation of the germ cells. These data could suggest that temperature could act as a stimulus for steroid hormones synthesis. When *Mya arenaria* was exposed to 100 ng TBTCI/L we obtained an accumulation of 491 ng of TBT as Sn/g gonad dry weight for a period of two months and of 1031 ng TBT as Sn/g gonad dry weight after three months of exposure. Mesocosms experiments have shown an increase of testosterone by 50% in August followed by an increase of 17β -estradiol between September and October in female gonads exposed to 10 and 100 ng TBTCI/L in comparison to the controls. In males, 17β -estradiol levels were significantly higher after three months of exposure to 100 ng TBTCI/L as nominal concentration. Furthermore, histological observations showed that gonads of clams exposed to 100 ng TBTCI/L were devoid of mature germ cells as observed

in gonads of the clams from Rimouski. To better understand the mechanism by which the TBT causes the hormonal disturbance in the gonads of *Mya arenaria*, further studies are required by the use of sensitive molecular tools.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
RÉSUMÉ	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>
ABSTRACT	<i>iv</i>
TABLE DES MATIÈRES	<i>vii</i>
LISTE DES FIGURES	<i>x</i>
LISTE DES TABLEAUX	<i>xiv</i>
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION	1
1.1. Stéroïdogénèse	2
1.2. La régulation hormonale de la gamétogenèse chez les invertébrés	9
1.2.1. La régulation neuroendocrinienne de la gamétogenèse chez les mollusques bivalves	9
1.2.2. Une régulation stéroïdienne de la gamétogenèse chez les mollusques bivalves	11
1.3. Les perturbateurs endocriniens	12
1.3.1. Définitions	12
1.3.2. Contamination du milieu marin par les perturbateurs endocriniens et conséquences sur les organismes exposés	13
1.3.3. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens	19
1.4. Mya arenaria	28
1.5. Problématique	34
1.6. Objectifs et hypothèses de recherche	38
1.7. Références	39
CHAPITRE 2	51
SEASONAL GONAD PROGESTERONE PATTERN IN THE SOFT-SHELL CLAM MYA ARENARIA	51
2.1. Résumé	52
2.2. Abstract	53
2.3. Introduction	54
2.4. Materials and methods	56
2.4.1. Animals	56
2.4.2. Gonado-somatic index	56
2.4.3. Histological examination	58
2.4.4. Lipids analysis	58
2.4.5. Steroid extraction from homogenates	59
2.4.6. LC-MS Conditions	60

2.4.7. Enzyme ImmunoSorbent Assay	62
2.4.8. Statistical analysis	63
2.5. Results	63
2.5.1. Histological data	63
2.5.2. Variation of gonad lipid levels	67
2.5.3. Detection of progesterone using LC-MS	67
2.5.4. Gonado-somatic index and Progesterone trends in the gonads of <i>Mya arenaria</i>	70
2.6. Discussion	73
2.7. References	78
CHAPITRE 3	82
<i>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).</i>	82
3.1. Résumé	83
3.2. Abstract	84
3.3. Introduction	85
3.4. Materials and Methods	86
3.4.1. Sampling	86
3.4.2. Gonado-Somatic Index	87
3.4.3. Histological examination	87
3.4.4. Steroid extraction	89
3.4.5. Enzyme ImmunoSorbent Assay	90
3.4.6. Heavy metals analysis	90
3.4.7. Lipid analysis	91
3.4.8. Organotins analysis	91
3.4.9. Statistical analysis	92
3.5. Results	93
3.5.1. Histological data	93
3.5.2. Gonado-somatic index	97
3.5.3. Progesterone levels in the gonads	97
3.5.4. Heavy metals concentration in the gonads	100
3.5.5. Organotin concentrations in the gonads	102
3.5.6. Histopathology	102
3.6. Discussion	105
3.7. Acknowledgments	109
3.8. References	109
CHAPITRE 4	113
<i>TBT EFFECTS ON STEROID HORMONES IN <i>Mya arenaria</i></i>	113
4.1. Résumé	Erreur ! Signet non défini.
4.2. Abstract	Erreur ! Signet non défini.

4.3. Introduction	Erreur ! Signet non défini.
4.4. Materials and methods	Erreur ! Signet non défini.
4.4.1. Mesocosm experiments	Erreur ! Signet non défini.
4.4.2. Histological examination	Erreur ! Signet non défini.
4.4.3. Steroid extraction	Erreur ! Signet non défini.
4.4.4. Enzyme ImmunoSorbent Assay	Erreur ! Signet non défini.
4.4.5. TBT analysis	Erreur ! Signet non défini.
4.4.6. Statistical analysis	Erreur ! Signet non défini.
4.5. Results	Erreur ! Signet non défini.
4.5.1. Sediment temperature	Erreur ! Signet non défini.
4.5.2. Histological data	Erreur ! Signet non défini.
4.5.3. Organotin concentrations in the gonads	Erreur ! Signet non défini.
4.5.4. Steroid levels in the gonads	Erreur ! Signet non défini.
4.5.5. Histopathology	Erreur ! Signet non défini.
4.6. Discussion	Erreur ! Signet non défini.
4.7. References	Erreur ! Signet non défini.
CHAPITRE 5	114
DISCUSSION GÉNÉRALE	114
5.1. Rôle de la progestérone dans la maturation sexuelle chez <i>Mya arenaria</i>	115
5.2. Comparaison du niveau de la progestérone gonadique chez <i>Mya arenaria</i> échantillonnée dans différents sites de l'estuaire du Saint-Laurent.	120
5.3. Effets du TBT sur le niveau des hormones sexuelles chez <i>Mya arenaria</i> : Étude en mésocosmes	129
5.3.1. Niveau des hormones sexuelles en fonction du cycle reproducteur chez <i>Mya arenaria</i> de l'Anse à l'Orignal	131
5.3.2. Niveau des hormones sexuelles chez <i>Mya arenaria</i> exposée au TBT	132
5.4. Conclusions et perspectives	135
5.5. Références	142

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1: LA MOBILISATION DU CHOLESTÉROL VERS LES MITOCHONDRIES (MODIFIÉE DE GASNIER, 1999)	3
FIGURE 1.2: LA CONVERSION DU CHOLESTÉROL EN PRÉGNÉNONE (MODIFIÉE DE KAGAWA ET WATERMAN, 1995)	5
FIGURE 1.3: DEUX VOIES DE SYNTHÈSE DE LA TESTOSTÉRONE (MODIFIÉE DE CHERRADI ET AL., 1994)	6
FIGURE 1.4: AROMATISATION DES ANDROGÈNES EN OESTROGÈNES PAR LE COMPLEXE ENZYMATIQUE CYTOCHROME P-450 AROMATASE (MODIFIÉ DE KAGAWA ET WATERMAN, 1995)	8
FIGURE 1.5: CATION TRIBUTYLÉTAIN (TBT)	24
FIGURE 1.6: MYA ARENARIA (MOLLUSQUE : BIVALVE)	29
FIGURE 1.7: RÉGULATION DE LA GAMÉTOGÈNE CHEZ LA MOULE BLEUE (MYTILUS EDULIS)	35
FIGURE 2.1: MAP OF THE SAMPLING STATION, ANSE À L'ORIGINAL (QUÉBEC, CANADA), LOCATED ON THE SOUTH SHORE OF THE LOWER ST. LAWRENCE ESTUARY (MODIFIÉE DE ROSEBERRY, 1988)	57
FIGURE 2.2: PHOTOMICROGRAPHS OF SECTIONS OF FEMALE GONADS OF MYA ARENARIA	65
FIGURE 2.3: PHOTOMICROGRAPHS OF SECTIONS OF MALE GONADS OF MYA ARENARIA	66
FIGURE 2.3: PERCENTAGE OF FEMALES (A) AND MALES (B) IN EACH STAGE OF REPRODUCTIVE CYCLE	68
FIGURE 2.4: VARIATION OF LIPID CONCENTRATION IN THE GONADS OF MYA ARENARIA. EACH VALUE OF LIPID CONCENTRATION INDICATES THE MEAN +/- SE. P=0.05. A IS SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM B	69
FIGURE 2.5: FULL-SCAN MASS CHROMATOGRAMS OF M/Z 155-1100 (A) AND M/Z 314-316 (B) MOLECULAR WEIGHT FOR THE POSITIVE ION ESI-LC-MS ANALYSIS OF GONAD TISSUE EXTRACT	71

- FIGURE 2.6: FULL SCAN MASS SPECTRUM (A) AND MS/MS SPECTRUM (B) OF THE
PROGESTERONE FROM GONAD TISSUE EXTRACT _____ 72
- FIGURE 2.8: VARIATION IN THE GONADAL INDEX (A) AND LEVELS OF PROGESTERONE (B) IN
THE GONAD OF MYA ARENARIA MALES AND FEMALES. EACH VALUE OF
PROGESTERONE INDICATES THE MEAN $\pm$ SE. A IS SIGNIFICANTLY DIFFERENT
FROM B ($P=0.05$) _____ 74
- FIGURE 3.1: MAP OF THE ST. LAWRENCE AREA AND LOCATION OF THE SELECTED SITES: ANSE
À L'ORIGNAL (REFERENCE SITE), TROIS-PISTOLES, RIMOUSKI AND LES
CAPUCINS LOCATED ON THE SOUTH SHORE OF THE ST. LAWRENCE RIVER ____ 88
- FIGURE 3.2: PERCENTAGE OF MALES ($N=3$ TO 12) AND FEMALES ($N=4$ TO 13) IN EACH STAGE
OF THE REPRODUCTIVE CYCLE AND MATURITY INDEX OF MALES AND FEMALES IN
THE SAMPLING SITES, ANSE À L'ORIGNAL, LES CAPUCINS, TROIS-PISTOLES AND
RIMOUSKI _____ 94
- FIGURE 3.3: PERCENTAGE OF MALES (A) AND FEMALES (B) IN EACH STAGE OF THE
REPRODUCTIVE CYCLE IN THE DIFFERENT SITES AND FOR ALL THE SAMPLING
PERIODS _____ 96
- FIGURE 3.4: VARIATIONS IN THE GONADO-SOMATIC INDEX OF MYA ARENARIA MALE (A) ($N=2$
TO 14) AND FEMALE (B) ($N=3$ TO 15). EACH VALUE OF THE GONADO-SOMATIC
INDEX IS EXPRESSED AS THE MEAN $\pm$ S.E. AN ASTERISK (*) INDICATES THAT
VALUES ARE STATISTICALLY DIFFERENT FROM THE REFERENCE SITE, ANSE À
L'ORIGNAL FOR EACH MONTH OF SAMPLING, AT A LEVEL OF $P<0.05$ (ANOVA).
_____ 98
- FIGURE 3.5: VARIATION OF THE PROGESTERONE LEVELS IN THE GONADS OF MYA ARENARIA
MALE (A) ($N=2$ TO 5) AND FEMALE (B) ($N=2$ TO 5). EACH VALUE IS EXPRESSED
AS THE MEAN $\pm$ S.E. AN ASTERISK (*) INDICATES THAT VALUES ARE
STATISTICALLY DIFFERENT FROM THE REFERENCE SITE, ANSE À L'ORIGNAL AND
(**) FROM LES CAPUCINS FOR EACH MONTH OF SAMPLING, AT A LEVEL OF
 $P<0.05$ (ANOVA). _____ 99
- FIGURE 3.6: CONCENTRATIONS OF COPPER, ZINC, CADMIUM, LEAD, MERCURY, TBT, DBT
AND TOTAL BUTYLtin IN THE GONADS OF MYA ARENARIA FOR ANSE À
L'ORIGNAL, LES CAPUCINS, TROIS-PISTOLES AND RIMOUSKI SITES SAMPLED IN
AUGUST. EACH VALUE IS EXPRESSED AS THE MEAN $\pm$ S.E. AN ASTERISK (*)
INDICATES THAT VALUES ARE STATISTICALLY DIFFERENT FROM THE REFERENCE
SITE, ANSE À L'ORIGNAL FOR EACH MONTH OF SAMPLING, AT A LEVEL OF $P<0.05$
(STUDENT T-TEST). _____ 103

FIGURE 3.7: PHOTOMICROGRAPHS OF SECTIONS OF THE GONAD TISSUES OF RIPE FEMALE (A) FILLED WITH MATURE, SPHERICAL OOCYTES () AND MALE (B) FILLED WITH MATURE SPERMATOZOIDS () MYA ARENARIA FROM ANSE À L'ORIGINAL AND OF THE GONAD TISSUES OF MYA ARENARIA (C,D) FROM RIMOUSKI _____ 104

FIGURE 4.1: VARIATION OF SEDIMENT TEMPERATURE IN ANSE À L'ORIGINAL BETWEEN JULY AND OCTOBER 1999. EACH DATA POINT REPRESENTS THE VALUES OF SEDIMENT TEMPERATURES RECORDED EACH MONTH _____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.2: VARIATION OF SEDIMENT TEMPERATURE IN MESOCOSMS BETWEEN JULY AND OCTOBER 1999. EACH DATA POINT REPRESENTS THE MONTHLY AVERAGE OF VALUES RECORDED IN EACH MESOCOSM _____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.3: PERCENTAGE OF FEMALE AND MALE CLAMS FROM ANSE À L'ORIGINAL IN EACH STAGE OF THE REPRODUCTIVE CYCLE _____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.4: VARIATIONS OF MATURITY INDEX OF MYA ARENARIA MALES AND FEMALES OF BOTH THE CONTROL AND CONTAMINATED MESOCOSMS ____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.5: THE CONCENTRATIONS OF TBT AS NANOGRAMS OF SN PER GRAM DRY WEIGHT IN THE GONADS OF MYA ARENARIA OF BOTH THE CONTROL AND CONTAMINATED MESOCOSMS _____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.6: VARIATION IN THE LEVELS OF PROGESTERONE, TESTOSTERONE AND 17β -ESTRADIOL IN THE GONAD OF MYA ARENARIA MALES AND FEMALES SAMPLED IN ANSE À L'ORIGINAL. EACH VALUE INDICATES THE MEAN $\pm$ SE. A IS SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM B ($P=0.05$) _____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.7: VARIATION OF PROGESTERONE, TESTOSTERONE AND 17β -ESTRADIOL LEVELS IN THE GONADS OF MALE AND FEMALE MYA ARENARIA SAMPLED IN BOTH THE MESOCOSM CONTROL AND EXPOSED TO 0.1 NG OF TBTCL/L. EACH VALUE INDICATES THE MEAN $\pm$ SE _____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.8: VARIATION OF PROGESTERONE, TESTOSTERONE AND 17β -ESTRADIOL LEVELS IN THE GONADS OF MALES AND FEMALES MYA ARENARIA SAMPLED IN BOTH THE MESOCOSM CONTROL AND EXPOSED TO 1 NG OF TBTCL/L. EACH VALUE INDICATES THE MEAN $\pm$ SE _____ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.9: VARIATION OF PROGESTERONE, TESTOSTERONE AND 17β -ESTRADIOL LEVELS IN THE GONADS OF MALES AND FEMALES MYA ARENARIA SAMPLED IN BOTH THE MESOCOSM CONTROL AND EXPOSED TO 10 NG OF TBTCL/L. EACH VALUE INDICATES THE MEAN $\pm$ SE. ASTERISKS (*) INDICATE THAT VALUE IS

SIGNIFICANTLY DIFFERENT TO THE CONTROL AT $P=0.05$ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.10: VARIATION OF PROGESTERONE, TESTOSTERONE AND 17β -ESTRADIOL LEVELS IN THE GONADS OF MALES AND FEMALES *MYA ARENARIA* SAMPLED IN BOTH THE MESOCOSM CONTROL AND EXPOSED TO 100 NG OF TBTCL/L. EACH VALUE INDICATES THE MEAN $\pm$ SE. ASTERISKS (*) INDICATE THAT VALUE IS SIGNIFICANTLY DIFFERENT TO THE CONTROL AT $P=0.05$ **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 4.11: PHOTOMICROGRAPHS OF MICROSCOPIC SECTIONS (200x) OF THE GONADAL TISSUE OF RIPE FEMALE FILLED WITH MATURE, SPHERICAL OOCYTES (A) AND MALE (B) FILLED WITH MATURE SPERMATOZOIDS *MYA ARENARIA* FROM ANSE À L'ORIGINAL AND FROM THE MESOCOSM EXPOSED TO 100 NG TBT/L **ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.**

FIGURE 5.1 : CHROMATOGRAMMES DE STANDARD TESTOSTÉRONE (SIGMA) 0.01 PPM (A), D'EXTRAIT DE *MYA ARENARIA* (B) ET DU MÉLANGE DE L'EXTRAIT AVEC LE STANDARD (C). _____ 130

FIGURE 5.2: SCHÉMA HYPOTHÉTIQUE DE LA RÉGULATION DE LA MATURATION DES CELLULES GERMINALES PAR LA PROGESTÉRONE CHEZ *MYA ARENARIA* _____ 138

LISTE DES TABLEAUX

TABLE 2.1:	GRADIENT ELUTION USED FOR THE SEPARATION OF PROGESTERONE BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC (HPLC)	61
TABLE 2.2:	DESCRIPTION OF THE MALE AND FEMALE REPRODUCTIVE STAGES (TIRÉE DE COE ET TURNER, 1938).....	64
TABLEAU 5.1:	COMPARAISON DES CONCENTRATIONS EN TBT (NG SN/G EN POIDS HUMIDE) CHEZ DIFFÉRENTES ESPÈCES DE MOLLUSQUE BIVALVE	123

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Au cours des dix dernières années, plusieurs études ont démontré l'effet des molécules chimiques d'origine naturelle ou anthropique sur les systèmes endocriniens. Ces substances perturbatrices présentes dans l'environnement marin et leurs effets sont devenus une des cibles de la recherche en écotoxicologie marine. Ces xénobiotiques sont capables d'induire des perturbations sur le développement, la croissance et la reproduction des organismes exposés. Plusieurs molécules peuvent mimer ou perturber les mécanismes qui régulent les fonctions de la reproduction, essentielles pour la pérennité de l'espèce et le maintien de la population (Colborn et Clement, 1992).

Les systèmes endocriniens sont des mécanismes complexes qui coordonnent et régulent des fonctions physiologiques. Cette modulation endocrinienne est réalisée par l'intermédiaire de médiateurs chimiques (hormones) qui interagissent avec leurs récepteurs spécifiques présents soit sur la membrane cellulaire (catécholamines) soit à l'intérieur de la cellule (hormones stéroïdiennes). Fixés sur le récepteur, ces messagers déclenchent des réponses biologiques comme la croissance, le développement ou la reproduction. Les processus de la reproduction dont l'ovogenèse chez les femelles et la spermatogenèse chez les mâles, sont régulés par les hormones stéroïdiennes qui induisent la détermination du

système reproducteur, contrôlent le comportement reproducteur chez l'adulte ainsi que le développement des caractères sexuels secondaires s'il y a lieu.

1.1. Stéroïdogénèse

La première étape de la stéroïdogénèse est la conversion du cholestérol libre en prégnénolone, réaction étant réalisée dans la mitochondrie des cellules des mammifères. Cette étape, finement régulée par les gonadolibérines hypothalamiques, s'exerce par une mobilisation du cholestérol dans la mitochondrie (Figure 1.1) (Almahbobi et al., 1992). Les sources du cholestérol pour les cellules stéroïdogènes sont diverses dont la principale est l'endocytose du cholestérol d'origine alimentaire *via* les apolipoprotéines (Stocco, 2000).

La conversion du cholestérol (C_{27}) en prégnénolone (C_{21}), étape limitante de la stéroïdogénèse, est catalysée par le cytochrome P450_{scc} (Side Chain Cleavage) localisé dans la membrane interne mitochondriale. L'action des hormones hypophysaires s'exercent sur la disponibilité du cholestérol au cytochrome P450_{scc} en facilitant sa translocation à travers l'espace intermembranaire grâce à la protéine StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) (Stocco, 2000). Le cytochrome P450_{scc} catalyse trois étapes simultanées : deux étapes d'hydroxylation sur les carbones C_{20} et C_{22} et un clivage de la liaison C_{20} - C_{22} pour former le prégnénolone et l'isocapraldéhyde. Le 22 hydroxycholestérol et le 22, 20 dihydroxycholestérol sont les intermédiaires ainsi formés mais que l'on retrouve en faible quantité à cause de la grande efficacité de la conversion du cholestérol en

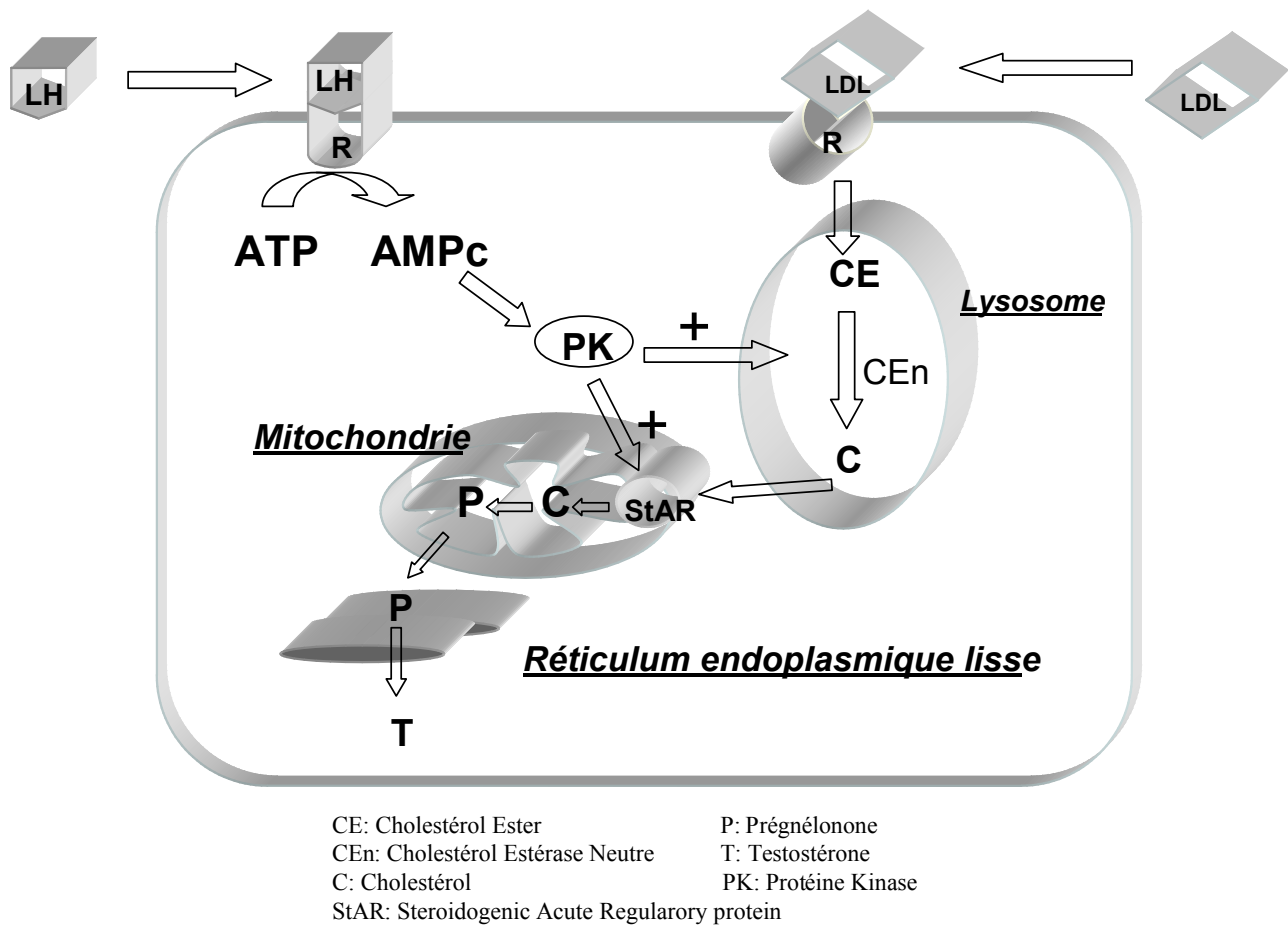


Figure 1.1: La mobilisation du cholestérol vers les mitochondries (modifiée de Gasnier, 1999)

prégnélonone (Figure 1.2) (Kagawa et Waterman, 1995). Ces réactions requièrent trois paires d'électrons, une pour chacune des trois réactions, apportées par le NADPH. Ces électrons sont fournis à la flavoprotéine (l'adrenodoxine réductase), ensuite à une protéine fer-soufre (l'adrenotoxine) qui joue un rôle de « navette » d'électrons. L'adrénotoxine reçoit les électrons de la flavoprotéine réduite et vient former un complexe avec le cytochrome P450_{scc} et transférer ces électrons à l'hémoprotéine (Kagawa et Waterman, 1995). Le cholestérol se fixe au cytochrome P450_{scc} et augmente ainsi l'interaction du complexe cytochrome P450_{scc}-adrénotoxine. Cependant, l'interaction du cytochrome P450_{scc} avec le cholestérol peut être affectée par les phospholipides membranaires en particulier les cardiolipides (Black et al., 1994).

La conversion de la prégnénonone en testostérone peut être réalisée à partir de deux voies : la voie Δ^5 où la fonction 3β est un groupement hydroxyl et la voie Δ^4 où cette fonction est une cétone (Figure 1.3) (Cherradi et al., 1994). Le passage de la voie Δ^5 vers Δ^4 implique le déplacement de la double liaison du noyau B vers le noyau A (isomérisation de Δ^5 vers Δ^4) et la conversion du groupe β -hydroxyl du carbone 3 en groupement cétone (déshydrogénation en 3β). Ces deux réactions sont catalysées par la même enzyme : la 3β HydroxyStéroïde Déshydrogénase-isomérase (3β -HSD). La prégnénonone, formée dans la mitochondrie, est convertie en progestérone par la 3β -HSD ou en 17-hydroxyprégnénonone par le cytochrome P450_{17 α} . La conversion du? prégnénonone en progestérone est favorisée

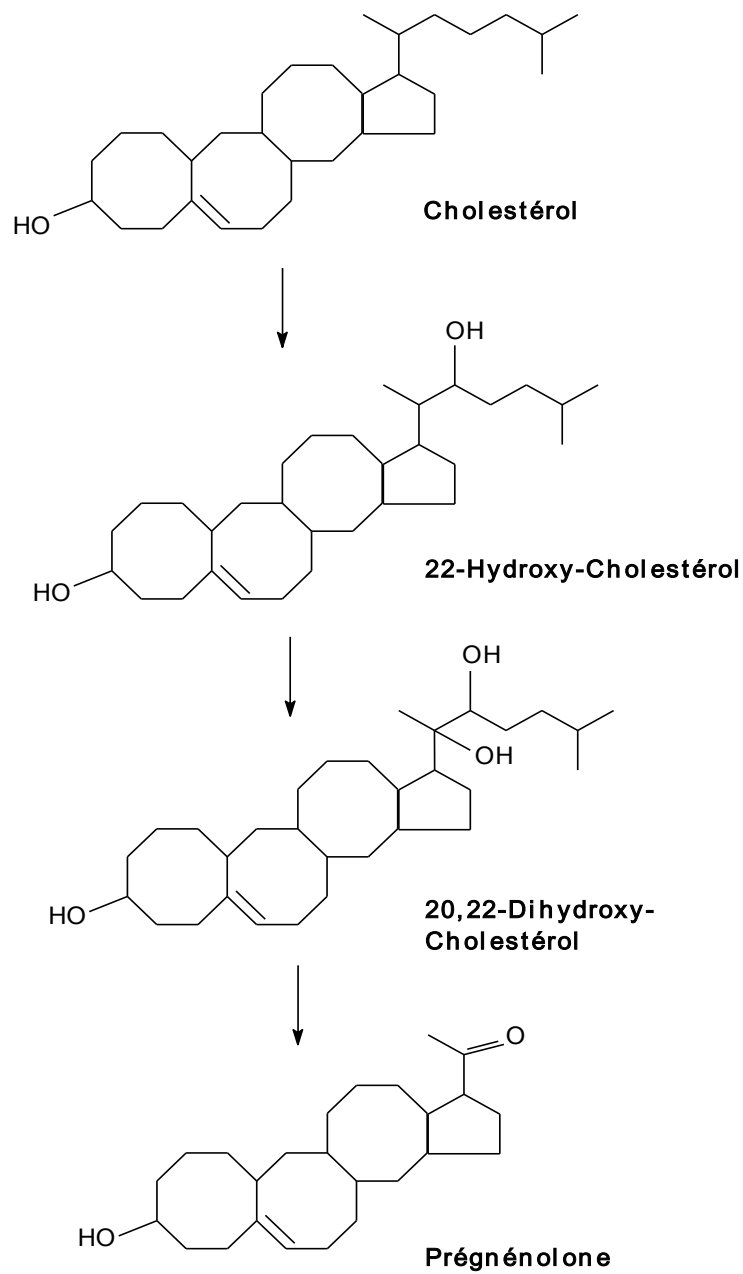


Figure 1.2: La conversion du cholestérol en prégnénolone (modifiée de Kagawa et Waterman, 1995)

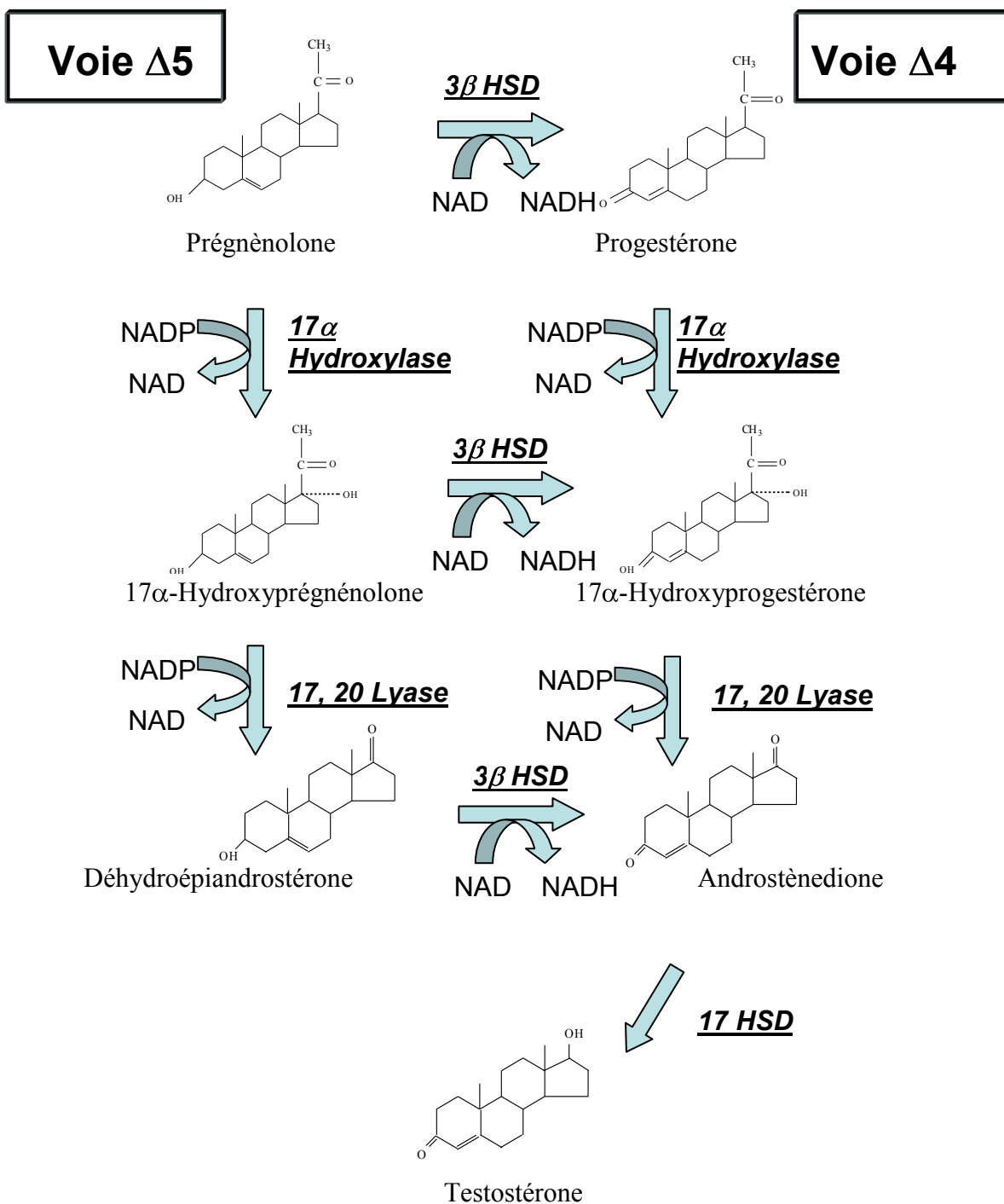


Figure 1.3: Deux voies de synthèse de la testostérone (modifiée de Cherradi et al., 1994)

par la présence de la 3β -HSD dans la mitochondrie et constitue ainsi la voie majeure de la formation des stéroïdes (Kagawa et Waterman, 1995).

L'aromatisation des androgènes en oestrogènes est réalisée à partir de trois hydroxylations enzymatiques. La première hydroxylation a lieu sur le groupement méthyl C_{19} pour former l'intermédiaire 19-hydroxy qui à son tour subit la deuxième hydroxylation sur le même C_{19} et produit un 19-aldéhyde (Simpson et al., 1994). La dernière hydroxylation du 19-aldéhyde en œstrogène est spontanée et non enzymatique. Pour chaque mole d'oestrogène formée, 3 moles de NADPH et 3 moles d'oxygène sont utilisées. Le système enzymatique qui intervient dans cette réaction est de type oxydase à fonction mixte (Simpson et al., 1994). L'androstènedione, le 19-hydroxyandrostènedione et le 19-oxoandrostènedione compétitionnent pour le même site de fixation au cytochrome P450. Ainsi, toutes les réactions d'aromatisation des androgènes en oestrogènes ont lieu sur le même site actif du complexe enzymatique cytochrome P450 aromatasase présent dans le réticulum endoplasmique lisse et faisant intervenir la NADPH cytochrome c réductase comme transporteur d'électron (Figure 1.4) (Kagawa et Waterman, 1995).

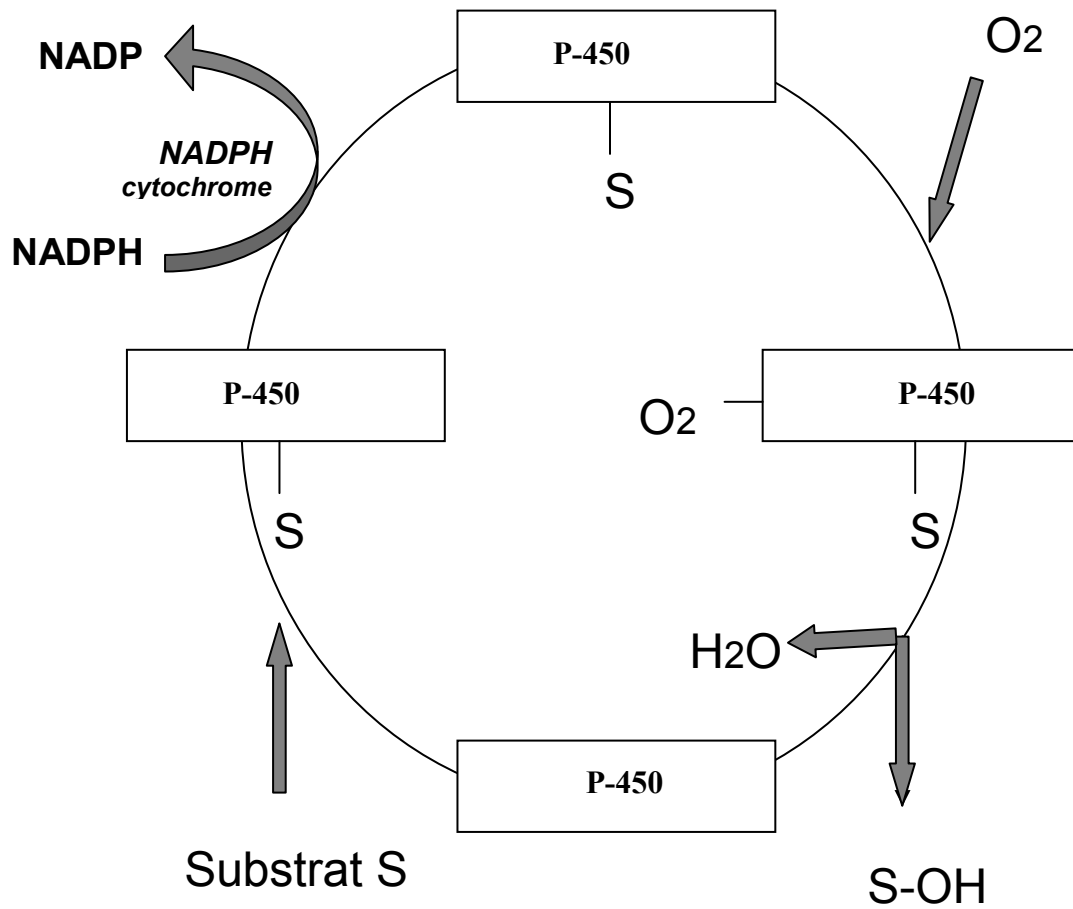


Figure 1.4: Aromatisation des androgènes en oestrogènes par le complexe enzymatique cytochrome P-450 aromatase (modifié de Kagawa et Waterman, 1995)

1.2. La régulation hormonale de la gamétogenèse chez les invertébrés

1.2.1. La régulation neuroendocrinienne de la gamétogenèse chez les mollusques bivalves

Chez les bivalves, l'activité gamétogénique est sous contrôle neuroendocrinien. Ce contrôle s'exerce principalement sur les cellules germinales par l'intermédiaire de neurohormones sécrétées par les ganglions nerveux. L'injection de la sérotonine (2mM) dans la gonade de *Spisula* a permis à Hiraï et al. (1988) d'obtenir la maturation des ovocytes. D'autre part, Kadaï et Koïde (1989) ont montré que la sérotonine, sécrétée par les ganglions nerveux au niveau de l'hémolymph, est responsable de la rupture de la vésicule germinative. D'autres amines biogéniques pourraient être aussi impliquées dans les processus de la maturation et de la ponte. Osada et al. (1987) ont décelé une augmentation significative de la dopamine au moment de l'émission des gamètes chez *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* et *Platinopecten yessoensis*.

Les facteurs externes tels que la température peuvent stimuler les décharges de ces neurohormones qui interviennent sur la ponte (Lubet et Mathieu, 1990). Osada et al. (1989) ont étudié les variations saisonnières des taux de prostaglandines et postulent que ces substances sont impliquées dans les mécanismes de la ponte chez *Platinopecten yessoensis*. Les concentrations en prostaglandines E1, E2 et E3 augmentent de façon significative au moment de la maturité sexuelle chez les mollusques bivalves *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* et *Platinopecten yessoensis* (Deridovich et Reunova, 1993). D'autre part, l'utilisation

de milieu de culture solide a permis d'élucider le mécanisme d'action des ganglions cérébroïdes sur les processus de la gamétogenèse (Lubet et Mathieu, 1990). Quatre types de cellules neurosécrétrices (type a1, a2, a3 et a4) ont été identifiées au niveau des ganglions nerveux chez *Mytilus edulis* (Illanes-Bucher et Lubet, 1980). Les ganglions cérébroïdes renferment à eux seuls 75% de ces cellules neurosécrétrices, en particulier les cellules de type a1 (Illanes-Bucher et Lubet, 1980). Le cycle neurosécrétoire de ces cellules est synchrone avec le cycle gamétogénique chez *Mytilus edulis* (Illanes-Bucher et Lubet, 1980). Ce synchronisme laisse supposer un rôle possible de ces cellules dans la régulation du cycle reproducteur chez *Mytilus edulis*. En effet, Mathieu et al. (1988) ont retrouvé aussi bien dans les ganglions cérébroïdes que dans l'hémolymphe de *Mytilus* la présence d'un facteur activateur de la mitose goniale : le GMSF (Gonial Mitosis-Stimulating factor). Les ganglions cérébroïdes déclencheraient la ré-initiation de la méiose bloquée pendant la prophase de la mitose au stade pachytène-diplotène et induiraient la prévitellogenèse et la vitellogenèse (Lubet et Mathieu, 1990). Récemment, Pazos et Mathieu (1999) ont montré d'une part chez *Crassostrea gigas* et *Mytilus edulis* que la GnRH stimule la synthèse de l'ADN gonadique et d'autre part la présence de récepteurs à la GnRH chez *Crassostrea gigas*. Probablement, les neurohormones agiraient sur les cellules folliculaires qui en retour sécrèteraient les hormones stéroïdiennes (Progestérone, Testostérone et 17β -oestradiol) (Peek et al., 1989). Ces stéroïdes interviendraient dans la maturation des cellules germinales (Pazos et Mathieu, 1999).

1.2.2. Une régulation stéroïdienne de la gamétogenèse chez les mollusques bivalves

Le cholestérol est le précurseur exclusif des hormones stéroïdiennes dont la biosynthèse chez *Mytilus edulis* a été étudiée par De Longcamp et al. (1974). Ces auteurs ont mis en évidence la présence chez ce bivalve des enzymes clés intervenant dans la biosynthèse des hormones stéroïdiennes en particulier la 3β HSD/ Δ_5 isomérase, C_{17-20} lyase, 17β HSD et la 5α réductase. Parmi les stéroïdes identifiés chez *Mytilus edulis*, c'est la progestérone suivie de l'androstènedione qui sont présents en fortes concentrations et dont les teneurs varient de manière saisonnière (Reis-Henriques et al., 1990). Selon Reis-Henriques et Coimbra (1990), les variations de la concentration en progestérone chez le mâle et la femelle sont identiques, suggérant ainsi que cette hormone joue le même rôle pour les deux sexes. Les pics de la concentration en progestérone ont lieu en juillet et octobre, ce qui coïncide avec les deux périodes où la gamétogenèse est active suggérant ainsi que la progestérone jouerait probablement un rôle sur la maturation des gamètes chez *Mytilus edulis* (Reis-Henriques et Coimbra, 1990).

Très peu de recherches ont été effectuées pour essayer de préciser le rôle physiologique des stéroïdes chez les bivalves. Néanmoins, Mori (1969) a établi une relation synchrone entre la maturation des gonades avec celle de l'activité 3β HSD. Il a alors formulé l'hypothèse d'un contrôle de la maturité sexuelle chez *Crassostrea gigas* par des hormones stéroïdiennes. Aubry (1962) a injecté de la testostérone, de l'oestradiol et la progestérone chez les gastéropodes pulmonés. Il a pu démontrer une activité stimulatrice de

la testostérone sur la spermatogenèse et inhibitrice sur l'oogenèse, alors que le 17 β -oestradiol a un effet inverse et que la progestérone stimule la maturation des cellules germinales chez les deux sexes.

1.3. Les perturbateurs endocriniens

1.3.1. Définitions

En 1998, une définition des perturbateurs endocriniens a été proposée par la CSTEE (Comité Scientifique sur la Toxicologie, l'Écotoxicologie et l'Environnement) en collaboration avec l'IPCS (International Programme on Chemical Safety Environmental Criteria) :

« Le perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange de composés qui altère le(s) fonction(s) du système endocrinien et par conséquent cause des effets néfastes sur la santé de l'organisme ou sa descendance ou sur la (les) population (s). Un perturbateur endocrinien potentiel est une substance exogène ou un mélange de composés qui possède les propriétés suspectées d'induire une perturbation endocrinienne sur l'organisme ou sa descendance ou la (les) population (s). »

La définition des PEs a été reprise en 1999 par le Canadian Environmental Protection Act (CEPA 1999, article 3, sous-section 43).

«Les substances perturbatrices d'hormone concernent les substances capables de perturber la synthèse, la sécrétion, le transport, la fixation, l'action ou l'élimination des hormones dans l'organisme ou sa progéniture, responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du développement ou du comportement de l'organisme.»

Cette définition inclut aussi bien les composés chimiques que les mélanges complexes de substances exogènes comme il a été précisé dans la définition du CSTEE. Au début des années 90 ont été répertoriés environ 50 composés « suspects » susceptibles de jouer un rôle de perturbateur endocrinien (Colborn et Clement, 1992). Actuellement, plus de 600 pesticides enregistrés et de 80 000 produits chimiques industriels utilisés peuvent agir comme PE potentiel (US EPA, 1997).

1.3.2. Contamination du milieu marin par les perturbateurs endocriniens et conséquences sur les organismes exposés

- **Les composés industriels**

Parmi les composés les plus utilisés par les industries comme surfactants, on retrouve les alkylphénols et alkylphénols ethoxylates (APE). Ces substances ne persistent pas dans l'environnement aquatique mais leurs produits de dégradation sont relativement persistants dans les sédiments aquatiques anaérobiques (Maguire, 1999). Les effluents domestiques peuvent renfermer des centaines de microgrammes par litre d'APes (Ahel et al., 1993) alors que les effluents d'origine industrielle peuvent en renfermer de fortes concentrations

(de l'ordre du mg/l) (Tyler et al., 1998). L'activité oestrogénique des APEs a été démontrée depuis 1938 par Dodds et Lawson. Les APEs sont capables de se fixer aux récepteurs des oestrogènes avec une affinité 2000 à 100 000 fois moindre que le 17β -oestradiol (Jobling et Sumpter, 1993; Routledge et Sumpter, 1997; White et al., 1994). Néanmoins, pour des concentrations comprises entre 3 et 10 $\mu\text{g/l}$, les APEs provoquent une augmentation du niveau plasmatique en vitellogénine chez le poisson mâle et ralentissent la croissance du testicule (Jobling et al., 1995). Un dérivé des APEs, le *p*-tert pentylphenol cause la féminisation des carpes mâles pour des concentrations comprises entre 0,32 et 1 mg/l (Gimeno et al., 1996).

Les produits chimiques en fortes concentrations à proximité des régions industrielles, se retrouvent aussi en quantité non négligeable au niveau des zones arctiques non industrielles dont la contamination est le résultat des transports atmosphériques et de la condensation polaire (Pierce et al., 1998). L'exemple des Biphényles PolyChlorés (BPC), composés très volatils, illustre bien cet aspect de persistance de ces composés au cours des années. En effet, les BPCs ont atteint un pic de concentration dans les environnements aquatiques au cours des années 1970 mais ont décliné entre les années 1980 et 1990 (MacDonald et al., 1998). Cependant, actuellement il y a un apport de BPCs dans l'environnement arctique *via* les grands courants atmosphériques (MacDonald et al., 2000). Il a été estimé qu'entre 11 et 17 tonnes de BPCs pénètrent dans la mer du Nord chaque année (Klamer et al., 1991). Les BPCs sont capables d'induire l'inversion du sexe chez l'embryon de tortue de mer (Bergeron et al., 1994). En remplacement des BPCs, les esters

de phtalates utilisés comme plastifiant, se retrouvent dans l'environnement de manière ubiquiste à cause de leur grande hydrophobicité ($\log K_{ow} > 2-8$) (Hewitt et Servos, 2001). Le di-n-butyl-phthalate (DBP) est le plus abondant des phthalates dans l'environnement marin (Giam et al., 1978). Les concentrations en DBP se situent entre 0.3 et 30 $\mu\text{g/l}$ dans la rivière Delaware (Etats-Unis) (Sheldon et Hites, 1979) alors qu'au niveau des pays en voie de développement, les concentrations sont largement supérieures. Par exemple, les concentrations en DBP atteignent jusqu'à 1472 mg/l dans les eaux de la rivière Owena (Nigéria) (Fatoki et Ogunfowokan, 1993). Jobling et al. (1995) ont montré que le DBP possède une activité oestrogénique *in vitro* à des concentrations situées entre 10^{-4} et 10^{-6} M. Il peut se fixer aux récepteurs des oestrogènes et induire la vitellogenèse (Zacharewski et al., 1998).

Les transports atmosphériques représentent la première source des pesticides dans le système aquatique canadien (Hewitt et Servos, 2001). Ces composés sont déposés par l'intermédiaire des flocons de neige et libérés dans l'environnement aquatique lors de la fonte (Muir et al., 1999). Ainsi, l'océan arctique est devenu un « réservoir » pour les pesticides organochlorés comme par exemple les hexachlorocyclohexanes (MacDonald et al., 2000). De plus, la demi-vie du DDT et de ses métabolites est de 50 ans d'où sa grande persistance dans l'environnement (Cooke et Stringer, 1982). De fortes concentrations en DDT, DDE et dieldrine ont été mesurées dans les œufs de tortues aquatiques des Grands Lacs et du fleuve du Saint-Laurent (Bishop et al., 1991). En général, les niveaux de contamination dans les pays occidentaux sont très faibles et sont en dessous des niveaux

sans effets observés (NOEL) (Tyler et al., 1998). Par contre, dans les pays en voie de développement, les concentrations en DDT et ses métabolites peuvent atteindre 1 à 10 µg/l dans les milieux aquatiques (Begum et al., 1992). Parmi les pesticides, le vinclozolin et l'atrazine sont suspectés de jouer un rôle de perturbateurs endocriniens. Le vinclozolin utilisé comme fongicide, est un composé non persistant dans l'environnement (demi-vie de 3 jours à 3 semaines, US EPA, 1997). Cependant, ses produits de dégradation interviennent comme des agents anti-androgéniques chez les mammifères (Kelce et al., 1994; Wong et al., 1995). Par contre, l'atrazine utilisée comme herbicide est persistante dans les sols (Wauchope et al., 1992). À cause de sa faible force d'adsorption aux particules du sol, elle se retrouve dans les eaux de ruissellement (Wauchope et al., 1992). En 1991, Santé Canada a banni l'utilisation de l'atrazine en période automnale et réduit au maximum son application au printemps (Hewitt et Servos, 2001). Chez les organismes aquatiques, le rôle de perturbateurs endocriniens de l'atrazine n'est pas encore élucidé bien qu'elle intervient dans le métabolisme de la testostérone chez le rat (Preziosi, 1998) et inhibe la stéroïdogénèse chez les alligators (Crain et al., 1997).

- **Les effluents de pâtes et papiers**

Au Canada, les effluents de pâte kraft blanchie (BKME) relâchés d'usines de pâtes et papiers renferment un mélange complexe de plusieurs substances chimiques naturelles (phyto-oestrogènes, β -sistérol) et anthropiques (TCDD, diphényl sulfides) (Davis et Borton, 1992). Le poisson meunier noir exposé au BKME présente une perturbation au niveau de

l'axe Hypothalamo-Hypophysaire-Gonadique. Il en résulte une altération de la synthèse du 17β -oestradiol par les ovaires et une réduction du niveau des stéroïdes circulants (Van Der Kraak et al., 1992). Davis et Bortone (1992) ont observé une masculinisation des femelles meunier noir exposées au BKME. Par contre, des études d'exposition au laboratoire ont montré que ces effluents possèdent également une activité oestrogénique (MacLatchy et Van Der Kraak, 1995; Van Der Kraak et al., 1992).

Les PolyChloro Dibenzo-*p*-Dioxins (PCDD) dont le 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) représentent une menace pour les organismes à cause d'une part de leur grande persistance, de leur hydrophobicité et de leur bioaccumulation et d'autre part de leurs effets sur le développement des poissons (Walker et Peterson, 1994). Ces composés se retrouvent dans les effluents d'usines de pâte et papier (Vos et al., 2000) et leur concentration peut atteindre 10 à 40 $\mu\text{g/l}$ (Merriman et al., 1991). Les PCDD possèdent des propriétés anti-oestrogéniques et dont l'action ne dépend pas du récepteur aux oestrogènes. Les TCDD activent le récepteur aryl hydrocarbène (AhR) qui empêche la fixation du récepteur aux oestrogènes sur son élément de réponse aux estrogènes (Kharat et Saatcioglu, 1996).

- **Les rejets urbains**

Les organismes marins à l'état naturel sont exposés à un mélange de substances capables de jouer un rôle dans la perturbation du système endocrinien. L'exemple illustrant

ce phénomène est celui des rejets urbains qui renferment dans leur mélange complexe des hormones naturelles comme le 17β -oestradiol, oestrone et oestriol. Ces substances libérées sous forme conjuguée se retrouvent sous forme libre dans le milieu aquatique à la suite de leur déconjugaison par les bactéries présentes dans l'environnement (Sumpter et Jobling, 1995, Tyler et al., 1998). En Grande-Bretagne, les rejets urbains renferment des concentrations en 17β -oestradiol comprises entre 1 et 80 ng/l (Harries et al., 1996) alors que des concentrations de 25 à 50 ng/l suffisent pour induire la vitellogenèse chez la truite (Desbrow et al., 1998). Des truites arc-en-ciel placées dans des cages à l'embouchure des effluents urbains produisent de la vitellogénine et présentent une faible croissance testiculaire (Jobling et al., 1996). L'alkylphénol, le 17β -oestradiol, l'oestrone et le 17α -ethinyloestradiol ont été identifiés comme les agents responsables de cette induction chez cette espèce (Desbrow et al., 1998). Les mêmes observations ont été réalisées en Ontario (Canada) chez la truite arc-en-ciel exposée à des effluents urbains (Hewitt et Servos, 2001). De plus, Servos et al. (1998) ont observé une induction de la vitellogénine chez des individus immatures exposés à des alkylphénols et des oestrogènes naturels et synthétiques.

Parmi les composés industriels à effet oestrogénique, on peut citer le bisphénol-A, composé synthétique utilisé dans la production des polycarbonates (Soto et al., 1995). Ce composé, bioaccumulable (facteur de bio-concentration $\log K_{ow}=3.3$, Kawasaki, 1980) a été détecté dans les effluents municipaux (Lee et Peart, 2000). Il est capable de se fixer aux récepteurs oestrogéniques mais son affinité est 2000 fois plus faible que celle du 17β -

oestradiol (Routledge et Sumpter, 1997). Néanmoins, sa faible demi-vie (1-4 jours) (Staples et al., 1998) le rend très faiblement persistant dans l'environnement.

1.3.3. Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens

1.3.3.1. Chez les poissons

- **Sur le niveau des hormones stéroïdiennes**

Les composés qui interfèrent sur la disponibilité des précurseurs ou l'activité des enzymes de la stéroïdogénèse pourront perturber la synthèse des hormones stéroïdiennes. Les poissons exposés au BKME montrent un faible succès reproducteur corrélé avec le faible niveau en hormones plasmatiques (McMaster et al., 1991). En effet, la concentration en 17β -oestradiol et testostérone circulants dans le plasma des poissons exposés à des effluents BKME étaient plus faibles comparativement à des poissons contrôles (McMaster et al., 1991). Cette diminution en 17β -oestradiol et testostérone semble être partiellement liée à une faible activité de l'aromatase et à une réduction du niveau du cholestérol (McMaster et al., 1995). Des poissons (goldfish) exposés au β -sistérol, contaminant présent en fortes concentrations dans les effluents BKME, montrent de faibles niveaux de la testostérone et 11-cétotestostérone chez le mâle et en testostérone et 17β -oestradiol chez la femelle (MacLatchy et Van Der Kraak, 1995). Des cultures *in vitro* de cellules testiculaires des poissons exposées au β -sistérol et traitées par un agoniste de la gonadotropine (hCG

human chorionic gonadotropin) produisent de faibles quantités en testostérone et prégénolone (MacLatchy et Van Der Kraak, 1995). Ainsi le β -sistérol intervient spécifiquement sur la biosynthèse des hormones stéroïdiennes en affectant soit la mobilisation du cholestérol ou l'activité du cytochrome P450sc (MacLatchy et Van Der Kraak, 1995).

La perturbation du niveau des hormones stéroïdiennes (testostérone et 17α - 20β -dihydroxyprogestérone pour les deux sexes, 11-cétotestostérone chez le mâle et 17β -oestradiol chez la femelle) chez des poissons meuniers noirs de la Baie Jackfish (Lac Supérieur) exposés aux effluents BKME semble être reliée à l'activation du système monooxygénase à fonction mixte (MFO) (McMaster et al., 1991; Munkittrick et al., 1992). Les études sur le meunier noir de la rivière Saint-Maurice (Québec, Canada) exposé aux BKME montrent les mêmes effets que leurs congénères du Lac Supérieur (diminution du niveau des stéroïdes et augmentation de l'activité EthoxyResorufin O-Deethylase EROD) (Gagnon et al., 1994). Le système MFO intervient dans l'élimination des xénobiotiques mais aussi dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes, des acides gras et des prostaglandines (Rattner et al., 1989). Il semblerait que l'induction du système MFO active le métabolisme et l'élimination des stéroïdes circulants (Okey, 1990).

- **Sur les transporteurs des hormones stéroïdiennes**

Les ABP/SHBG (Androgen Binding Protein/Sex Hormone Binding Protein) sont des protéines qui régulent la quantité des hormones stéroïdiennes disponibles pour les cellules cibles (Rosner, 1990) et qui empêchent leur dégradation métabolique (Petra et al., 1985). Par exemple, l'affinité des SHBG pour le 17β -oestradiol est inhibée par un grand nombre de xénobiotiques à effet oestrogénique (pesticides, composés industriels et pharmaceutiques) chez la truite arc-en-ciel (Tollefsen, 2002). Cette inhibition est de type compétitive et réversible car elle dépend de la concentration en xénobiotiques (Tollefsen, 2002). Cependant, l'affinité des SHBG pour les xénobiotiques est 5 à 10 fois plus faible comparativement au 17β -oestradiol (Tollefsen, 2002). La concentration en xénobiotiques dans le sang doit être 1000 fois plus importante que les hormones endogènes pour exercer un effet sur la réponse des cellules cibles (Milligan et al., 1998).

De ce processus de compétition des xénobiotiques sur le site de fixation des stéroïdes aux ABP/SHBG en résulte une augmentation de la concentration en stéroïdes plasmatiques non fixés. La présence en forte concentration des phtalates et biphénols (10-100 μ M) augmente de 5 à 72% la teneur en testostérone et 17β -oestradiol libre dans le plasma de la truite arc-en-ciel (Déchaud et al., 1999). Ces stéroïdes libres vont subir le métabolisme hépatique et leur élimination par l'organisme (Petra et al., 1985). Par contre, les xénobiotiques seront véhiculés vers les organes cibles qui possèdent des récepteurs capables de reconnaître les ABP/SHBG (Joseph, 1994 ; Fortunati, 1999). Les perturbateurs endocriniens vont alors pénétrer dans la cellule et soit induire (agoniste) ou inhiber (antagoniste) la réponse biologique en agissant sur les récepteurs.

- **Sur les récepteurs des hormones stéroïdiennes**

Certains perturbateurs endocriniens sont capables de se fixer aux récepteurs des hormones stéroïdiennes mais avec une moins grande affinité que les stéroïdes. Cependant, la réponse biologique peut être similaire comparativement aux hormones endogènes lorsque la concentration des xénobiotiques est importante (Lister et Van Der Kraak, 2001). Plusieurs composés chimiques, incluant les alkylphénols, induisent la synthèse de la vitellogénine en se fixant sur le récepteur aux oestrogènes (Madigou et al., 2001). Chez la truite arc-en-ciel, le nonylphenol ethoxylate et l'octylphénol entrent en compétition avec le 17 β -oestradiol pour se fixer sur son récepteur (Madigou et al., 2001). Bien que l'affinité du récepteur à ces xénoestrogènes soit 1000 fois inférieure à celle du 17 β -oestradiol (White et al., 1994 ; Flouriot et al., 1995), ces composés sont capables d'induire la synthèse de la vitellogénine (Petit et al., 1997).

D'autres groupes de xénobiotiques interviennent comme des antioestrogènes *via* le récepteur aryl hydrocarbure (Ah). Le récepteur Ah possède les mêmes propriétés que les récepteurs aux stéroïdes mais au lieu de fixer des hormones stéroïdiennes, il se lie aux xénobiotiques comme le TCDD ou BPCs (Safe, 1995). Lorsque le xénobiotique se lie à ce récepteur, la partie protéique forme un hétérodimère avec les protéines de translocation nucléaire. La liaison de l'hétérodimère avec l'élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) induit l'expression du cytochrome P450 qui intervient dans le métabolisme et l'élimination du 17 β -oestradiol (Spink et al., 1990).

1.3.3.2. Chez les invertébrés : Cas du Tributylétain (TBT)

Les organoétains et en particulier le TBT sont utilisés dans une variété de produits industriels incluant les peintures antisalissures, les pesticides agricoles et les préservatifs de matériaux (De Mora et Pelletier, 1997). Les peintures antisalissures sont les principaux vecteurs des organoétains dans l'environnement marin. Plusieurs études ont montré les effets délétères du TBT sur les organismes marins tels que la diminution de la production des mollusques dans les fermes aquicoles (Alzieu, 1991). En 1989, l'Union Européenne et en 1991, les régions de la Méditerranée ont restreint l'utilisation des peintures traitées au TBT sur les coques des bateaux dont la dimension est inférieure à 25 mètres. Cependant, même après cette législation, plusieurs programmes de surveillance ont révélé la présence des organoétains dans les zones côtières (Evans, 1999; Saint-Louis et al., 2000; Morcillo et Porte, 2000; Solé, 2000; Takeuchi et al., 2001). Par conséquent, les organismes marins sont encore sujets à une exposition au TBT à partir de la colonne d'eau, du sédiment et de leur mode alimentaire.

Le TBT est une molécule constituée de trois groupements butyls dotés de caractères organiques lui permettant de se fixer aux composés organiques (Laughlin et al., 1986) et d'un cation métallique (Sn^+) (Figure 1.5) qui peut se lier aux anions en solution dans l'eau de mer (Cl^- , HCO_3^- , OH^-) et à la paroi des bactéries ou des algues unicellulaires (Laughlin et al., 1986). Du fait de son comportement lipophile caractérisé par un fort coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}), le TBT est susceptible d'être bio-disponible et de s'accumuler

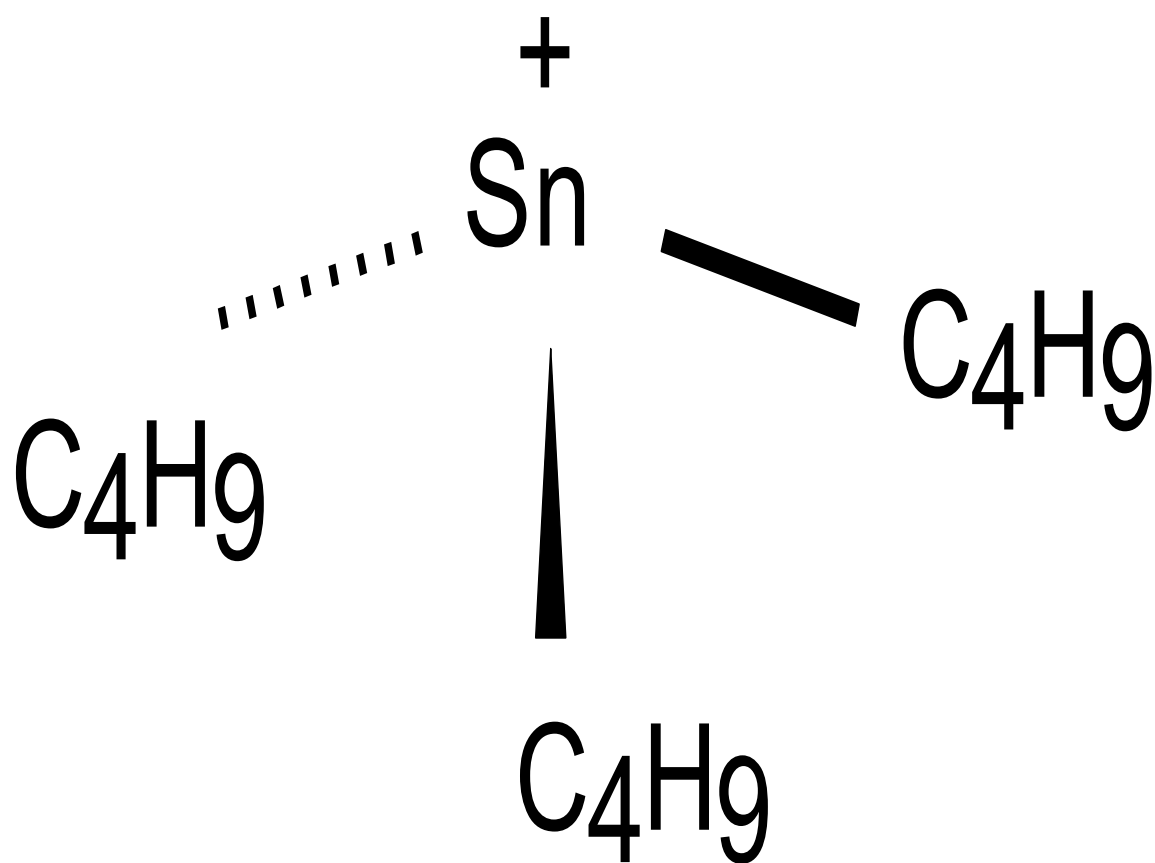


Figure 1.5: Cation Tributylétain (TBT)

dans les tissus. En effet, plusieurs études ont mis en évidence la bioaccumulation du TBT chez plusieurs bivalves dont *Crassostrea gigas* et *Ostrea edulis* (Waldock et al., 1983), chez *Nucella lapillus* (Bryan et al., 1986), *M. edulis* (Laughlin et al., 1986) et *M. arenaria* (Kure et Depledge, 1994). Le facteur de bio-concentration du TBT chez *M. arenaria* varie entre 3700 et 220 000 (Kure et Depledge, 1994). Le TBT représente 83% des composés organoétains accumulés dans les tissus de *M. arenaria* ce qui suggère que cette espèce possède une faible capacité de dégrader ce composé (Laughlin et al., 1986). Le TBT s'accumule préférentiellement au niveau des branchies et des viscères car ces tissus renferment d'importantes quantités de lipides (Laughlin et al., 1986). Effectivement, chez *M. arenaria*, 30 à 40% du TBT est retrouvé au niveau des branchies et des viscères (Kure et Depledge, 1994).

La perturbation du système reproducteur chez les mollusques par le TBT est actuellement l'exemple le plus étudié chez les invertébrés. C'est le cas typique de perturbation du niveau des hormones stéroïdiennes chez les mésogastéropodes et néogastéropodes induisant une imposition du sexe mâle chez la femelle (ou imposex) (Matthiesen et Gibbs, 1998). L'imposex correspond à la présence de caractère mâle (pénis) et l'obstruction de l'oviducte chez la femelle. Il a été décrit chez plus de 150 espèces de mollusques prosobranches dans le monde (Matthiesen et al., 1998). Smith (1981) a montré que le pourcentage d'individus présentant l'imposex chez *Ilyanassa obsoleta* était élevé au niveau des sites proches des marinas. C'est ainsi que les processus conduisant à l'imposex ont été attribués à la présence des peintures antisalissures renfermant du TBT utilisé sur les

coques des bateaux (Alzieu, 1991). En effet, le TBT induit un changement du sexe qui est irréversible et qui se traduit par une formation anormale de l'oviducte avec une imposition du tractus reproducteur mâle et l'induction de la spermatogenèse (Matthiesen et Gibbs, 1998). Par exemple, des femelles *Nucella lapillus* en présence de 25 ng TBT/L d'eau de mer montrent une suppression de l'ovogenèse remplacée par la spermatogenèse et la production des spermatozoïdes (Gibbs et al., 1988). Les auteurs ont suggéré que le TBT intervenait probablement sur le système hormonal des gastéropodes marins. Spooner et al. (1991) ont dosé les hormones stéroïdiennes chez *Nucella lapillus* exposée à 98 ng TBT/L d'eau de mer pendant 42 jours. Les résultats de cette expérience ont montré que le niveau de la testostérone est significativement élevé par rapport au contrôle. En effet, l'injection de la testostérone à des femelles *Nucella lapillus* entraîne l'imposex (Spooner et al., 1991). L'acétate de cyprotérone (antagoniste aux androgènes) empêche l'imposition du sexe mâle chez des femelles gastéropodes exposées au TBT (Bettin et al., 1996). Ces résultats confirment que l'imposex est induit chez les gastéropodes marins par l'augmentation du niveau de la testostérone. Ainsi, Spooner et al. (1991) ont émis l'hypothèse que le TBT intervient sur le système cytochrome P450 aromatase, enzyme qui catalyse la conversion de la testostérone en 17β -oestradiol. Cette hypothèse a été supportée par le traitement des buccins avec des inhibiteurs à l'aromatase et les organismes traités présentaient les "symptômes" de l'imposex (Bettin et al., 1996). Cependant, aucune étude n'a démontré l'inhibition directe de l'aromatase par le TBT (Matthiesen et al., 1998). D'autres mécanismes d'action ont été proposés comme par exemple l'interférence du TBT avec la production des neurohormones (Féral et LeGall, 1982) ou l'inhibition de la formation des

métabolites de la testostérone. En effet, Ronis et Masson (1996) ont étudié l'effet du TBT sur le mécanisme de métabolisation de la testostérone chez *Littorina littorea*. Les auteurs ont observé que le TBT inhibe la sulfatation de la testostérone et par voie de conséquence une faible élimination de la testostérone par l'organisme.

Morcillo et Porte (1997, 2000) se sont intéressés à l'effet du TBT sur le niveau des hormones stéroïdiennes chez les palourdes de la méditerranée, *Ruditapes decussata*. *In vitro*, l'activité NADH réductase, enzyme clé dans le fonctionnement du système cytochrome P450 à fonction mixte, est inhibée de 17% à la suite d'une exposition des microsomes à 50µM en TBT (Morcillo et Porte, 1997). De plus, le niveau des métabolites de la testostérone a diminué alors que le niveau du 17β-oestradiol n'a pas changé (Morcillo et Porte, 1997). Par contre, des études d'exposition au laboratoire à différentes concentrations en TBT n'affectent pas la métabolisation de la testostérone alors que le niveau de la testostérone est élevé et celui du 17β-oestradiol diminue (Morcillo et Porte, 1997). D'autre part, des expériences de transplantation des palourdes d'un milieu non contaminé dans une marina fortement exposée au TBT confirme les résultats des expériences au laboratoire (Morcillo et Porte, 2000). Le dérèglement du niveau hormonal se traduit chez les palourdes transplantées par une augmentation de 33% du niveau de la testostérone et une diminution du niveau du 17β-oestradiol de cinq fois comparativement aux palourdes du site non contaminé (Morcillo et Porte, 2000). Tous ces résultats convergent vers l'implication du TBT dans l'augmentation du niveau de la testostérone

chez les palourdes. Néanmoins, la controverse subsiste sur les mécanismes d'action du TBT dans cette induction.

Au même titre que les pays européens, le Canada a banni depuis 1989 l'utilisation du TBT par les bateaux de moins de 25 mètres. Cependant, des études récentes ont mis en évidence la présence du TBT dans les sédiments et les moules de la rive sud de l'estuaire du Saint-Laurent. De plus, de fortes concentrations en TBT (100-500 ng Sn/g en poids sec) ont été mesurées dans le foie du Béluga de l'estuaire du Saint-Laurent (Saint-Louis et al., 2000).

Mya arenaria, espèce endobenthique, ubiquiste dans les zones côtières de l'estuaire (Lamoureux, 1977) est capable de bio-accumuler le TBT (Kure et Depledge, 1994; Saint-Hilaire, 1997). Par son mode de vie sessile et sa capacité à bio-accumuler les contaminants, *Mya arenaria* pourra être utilisée comme espèce indicatrice d'une contamination du milieu. Grâce à sa grande taille (5-6 cm), elle est facile à échantillonner et présente une forte longévité ce qui nous a permis de l'exposer à une contamination à long terme.

1.4. *Mya arenaria*

Mya arenaria fait partie des Mollusques Bivalves de l'ordre des Eulamellibranches, sous-ordre des Hétérodontes et la famille des Myidés (Figure 1.6). *Mya arenaria*, espèce endobenthique, se retrouve sur toutes les côtes de l'hémisphère nord (Abbot, 1968) et colonise surtout les zones intertidales sablo-vaseuses des régions tempérées (Ayers, 1956).

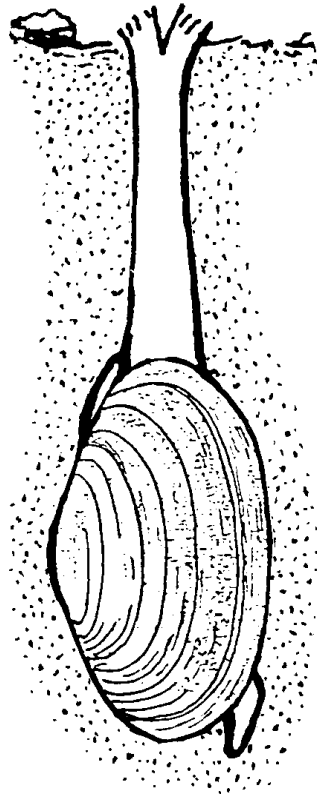


Figure 1.6: *Mya arenaria* (Mollusque : Bivalve)

Ce suspensivore vivant dans les milieux côtiers et estuariens de l'hémisphère nord possède une importante valeur économique. Au cours des années 70, quatorze bancs intertidaux de myes ont été inventoriés au Québec dont quatre présentent des densités et des caractéristiques pour une exploitation rentable (Lamoureux, 1977). Cette espèce, outre son intérêt économique, occupe une niche écologique importante puisque la zone intertidale représente des aires d'alimentation pour plusieurs espèces d'animaux marins prédateurs des myes (crabes, plies, goéland) (Newell et Hidu, 1986). Dans l'estuaire du Saint-Laurent, elle appartient à la communauté Boréo-Atlantique à *Macoma baltica* (Brêthes et Desrosiers, 1984). Les températures comprises entre 12 et 15°C, nécessaires pour la stimulation des processus de reproduction, limitent la distribution de l'espèce vers le Nord alors que les températures supérieures à 28 °C limitent son expansion vers le Sud (Lawson, 1966; Pfitzenmeyer, 1965).

Mya arenaria est gonochorique (les sexes sont séparés) mais ce dimorphisme sexuel est observable uniquement au niveau de la structure de la gonade (Coe et Turner, 1938). Au stade juvénile, les cellules germinales des deux sexes ne sont pas distinctes. Lorsque les animaux atteignent en moyenne 20 mm de longueur, les gonies primaires commencent à se multiplier et à se différencier en cellules germinales mâles (spermatogonies) ou femelles (ovogonies). Lors de la différenciation sexuelle, les cellules folliculaires accumulent des inclusions caractéristiques pour chaque sexe. À partir de ce moment, se déroule la gamétogenèse qui comprend la formation des ovocytes (ovogenèse) chez la femelle et celle des spermatozoïdes (spermatogenèse) chez le mâle (Coe et Turner, 1938). Les

caractéristiques du développement de la gonade ont fait l'objet d'études histologiques qui ont mis en évidence cinq stades de développement de la gonade mâle et femelle (Ropes et Stickney, 1965 ; Pfitzenmeyer, 1965 ; Brousseau, 1978 ; Ropes, 1982 ; Roseberry, 1988; Gauthier-Clerc et al., 2002).

- **Stade indifférencié**

Ce stade se caractérise par la présence de cellules folliculaires renfermant des inclusions comme décrit par Coe et Turner (1938) et qui colonisent les alvéoles. Les premières cellules germinales, spermatocytes chez le mâle et ovocytes chez la femelle, commencent à apparaître le long de la paroi de l'alvéole mais ne sont pas abondantes.

- **Stade de développement**

Les cellules germinales débutent leur développement et commencent à coloniser l'alvéole. Les ovocytes bien développés restent attachés à la membrane basale et s'allongent vers la lumière alvéolaire. Les spermatogonies se différencient en spermatocytes et spermatides le long de l'axe radial de la membrane vers la lumière. Par contre, les cellules folliculaires sont moins nombreuses comparativement au stade indifférencié.

- **Stade mûr**

Ce stade est caractérisé par la prolifération, la maturation et la migration des cellules germinales vers la lumière alvéolaire. Au niveau de la membrane basale a lieu la prolifération des cellules germinales et les premiers spermatozoïdes et ovocytes matures commencent à apparaître. Ensuite, ces cellules migrent vers le centre de l'alvéole où ils commencent à s'aligner en colonne radiale. Au cours de ce stade, les cellules folliculaires subissent la cytolysse et commencent à disparaître.

- **Stade de ponte**

Lorsque la ponte débute, des cellules germinales matures sont libérées vers l'extérieur de la lumière alvéolaire. On assiste à la formation d'une seule rangée de cellules folliculaires au niveau de la membrane alvéolaire.

- **Stade passé**

La libération des cellules germinales n'est pas complète car quelques cellules germinales subsistent encore dans les alvéoles. Les cellules folliculaires prolifèrent et colonisent les alvéoles.

Chez plusieurs bivalves, le tissu mésenchymateux sert d'accumulation et de stockage des substances nutritives. Cependant, il n'a pas été retrouvé de tissu mésenchymateux chez *Mya arenaria* (Coe et Turner, 1938). Comme compensation, les cellules folliculaires accomplissent ce rôle de cellules nourricières. Ces cellules accumulent une grande quantité des réserves énergétiques (lipides, protéines, glycogène) sous forme d'inclusions lipidiques qui seront utilisées lors de la gamétogenèse (Coe et Turner, 1938).

Chez la femelle, ces inclusions consistent en de petits globules de nature lipidique et de grands globules de composition albugineuse. Selon Coe et Turner (1938), les substances qui constituent ces inclusions dériveraient d'une part de l'activité cytoplasmique des cellules folliculaires et d'autre part, de la cytolyse des ovocytes dégénérés. Ces inclusions deviennent visibles dans les cellules folliculaires des jeunes myes au cours de leur différenciation sexuelle et continuent à augmenter en nombre durant la croissance de jeunes ovules (Coe et Turner, 1938). La proportion des ovules dégénératifs est largement dépendante des conditions nutritives (Coe et Turner, 1938). Lorsque les ovules atteignent la phase de maturité sexuelle, les cellules folliculaires proches du centre de chaque alvéole subissent la cytolyse et leurs inclusions deviennent disponibles pour la croissance des ovules (Coe et Turner, 1938).

Chez le mâle, les cellules folliculaires renferment des inclusions nutritives qui dérivent en partie de leur activité cytoplasmique mais plus particulièrement des produits de cytolyse des cellules spermatogéniques dégénératives ayant effectué une méiose anormale.

Ces réserves sont utilisées lors de la spermatogenèse pour le développement, la croissance et la maturation des cellules spermatogéniques (Coe et Turner, 1938).

1.5. Problématique

Chez les bivalves, les différentes phases du cycle de reproduction sont étroitement dépendantes des conditions environnementales en particulier la température et l'alimentation (Figure 1.7). En effet, le déclenchement de la ponte dépend de la température du milieu. Il semblerait que l'augmentation de la température stimule la sécrétion de certaines neurohormones par les ganglions nerveux (Lubet et Mathieu, 1990). Parmi ces neurohormones, on retrouve la sérotonine qui intervient sur la maturation des ovocytes et la rupture de la vésicule germinative (Kadaï et Koïde, 1989), la dopamine qui stimule la libération des gamètes (Osada et al., 1987) et les prostaglandines qui déclenchent la ponte (Osada et al., 1989; Deridovich et Reunova, 1993).

En plus de la température, l'alimentation semble jouer un rôle primordial dans les processus de la gamétogenèse. Ainsi, l'accumulation et la mobilisation des réserves énergétiques sont fortement corrélées avec le cycle saisonnier des processus gamétogéniques. Lors de la gamétogenèse, les ganglions cérébroïdes sécrètent une neurohormone : la GMH (Gonial Mitosis Hormone) qui stimule la mobilisation du glycogène à partir des cellules de réserves (Robbins et al., 1990; Lubet et Mathieu, 1990). Au niveau des gonades, le glycogène est transformé en lipides qui s'accumulent sous forme

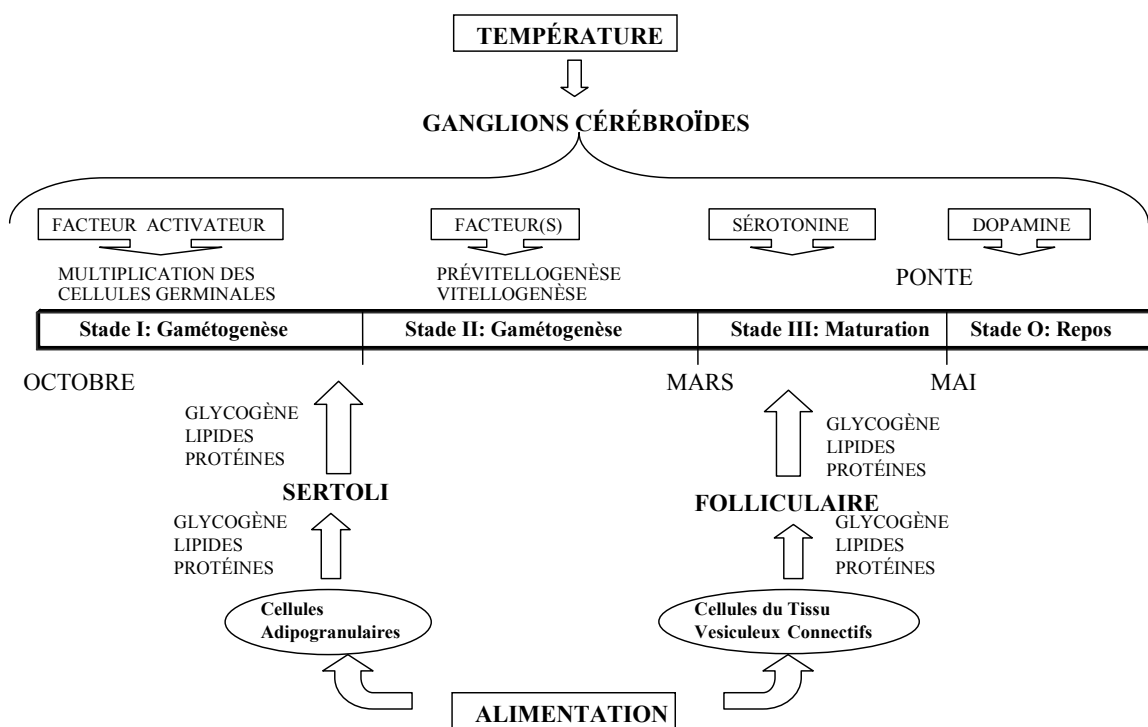


Figure 1.7: Régulation de la gamétogenèse chez la moule bleue (*Mytilus edulis*)

d'inclusion au niveau des cellules nourricières (Pipe, 1987). Les lipides issus de cette biosynthèse et de l'apport nutritif (phytoplancton) vont servir à la biosynthèse des stérols dont le cholestérol qui représente 45% des stérols chez *Mya arenaria* (Jarzebski, 1985). Ce dernier pourrait être utilisé comme substrat pour la synthèse des hormones stéroïdiennes dont la progestérone.

La progestérone a été retrouvée chez *Mytilus edulis* mâles et femelles. Selon Reis-Henriques et Coïmbra (1990), la progestérone semble jouer un rôle de relais aux stimulations des neurohormones au niveau des gonades. D'autre part, il est probable que la progestérone intervient sur la multiplication et la maturation des gamètes mâles et femelles. Par conséquent, la progestérone jouerait un rôle primordial dans les processus gamétogéniques chez les bivalves et donc la perturbation de sa synthèse par des perturbateurs endocriniens pourrait avoir des conséquences sur le succès reproducteur de l'espèce.

L'estuaire du Saint-Laurent est une voie maritime internationale d'environ 2000 bateaux par année (Pierce et al., 1998). Au cours des dernières années, l'introduction du TBT dans le milieu marin a entraîné une perturbation au niveau de l'écosystème marin à cause de son effet toxique sur les animaux benthiques. Le TBT est capable de s'adsorber sur les particules phytoplanctoniques qui sont filtrées par les bivalves dont *Mya arenaria*. La voie alimentaire permet ainsi le transfert du TBT de la colonne d'eau vers les tissus (branchies, viscères et gonades) des organismes où il s'accumule. L'effet du TBT sur les

gastéropodes marins est l'exemple le plus étudié sur les effets des perturbateurs endocriniens chez les invertébrés marins. À partir d'observation morphologique chez les individus exposés, les travaux se penchent actuellement sur les mécanismes d'actions du TBT au niveau moléculaire (Matthiessen et al., 1998).

Le TBT provoque l'apparition d'organes génitaux mâles chez les femelles de certains Gastéropodes prosobranches marins : c'est le phénomène de l'imposex (Smith, 1981 ; Gibbs et Bryan, 1986 ; Gibbs et al., 1991). Chez certaines espèces (comme *Ilyanassa obsoleta* et *Hinia reticulata*), l'activité reproductrice est peu affectée, alors que chez d'autres espèces par exemple *Nucella lapillus* et *Ocenebra erinacea*, la ponte est supprimée à cause d'une modification structurelle de l'oviducte par le TBT. Ceci se traduit par une diminution du nombre d'individu et pourrait conduire à un déséquilibre de la structure de la population (Bryan et al., 1986; Oehlmann et al., 1998). Ce qui a poussé plusieurs équipes de recherche à s'intéresser aux effets du TBT au niveau endocrinien dans le but d'une identification d'un biomarqueur précoce de l'effet de ce contaminant (Lagadic et al., 1998).

Le mécanisme par lequel le TBT induit une augmentation du niveau de la testostérone n'est pas encore complètement élucidé. L'inhibition de l'aromatase semble l'hypothèse la plus retenue (Matthiessen et Gibbs, 1998). Cependant d'autres voies de recherche sont actuellement explorées telles que les effets du TBT sur la métabolisation des hormones sexuelles et/ou sur la production des neurohormones qui induisent une augmentation de la testostérone (Oberdorster et McClellan-Green, 2002).

1.6. Objectifs et hypothèses de recherche

Les études récentes se sont principalement intéressées aux mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens chez les vertébrés (mammifères, reptiles et poissons). Bien que les invertébrés représentent plus de 95% de la totalité des espèces, très peu d'études ont été réalisées chez ce groupe. Cette carence est reliée à la complexité et aux faibles connaissances du système endocrinien chez les invertébrés et en particulier chez *Mya arenaria*. Avant de considérer comment les perturbateurs endocriniens altèrent le système hormonal chez cette espèce, il est nécessaire d'élucider le rôle des hormones stéroïdiennes dans les processus de son cycle reproducteur.

L'objectif général de cette étude est de contribuer à comprendre le rôle de la progestérone au cours du cycle reproducteur et l'effet du TBT sur les hormones stéroïdiennes chez *Mya arenaria*. Précisément, ce projet vise dans un premier temps à effectuer un suivi du niveau de la progestérone au cours du cycle reproducteur dans un site référence, ensuite de comparer ce niveau à celui d'autres sites de l'estuaire du Saint-Laurent et enfin de mesurer le niveau des hormones stéroïdiennes chez des organismes exposés en mésocosme à des concentrations différentes en TBT et pendant une période de trois mois d'exposition.

Nous vérifierons donc les hypothèses suivantes :

- La progestérone intervient dans la régulation de la gamétogenèse chez *M. arenaria*.
- La maturation sexuelle est affectée chez les myes dans les sites soumis à une pollution diffuse de l'estuaire du Saint-Laurent.
- La perturbation du succès reproducteur est liée aux faibles niveaux de la progestérone gonadique.
- Le TBT intervient sur le niveau des hormones stéroïdiennes chez *M. arenaria*

1.7. Références

- Abbot, R., 1968. Guide des coquillages de l'Amérique du Nord. Marcel Broquet, Québec, 288p.
- Ahel, M., McEvoy, J., Giger, W., 1993. Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. Environ. Pollut. 79 : 243–248.
- Almahbobi, G., Williams, L.J., Hall, P.F., 1992. Attachment of mitochondria to intermediate filaments in adrenal cells: Relevance to the regulation of steroid synthesis. Exp. Cell Res. 200 : 361-369.
- Alzieu, C., 1991. Environmental problems caused by TBT in France: Assessment, regulations, prospects. Mar. Environ. Res. 7-17.
- Aubry, R., 1962. Étude de l'hermaphrodisme et de l'action pharmacodynamique des hormones des Vertébrés chez les Gastéropodes Pulmonés. Thèse de doctorat en Sciences Naturelles. Faculté des Sciences de l'Université de Strasbourg. (eds) Paris, Masson.
- Ayers, J.C., 1956. Population dynamics of the marine clam, *Mya arenaria*. Limnol. Oceanogr. 1 : 26-34.
- Begum, S., Begum, Z., Alam, M.S., 1992. Organochlorine pesticide contamination of rain-water, domestic tap water and well-water of Karachi City. J. Chem. Soc. Pak. 14 : 8-11.

- Benahmed, M., Dellamonica, C., Haour, F., Saez, J.M., 1981. Specific low density lipoprotein receptors in pig Leydig cells. Role of this lipoprotein in cultured Leydig cells steroidogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99 : 1123-1130.
- Bergeron, J.M., Crews, D., McLachlan, J.A., 1994. PCBs as environment estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ. Health Perspect.* 102 : 780-781.
- Bettin, C., Oehlmann, J., Stroben, E., 1996. TBT-induced imposex in marine neogasteropods is mediated by an increasing androgen level. *Helgoländer Meeresuntersuchungen.* 50 : 299-317.
- Bishop, C.A., Brooks, R.J., Carey, J.H., Ng, P., Norstrom, R.J., Lean, D.R.S., 1991. The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra s. serpentine*) from Ontario, Canada. *J. Toxicol. Environ. Health.* 33 : 521-547.
- Black, S.M., Harikrishna, J.A., Szklarz, G.D., Miller, W.L., 1994. The mitochondrial environment is required for activity of the cholesterol side-chain cleavage enzyme, cytochrome P450_{scc}. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 91 : 7247-7251.
- Brêthes, J.C., Desrosiers, G., 1984. Étude bionomique de la communauté à *Macoma baltica* de la batture de Rimouski. *Science et Technologie de L'Eau.* 17 : 25-30.
- Brousseau, D.J., 1978. Population dynamics of the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Mar. Biol.* 50 : 63-71.
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England : evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 66 : 611-640.
- Cherradi, N., Defaye, G., Chambaz, E.M., 1994. Characterization of the 3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase activity associated with bovine adrenocortical mitochondrial. *Endocrinol.* 134(3) : 1358-1364.
- Coe, W.R., Turner, H.J.Jr., 1938. Development of the gonads and gametes in the soft-shell clam (*Mya arenaria*). *J. Morphol.* 62(1) : 91-111.
- Colborn, T., Clement, C., 1992. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. *Ad. Mod. Environ. Toxicol.*, ed. Mehlman M.A. Vol. XXI, 403. Princeton Sci. Publ. Co. Inc. : Princeton.

- Cooke, B.K., Stringer, A.J.N., 1982. Distribution and breakdown of DDT in orchard soil. *Pesticide Sci.* 13 : 545-551.
- Crain, D.A., Guillette, L.J.Jr., Rooney, A.A., Pickford, D.B., 1997. Alterations in steroidegenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect.* 105 : 528-533.
- Davis, W.P., Bortone, S.A., 1992. Effects of kraft mill effluent on the sexuality of fishes: an environmental early warning? In: Colborn, T., Clement, C. (Eds) *Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. Princeton Scientific Publishing, Inc, Princeton, NJ, pp. 113-127.
- Déchaud, H., Ravard, C., Claustrat, F., de la Perrière, A.B., Pugeat, M., 1999. Xenoestrogen interaction with human sex hormone-binding globulin (hSHBG). *Steroids.* 64 : 328-334.
- De Longcamp, D., Lubet, P., Drosdowsky, M., 1974. The *in vitro* biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 22 : 116-127.
- De Mora, S.J., Pelletier, E., 1997. Environmental tributyltin research : past, present, future. *Environ. Technol.* 18 : 1169-1177.
- Deridovich, I.I., Reunova, O.V., 1993. Prostaglandins: Reproduction control in bivalve molluscs. *Comp. Biochem. Physiol.* 104 (A) : 23-27.
- Desbrow, C., Routledge, J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and *in vitro* biological screening. *Environ. Sci. Technol.* 32 (11) : 1549-1558.
- Dodds, E.C., Lawson, W., 1938. Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proceedings of the Royal Society of London. Biol. Sci.* 125 (B) : 222-232.
- Evans, S.M., 1999. Tributyltin pollution: the catastrophe the never happened. *Mar. Pollut. Bull.* 38 (8) : 629-636.
- Fatoki, O.S., Ogunfowokan, A.O., 1993. Determination of phthalate ester plasticizers in the aquatic environment of southwestern Nigeria. *Environ. Int.* 19 : 619-623.
- Féral, C., Le Gall, S., 1982. *Physiology des Invertébrés.- Induction expérimentale par un polluant marin (le tributylétain), de l'activité neuroendocrine contrôlant la morphogenèse du pénis chez les femelles d'Ocenebra erinacea* (Mollusque, Prosobranchie gonochorique). *C.R. Acad. Sc. Paris.* 295 III : 627-630.

- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B., Valotaire, Y., 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *J. Mol. Endocrinol.* 15 : 143-151.
- Fortunati, N., 1999. Sex hormone-binding globulin: Not only a transport protein. What news is around the corner? *J. Endocrinol. Invest.* 22 : 223-234.
- Gagnon, M.M., Dodson, J. J., Hodson, P.V., 1994. Ability of BKME (bleached kraft mill effluent) exposed white suckers (*Catostomus commersoni*) to synthesize steroid hormones. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C(2) : 265-273.
- Gasnier, F., 1999. Stéroidogénèse dans les cellules de Leydig. (Eds) Hamamah, S., Saliba, E., Benahmed, M., Gold, F. *Medecine et biologie de la reproduction*. Paris, Masson : 70-85.
- 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? *Comp. Biochem. Physiol.* 131C : 457 - 467.
- Giam, C.S., Chan, H.S., Neff, G.S., Atlas, E.L., 1978. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant. *Science*. 199 : 419-420.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W., 1986. Reproductive failure in populations of the dog-whelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 66 : 767-777.
- Gibbs, P.E., Pascoe, P.L., Burt, G.R., 1988. Sex change in the female dog-whelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 68 : 715-731.
- Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Spence, S., 1991. The impact of tributyltin (TBT) pollution on the *Nucella lapillus* (Gasteropoda) populations around the coast of South-East England. *Oceanol. Acta* 11 : 257-261.
- Gimeno, S., Gerritsen, A., Bowner, T., Komen, H., 1996. Feminization of male carp. *Nature* 384 : 221-222.
- Harries, J.E., Sheahan, D.A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E.J., Rycroft, R., Sumpter, J.P., Tylor, T., 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 15 (11) : 1993-2002.
- Hewitt, M., Servos, M., 2001. An overview of substances present in Canadian aquatic environments associated with endocrine disruption. *Water Qual. Res. J. Can.* 36(2) : 191-213.

- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H., Koide, S.S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J. Exp. Zool.* 245 : 318-321.
- Illanes-Bucher, J., Lubet, P., 1980. Étude de l'activité neurosécrétoire au cours du cycle sexuel de la moule (*Mytilus edulis*) Mollusque lamellibranche. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 105(1) : 141-145.
- IPCS, 1996. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposed to chemicals. International Programme on Chemical Safety Environmental Criteria 180, World Health Organization, Geneva.
- Jarzebski, A., 1985. Major sterols of bivalve molluscs from the inner Puck Bay, Southern Baltic. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B (4) : 989-991.
- 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. *Environm. Toxicol. Chem.* 15 (2) : 194-202.
- 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. *Aquat. Toxicol.* 27 : 361-372.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Persp.* 103 : 582-587.
- Joseph, D.R., 1994. Structure, function and regulation of androgen-binding protein/sex hormone-binding globulin. *Vitam. Horm.* 49 : 197-280.
- Kadaï, A.L., Koïde, S.S., 1989. Characterization of a factor with oocyte maturation inducing activity in *Spisula*. *Biol. Bull.* 176 : 8-13.
- Kagawa, N., Waterman, M.R., 1995. Regulation of steroidogenic and related P450s. (Eds) Ortiz de Montellano, P.R., *Cytochrome P450: Structure, Mechanism and Biochemistry* second edition. Plenum Press, New York, p. 419-442.
- Kawasaki, M., 1980. Experiences with the test scheme under the chemical control law of Japan: an approach to structure-activity correlations. *Ecotox. Environ. Safety* 4 : 444-454.

- Kelce, W.R., Monosson, E., Gamcsik, M.P., Laws, S.C., Gray, Jr L.E., 1994. Environmental hormone disruptors evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126 : 275-285.
- Kharat, I., Saatcioglu, F., 1996. Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with liganded estrogen receptor. *J. Biol. Chem.* 271 (18) : 10533-10537.
- Klamer, J., Laane, R.W.P.M., Marquenie, J.M., 1991. Sources and fate of PBC's in the North Sea : A review of the available data. *Wat. Sci. Tech.* 24 : 77-85.
- Kure, L.K., Depledge, M.H., 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from danish coastal waters. *Environ. Pollut.* 84 : 149-157.
- Lamoureux, P., 1977. Estimation des stocks commerciaux de myes (*Mya arenaria* L.) au Québec, Biologie et aménagement des pêches. Ministère de l'industrie et du commerce. Direction des pêches maritimes. Direction de la recherche. Cahiers d'information 78.
- Lagadic, L., Caquet, J.C., Amiard, J.C., Ramade, F., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Eds. Tec. et Doc. Londres. New York.
- Laughlin, R.B.Jr., French, W., Guard, H.E., 1986. Accumulation of bis(tributyltin)oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environ. Sci. Technol.* 20 : 884-890.
- Lawson, D., 1966. The genus *Mya* in the Arctic region. *Malacologia* 3 : 399-418.
- Lee, H.B., Peart, T.E., 2000. Bisphenol-A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Qual. Res. J. Canada* 35 : 283-298.
- Lister, A.L., Van Der Kraak, G.J., 2001. Endocrine disruption: why is it so complicated? *Water Qual Res. J. Canada.* 36(2) : 175-190.
- Lubet, P., Mathieu, M., 1990. Les régulations endocriniennes chez les mollusques bivalves. *Année Biologique.* 235-251.
- MacDonald, R.W., Shaw D.P., Gray, C., 1998. Contamination in lake sediments and fish, p. 23-45. In Gray, C.B.J., Tuominen, T.M. (ed.), *Health of the Fraser River aquatic ecosystem: a synthesis of research conducted under the Fraser River action plan.* En47-119 / 1999E, Environment Canada.
- MacDonald, R.W., Barrie, L.A., Bidleman, T.F., Diamond, M.L., Gregor, D.L., Semkin, R.G., Strachan, W.M.J., Li, Y.F., Wania, F., Alae, M., Alexeeva, L.B., Backus,

- S.M., Bailey, R., Bowers, J.M., Gobeil, C., Halsall, C.J., Harner, T., Hoff, J.T., Jantunen, L.M.M., Lockhart, W.L., Mackay, D., Muir, D.C.G., Pudykiewics, J., Reimer, K.J., Smith, J.N., Stern, G.A., Schroeder, W.H., Wagemann, R., Yunker, M.B., 2000. Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.* 254 : 93-234.
- MacLachy, D.L., Van Der Kraak, G.J., 1995. The phytoestrogen β -sisterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 134 : 305-312.
- Madigou, T., Le Goff, P., Salbert, G., Cravedi, J.P., Segner, H., Pakdel, F., Valotaire, Y., 2001. Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 53 : 173-186.
- Maguire, R.J., 1999. Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Qual. Res. J. Canada.* 34 : 37-78.
- Mathieu, M., Lenoir, F., Robbins, I., 1988. A gonial mitosis-stimulating factor in cerebral ganglia and hemolymph of the marine mussel *Mytilus edulis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 72 : 257-263.
- Matthiessen, P., Gibbs, P.E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(1) : 37-43.
- Matthiessen, P., Reynoldson, T., Billingham, Z., Brassard, D.W., Cameron, P., Chandler, T.G., Davies, I.M., Horiguchi, T., Mount, D.R., Oehlmann, J., Pottinger, T.G., Sibley, P.K., Thompson, H.M., Vethaak, D.A., 1998. Field assessment for endocrine disruption in invertebrates. DeFur P.L., Crane M. Ingersoll C. G. and Tattersfield L. J. *Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing, and assessment.* Noordwijkerhout, The Netherlands: SETAC. 199-270.
- McMaster, M.E., Van Der Kraak, G.J., Portt, C.B., Munkittrick, K.R., Sibley, P.K., Smith, I.R., Dixon, D.G., 1991. Changes in hepatic mixed-function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 21 : 199-218.
- McMaster, M.E., Van Der Kraak, G.J., Munkittrick, K.R., 1995. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comp. Biochem. Physiol.* 112C : 169-178.
- Merriman, J.C., Anthony, D.H.J., Kraft, J.A., Wilkinson, R.J., 1991. Rainy river water quality in the vicinity of bleached kraft mills. *Chemosphere* 23 : 1605-1615.

- Milligan, S.R., Khan, O., Nash, M., 1998. Competitive binding of xenobiotic oestrogens to rat alpha-fetoprotein and to sex steroid binding proteins in human and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112 : 89-95.
- Morcillo, Y., Porte, C., 2000. Evidence of endocrine disruption in clams -*Ruditapes decussata*- transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environm. Pollut.* 107 : 47-52.
- Morcillo, Y., Porte, C., 1997. Interaction of tributyl and triphenyltin with microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. *Aquat. Toxicol.* 38 : 35-46.
- Mori, K., 1969. Effects of steroids on oyster. IV. Acceleration of sexual maturation in female *Crassostrea gigas*. *Bull. Jap. Soc. Fish.* 35 : 1077-1079.
- Muir, D., Braune, B., DeMarch, B., Norstrom, R., Wagemann, R., Lochart, L., Hargrave, B., Bright, D., Addison, R., Payne, J., Reimer, K., 1999. Spatial and temporal trends and effects of contaminants in the Canadian arctic marine ecosystem: A review. *Sci. Total Environ.* 230 : 83-144.
- Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., Dixon, D.G., 1992. Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed-function oxygenase activity, and the presence of external lesions in Lake Whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to bleached kraft mill effluent. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49:1560 -1569.
- Newell, R.C., Hidu, H., 1986. Life histories and environmental requirements of coastal fish and invertebrates (North Atlantic). *Biol. Rep.* 1-17.
- Oberdorster, E., McClellan-Green, P., 2002. Mechanisms of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar. Environ. Res.* 54 (3-5) : 715-718.
- Oehlmann, J., Stroben, E., Schulte-Oehlmann, U., Bauer, B., 1998. Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassata* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). *Aquat. Toxicol.* 43 : 239-260.
- Okey, A.B., 1990. Enzyme induction in the cytochrome P-450 system. *Pharmac. Ther.* 45 : 241-298.
- Osada, M., Matsutani, T., Nomura, T., 1987. Implication of catecholamine during spawning in marine bivalve molluscs. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.* 12 : 241-252.

- Osada, M., Nishikawa, M., Nomura, T., 1989. Involvement of prostaglandins in the spawning of the scallop, *Pactinopecten yessoensis*. Comp. Biochem. Physiol. 94C : 595-601.
- Pazos, A.J., Mathieu, M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. Gen. Comp. Endocrinol. 113 : 112-120.
- Peek, K., Gabbott, P.A., Runham, N.W., 1989. Adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. II. Seasonal changes in the distribution of dispersed cells in a preformed Percoll density gradient. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 126 : 217-230.
- Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J.P., Valotaire, Y., Pakdel, F., 1997. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics : Recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. J. Mol. Endocrinol. 19 : 321-335.
- Petra, P.H., Stanczyk, F.Z., Namkung, P.C., Fritz, M.A., Novy, M.J., 1985. Direct effect of sex steroid-binding protein (SBP) of plasma on the metabolic clearance rate of testosterone in the Rhesus macaque. J. Steroid Biochem. 22 : 739-746.
- Pfitzenmeyer, H.T., 1965. Annual cycle of gametogenesis o the soft-shelled clam, *Mya arenaria*, at Solomons, Maryland. Chesapeake Sci. 6(1) : 52-59.
- Pierce, R.C., Whittle, D.M., Bramwell, J.B., 1998. Les contaminants chimiques dans les écosystèmes aquatiques du Canada. Pêches et Océans, 361 p.
- Pipe, R.K., 1987. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* : an ultrastructural study. Mar. Biol. 95 : 405-414.
- Preziosi, P., 1998. Endocrine disruptors as environmental signallers: An introduction. Pure Appl. Chem. 70 : 1617-1631.
- Rattner, B.A., Hoffman, D., Marn, C.M., 1989. Use of mixed-function oxygenases to monitor contaminant exposure in wildlife. Environ. Toxicol. Chem. 8 : 1093-1102.
- Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 1990. Variation in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol. 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 as chromatography and mass spectrometry. Comp. Biochem. Physiol. 95B(2) : 303-309.

- Robbins, I., Lenoir, F., Mathieu, M., 1990. A putative neuroendocrine factor that stimulates glycogen mobilization in isolated glycogen cells from the marine mussel *Mytilus edulis*. Gen. Comp. Endocrinol. 79 : 123-129.
- Ronis, M.J.J., Mason, A.Z., 1996. The metabolism of testosterone by the Periwinkle (*Littorina littorea*) *in vitro* and *in vivo* : effects of tributyltin. Mar. Environ. Res. 42(1-4):161 - 166.
- Ropes, J., Stickney, A.P., 1965. Reproductive cycle of *Mya arenaria* in New England. Biol. Bull. 128 : 315-327.
- Ropes, J.W., 1982. Hermaphroditism, sexuality and sex ratio in the surf clam, *Spisula solidissima*, and the soft-shell clam, *Mya arenaria*. Nautilus 96 : 141-146.
- Roseberry, L., 1988. Étude de la croissance et de la reproduction chez *Mya arenaria* (Bivalva : Mollusca) dans la zone intertidale de l'estuaire du Saint-Laurent. Mémoire de Maîtrise en Océanographie, Université du Québec à Rimouski, 117p.
- Rosner, W., 1990. The functions of corticosteroid-binding globulin and sex hormone binding globulin: recent advances. Endocrine Rev. 11 : 80-91.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. J. Biol. Chem. 272 (6) : 3280-3288.
- Safe, S.H., 1995. Modulation of gene expression and endocrine responses pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. Pharmac. Ther. 67 (2) : 247-281.
- Saint-Hilaire, N., 1997. Conséquences physiologiques d'une exposition chronique au tributyltin chez *Mya arenaria* (L.) et *Mytilus edulis* (L.). Mémoire de Maîtrise en Océanographie, Université du Québec à Rimouski, 95p.
- Saint-Louis, R., De Mora, S., Pelletier, E., Doidge, B., Leclair, D., Mikaelian, I., Martineau, D., 2000. Hepatic butyltin concentrations in Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) from the St Lawrence estuary and Northern Quebec, Canada. Appl. Organom. Chem. 14 : 218-226.
- Servos, M., Bennie, D., Burnison, K., Sherry, J., Brown, S., Van Der Kraak, G., McInnis, R., Toito, J., Scott, I., Jurkovic, A., Neheli, T., Nuttley, D., Hay, D., Schnell, A., Ternes, T., 1998. Alkylphenols and natural / synthetic estrogens in municipal effluents in Ontario. 19th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Charlotte, NC, November 15-19, PWA205.

- Sheldon, L.S., Hites, R.A., 1979. Sources and movement of organic chemicals in the Delaware River. *Environ. Sci. Technol.* 13 (5) : 574-579.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lawrence, S., Amarneh, B., Ito, Y., Fisher, C.R., Michael, M.D., Mendelson, C.R., Bulun, S.E., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15 : 342-355.
- Smith, B.S., 1981. Male characteristics on female mud snails caused by antifouling bottom paints, *J. Appl. Toxicol.* 1: 22-25.
- Solé, M., 2000. Effects of tributyltin on the MFO system of the clam *Ruditapes decussata*: a laboratory and field approach. *Comp. Biochem. Physiol.* 125C : 93-101.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Olea-Serrano, F., 1995. The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103 (7) : 173-178.
- Spink, D.C., Lincoln, D.W., Dickerman, H.W., Gierthy, J.F., 1990. 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 β -estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 6917-6921.
- Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Goad, L.J., 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar. Environ. Res.* 32 : 37-49.
- Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., Branson, D.R., O'Block, S.T., Harris, L.R., 1998. A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36 : 2149-2173.
- Stocco, D.M., 2000. Intramitochondrial cholesterol transfer. *Biochim. Bioph. Acta* 1486 : 184-197.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103 (7) : 173-178.
- Takeuchi, I., Takahashi, S., Tanabe, S., Miyazaki, N., 2001. *Caprella* watch: a new approach for monitoring butyltin residues in the ocean. *Mar. Environ. Res.* 52 : 97-113.
- Thain, J.E., Waldock, M.J., 1986. The impact of tributyltin (TBT) antifouling paints on molluscan fisheries. *Water Sci. Techn.* 18 : 193-202.

- Tollefsen, K.E., 2002. Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 56 : 215-225.
- Tyler, C.R., Jobling S., Sumpter J. P., 1998. Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.* 28 (4) : 319-361.
- U.S. Environmental Protection Agency, 1997. Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Technical Panel, Office of Research and Development. EPA / 630 / R-96 / 012.
- Van Der Krak, G.J., Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., Chang, J.P., 1992. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent disrupts the pituitary-gonadal axis of white sucker at multiple sites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 115 : 224 -233.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, 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. *Crit. Rev. Toxicol.* 30(1) : 71-133.
- Waldock M.J., Thain J.E., Miller D., 1983. The accumulation and depuration of bis tributyltin oxide in oysters : a comparison between the Pacific oysters, *Cassostrea gigas* and the European flat oyster, *Ostrea edulis*. ICES, CM 1983/E : 59.
- Walker, M.K., Peterson, R.E., 1994. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during early development. *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 817-820.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W.M., Burt, J.P., 1992. Pesticide properties database for environmental decision making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 123 : 1-157.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., Parker, M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinol.* 135(1) : 175-182.
- Wong, C.I., Kelce, W.R., Sar, M., Wilson, E.M., 1995. Androgen receptor antagonist versus agonist activities of the fungicide vinclozin relative to hydroxyflutamide. *J. Biol. Chem.* 270 (34) : 19998-20003.
- Zacharewski, T.R., Meek, M.D., Clemons, J.D., Wu, Z.F., Fielden, M.R., Matthews, J.B., 1998. Examination of the in vitro and in vivo estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.* 46 : 28.

CHAPITRE 2

SEASONAL GONAD PROGESTERONE PATTERN IN THE SOFT-SHELL CLAM MYA ARENARIA

A. SIAH, J. PELLERIN, A. BENOSMAN, J.-P. GAGNÉ, AND J.-C. AMIARD

Comparative Biochemistry and Physiology part A (2002) 132 : 499-511

2.1. Résumé

La stéroïdogénèse qui joue un rôle important dans la régulation du cycle reproducteur chez les vertébrés reste pour la grande majorité des invertébrés encore inconnue. L'objectif de cette étude est d'élucider le lien entre le niveau de la progestérone et le cycle reproducteur chez *Mya arenaria*. Les organismes ont été échantillonnés à l'Anse à l'Original (Parc Provincial du Bic, Québec, Canada) de juillet à novembre 1998. Les observations histologiques nous montrent que les femelles ont atteint le stade de ponte en août et septembre alors que les gonades mâles sont au stade mûr. Cette période de forte activité gamétogénique est caractérisée par une déplétion en réserves lipidiques. Ces lipides pourraient être utilisés comme source d'énergie pour la gamétogénèse et comme substrat pour la stéroïdogénèse. La progestérone a été caractérisée dans la gonade chez *Mya arenaria* par la chromatographie liquide couplée au spectre de masse (LC-MS) et quantifiée par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Les niveaux de la progestérone dans la gonade augmentent au cours du stade mûr chez le mâle et de ponte chez la femelle. Ces résultats démontrent, pour la première fois, que la progestérone joue un rôle important dans la régulation du système reproducteur chez *Mya arenaria*.

Mots clés : Mollusques; *Mya arenaria*; Gamétogénèse; Histologie; Lipides; Progesterone; Reproduction; Maturation sexuelle.

2.2. Abstract

Steroidogenesis, which plays a major role in the reproductive cycle of vertebrates, is still for the most part, unknown in invertebrates. The aim of this study was to examine the link between progesterone and the reproductive cycle in *Mya arenaria*. The soft-shell clams, *Mya arenaria* were collected in Anse à l'Original (Parc Provincial du Bic, Québec, Canada) from July to November 1998. Histological data have shown that female gonads of *M. arenaria* were in the spawning stage in August and September, while the male gonads were in the ripe stage. This period of active gametogenesis was associated with a depletion of lipid reserves. These lipids could be used as a source of energy and as a substrate for steroidogenesis. Liquid Chromatography coupled to Mass Spectroscopy (LC-MS) and quantified by Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) determined progesterone. Progesterone levels in the gonad were increased during the ripe stage in the male and during the spawning stage in the female. These results indicate, for the first time, that progesterone, as in vertebrates, may play a role in the reproductive cycle of *M. arenaria*.

Keywords: Molluscs; Clams; Gametogenesis; Histology; Lipids; Progesterone; Reproduction; Sexual maturation.

2.3 Introduction

The majority of studies on endocrine regulation of reproduction within the phylum Mollusca are related to neuroendocrinology aspects. It has been demonstrated that the neurosecretory activity of the cerebral ganglia was correlated with the reproductive cycle (Lubet and Mathieu, 1990). The stimulatory effect of a neurohormone on gametes multiplication was showed in *Mytilus edulis* by using organ culture experiments (Mathieu et al., 1991). Recently, bioassay results have demonstrated that GnRH activated the DNA synthesis in gamete cells of *M. edulis* and *Crassostrea gigas* (Pazos and Mathieu, 1999). The role of steroids on the reproductive cycle in bivalves has not, however, been studied extensively. Once understood, this role will help to define the importance of endocrine disruptors in invertebrates.

Steroids play a critical role in sexual development and are synthesised in steroidogenic tissues from a common precursor, the cholesterol. It appears that the key enzymes in steroidogenesis were conserved during evolution as it has been demonstrated by the presence of 3 β HSD, C₁₇₋₂₀ lyase, 17 β HSD and 5 α reductase in *M. edulis* (De Longcamp and Drosdowsky, 1974). Consequently, it has been shown that the biosynthesis of steroids was occurring in male and female *M. edulis*. Identification of progesterone in male and female *M. edulis* was first carried out by gas chromatography-mass spectrometry by Reis-Henriques et al. (1990) who studied the relationship between progesterone and the different stages of the reproductive cycle (Reis-Henriques and Coimbra, 1990). The patterns of progesterone in both sexes were similar and the maximum levels of

progesterone were observed at the time of spawning, suggesting that progesterone is a modulator of the reproductive cycle in bivalves (Reis-Henriques and Coimbra, 1990).

Studies concerning the reproductive cycle of *Mya arenaria*, an ubiquitous bivalve found in coastal marine and estuarine ecosystems in the northern hemisphere (Potts, 1993), were still limited until now to the histological examination of gonads, to characterize the development stages during the reproductive cycle. In the estuarine ecosystems like the St. Lawrence River, two periods of spawning have been observed in late spring and in autumn (Roseberry et al., 1991; Tremblay, 1992). This bimodal pattern of reproduction was closely linked to the availability of nutrients. Similar observations have also been reported on the North Atlantic coast from Chesapeake Bay to the Gulf of Maine (Brousseau 1978; Ropes and Stickney 1965, Shaw and Hammons, 1974).

Moreover, a study of the sterol composition of *M. edulis* and *M. arenaria* in the Baltic Sea has shown that the qualitative composition was similar and that cholesterol was the most abundant component (Jarzebski, 1985). These results show that precursors of steroids are available in these species. A very high-density of lipoprotein was isolated from *M. arenaria* hemolymph, by which the cholesterol could be transported to the gonad (Clayton, 1996), before being transformed in sexual steroids. As no comparable study has been performed yet to establish the role of progesterone in the control of gametogenesis in *M. arenaria*, the purpose of this study was to examine the relationship between the variation of progesterone levels and the development stages in the gonad. Such studies are important to

be performed in different field conditions since this bivalve is of ecologic and economic importance.

2.4. Materials and methods

2.4.1. Animals

The bivalve *Mya arenaria* is suitable for this study since this infaunal species is widely distributed, abundant and sedentary. Clams are representative of the intertidal fauna of the lower St. Lawrence Estuary in which resides a *Macoma balthica* boreo-atlantic community (Desrosiers and Brêthes, 1984) and they have an economic importance in the northern hemisphere. Specimens of *M. arenaria*, 6.8 ± 1.3 cm long ($n=77$), were collected at low tide with a hand rake at 15-20 cm depth, monthly, from July to November 1998 in the Anse à l'Original (Parc Provincial du Bic, Quebec, Canada) (Fig. 2.1). After rinsing clams with seawater, they were rapidly placed in coolers containing crushed ice and transported to our field laboratory. Length and total weight of clams were recorded before the dissection of tissues.

2.4.2. Gonado-somatic index

After removal of the shells, the gonado-somatic index ($GSI = (\text{gonad wet weight in g} / \text{body weight without shell in g}) \times 100$) was estimated for each clam.

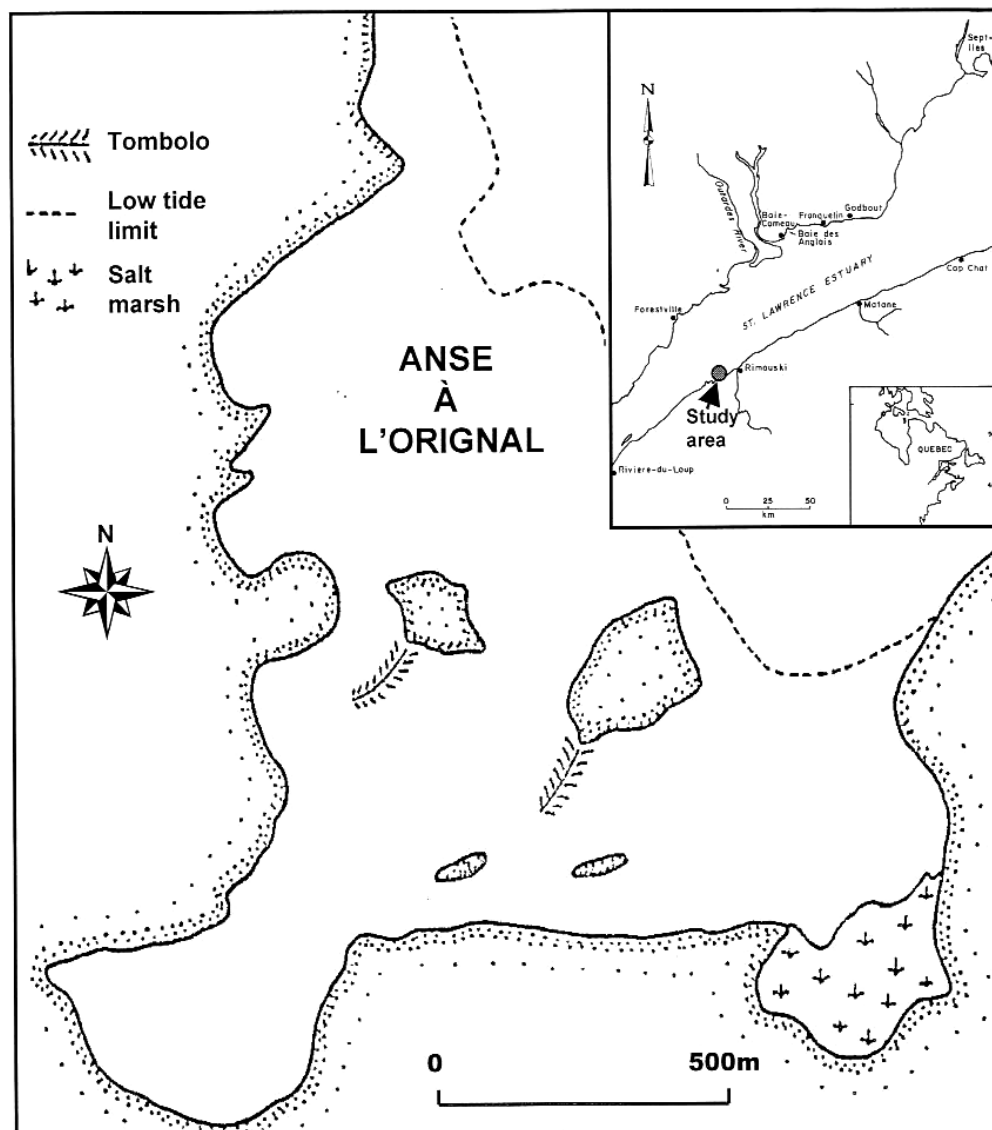


Figure 2.1: Map of the sampling station, Anse à l'Original (Québec, Canada), located on the south shore of the lower St. Lawrence Estuary (modifiée de Roseberry, 1988)

2.4.3. Histological examination

One fraction of the gonad was quickly dissected, frozen on dry ice and kept at -80°C until analysis. The other fraction of the gonad was fixed for 24 hours in aqueous Bouin's fixative for histological determination. After fixation, a fraction of the gonad was placed in 50% and then in 70% of ethyl alcohol during 24 hours. Increasing concentrations (80%, 90%, 95%) of ethyl alcohol were used to dehydrate the tissues. The tissues were then embedded in methacrylate resin obtained from Polysciences, using the JB-4 embedding Kit (Semba, 1979). Serial sections were cut at 3 μ m and stained with Lee's methylene blue-basic fuchsin stain. The gonad organization and the cytological characteristics of the germinal and somatic cells of both sexes were determined using a light microscope (Olympus BX50).

2.4.4. Lipids analysis

The total lipids were determined by a sulphy-phospho-vanillin reaction after homogenisation of gonads (0.1g) in phosphate buffer, pH=7 (Frings et al., 1972). Olive oil standards (Sigma) between 0 and 10 mg/ml were used for standard curves. Absorbance was measured with a spectrophotometer Beckman DU 640 and lipid concentrations of samples were calculated from these curves.

2.4.5. Steroid extraction from homogenates

Samples (0.1g) of gonad tissue were homogenised in 0.5 ml of water for 5 sec using a Weaton potter on ice and a Teflon homogeniser. Homogenates were then pulse-sonicated for 10 sec on ice using a Banson Sonifier Cell Disruptor 350 with a micro tip (output level = 2, duty cycle = 40%). Afterwards, 0.4 ml of pre-warmed 0.025 M HCl was added to the homogenates for a final pH of 2.0, then vortexed, and incubated for 15 min at 40°C to enhance the extraction of steroids from binding proteins. After this incubation, 1.25 ml of 0.07 M Na₂HPO₄ buffer (pH 7.4) was added to neutralize the homogenates. Methylene chloride (7 ml) was then added to each homogenate and vortexed thoroughly. Homogenates were subsequently centrifuged at 2500 rpm for 10 min, to separate the aqueous and organic phases. Organic (steroid-containing) phases were removed, pooled and dried under nitrogen in a 40°C water bath (Hines et al., 1990; Hines and Watts, 1992). Steroids were then dissolved in 0.5 ml MeOH for LC-MS analysis or in 0.5 ml Enzyme ImmunoAssay (EIA) buffer for quantification with the Enzyme ImmonuSorbent Assay (ELISA).

Recovery of progesterone was assessed on a pool of gonad tissue and assays were performed in triplicates. Assays consisted of determination of progesterone in homogenates after adding progesterone standards, at different concentrations, to the pool of homogenates. Hormones in these tissues were extracted and determined by ELISA afterwards. Recovery was then calculated after subtraction of progesterone values in the homogenates from values of the hormone in the homogenates in which was added the external standard. We then obtained a recovery of 65±9% (n=3), which was similar to the

74% value obtained in other studies carried out in sea star testes and ovaries (n=6) (Hines et al., 1990).

2.4.6. LC-MS Conditions

An AS 3000 autosampler equipped with a P4000 pump (TSP, Finnigan) and an injector with a 20- μ L external loop sample was used for the HPLC conditions. The sample was separated through a Phenomenex Curosil PFP reverse phase column (250 mm x 4.6 mm i.d. x 5 μ m) filled with 5 μ m particles. The binary gradient used is shown in Table 2.1. The solvent A consisted of acetonitrile with 0.1% glacial acetic acid and the solvent B was water with 0.1% glacial acetic acid. A flow rate of 0.8 ml.min⁻¹ was used in the system.

LCQ Ion Mass Analyser (Finnigan, USA) was used with an electrospray interface (ESI). The XcaliburTM data system (Finnigan, USA) was used to process the LC-MS data. The optimisation of the mass spectrometer conditions was for a progesterone standard in a constant infusion mode, with a sheath flow of Acetonitrile: Water (50:50, v/v) and with 0.1% glacial acetic acid. Full scan mass spectra were obtained by continuous scanning from m/z 200 to 1100 atom mass unit (amu).

The instrument was operated in MS-MS full scan positive ion mode. The injection time was set at 200 ms with a total of three microscans per scan. The following ESI inlet conditions were applied: sheath gas (nitrogen) pressure 80 p.s.i., auxiliary gas (nitrogen) 20 p.s.i., capillary temperature 250⁰C, spray voltage 4.50 kv. The isolation width of the parent

Time (min)	Flow rate (ml/min)	%A	%B	Conditions
0	0.8	25	75	Injection
5	0.8	25	75	Isocratic
12.5	0.8	35	65	Linear gradient
20	0.8	55	45	Linear gradient
28	0.8	65	35	Linear gradient
30	0.8	95	5	Linear gradient
33	0.8	95	5	Washing
34	0.8	25	75	Linear gradient
39	0.8	25	75	Equilibration

Table 2.1: Gradient elution used for the separation of progesterone by High-Performance Liquid Chromatographic (HPLC)

ion was 3 mass per charge units. Tandem mass spectrometry (MS/MS) product in spectra were obtained by selection of the adduct ions $[M-H]^+$. The relative collision energy to induce fragmentation of the parent ion $[M-H]^+$ in the ion trap was optimized with helium collision gas at 20%.

2.4.7. Enzyme ImmunoSorbent Assay

Progesterone levels were quantified in the gonads of male and female of *M. arenaria* using ELISA Kits purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) (Darvas et al., 1997). The method used is based on competitive immunoreactions with a progesterone-specific antibody with the free hormone in the sample and a steroid analogue linked to an acetyl cholinesterase reporter enzyme as a tracer. Washing the plate and subsequent colour development with Ellman's reagent for 1.5 hr at 25°C followed incubation of standard solutions, samples, and the progesterone-acetylcholinesterase tracer in the plate wells for 1 hr. Cross-reactivity of various steroids with the antiserum were as follow: progesterone 100%, pregnenolone 61%, 17 β -oestradiol 7.2%, 5 β -pregnan-3 α -20-one 6.7%. The intra- and inter-assay variations were less than 10%. Standard curves were carried out with progesterone standards between 0 and 1000 pg/ml. A Sigma Plot (Jandel Corp.) computer program reduced data to log-logit representation and sample concentrations were extrapolated from these curves according to EIA Kits (Cayman Chemical Co). All samples and standards were prepared in duplicate. Progesterone data have not been corrected for extraction recovery.

All samples and standards were prepared in duplicate. Progesterone data have not been corrected for extraction recovery.

2.4.8. Statistical analysis

The results in this study are presented as the mean of the samples collected each month. Sigma Stat for Windows (Jandel Corp.) was used for statistical analysis. Normality and homogeneity of variances were verified and a parametric one-way analysis (ANOVA) was performed on data. A Student t-test for a normal distribution was used to compare two groups. When the distribution was not normal, a Mann-Whitney rank sum has been used.

2.5. Results

2.5.1. Histological data

The reproductive stages were characterized after morphological observations of gametes (Table 2.2). The criteria used were based on morphological observations (Fig. 2.2 and 2.3) as described in Gauthier-Clerc et al. (1998). Sex was determined and each clam was classified in accordance with the criteria listed in Table 2.2 and the percentage of clams in each stage was calculated.

In July, more than 50% of the gonads were in indifferent and spent stages in both sexes. In males, maturation of gonads began for a second time in August where 50% of the

Stages	Female	Male
Indifferent	Presence of the follicle cells (Fig., 2.2a)	Presence of the follicle cells (Fig., 2.3a)
Development	Proliferation of the oocytes (Fig., 2.2b)	Proliferation of the spermatocytes (Fig., 2.3b)
Ripe	Maturation of the oocytes (Fig., 2.2c)	Maturation of the spermatozoa (Fig., 2.3c)
Spawn	Release of the oocytes (Fig., 2.2d)	Release of the spermatozoa (Fig., 2.3d)
Spent	The alveoli are empty (Fig., 2.2e)	The alveoli are empty (Fig., 2.3e)

Table 2.2: Description of the male and female reproductive stages (tirée de Coe et Turner, 1938)

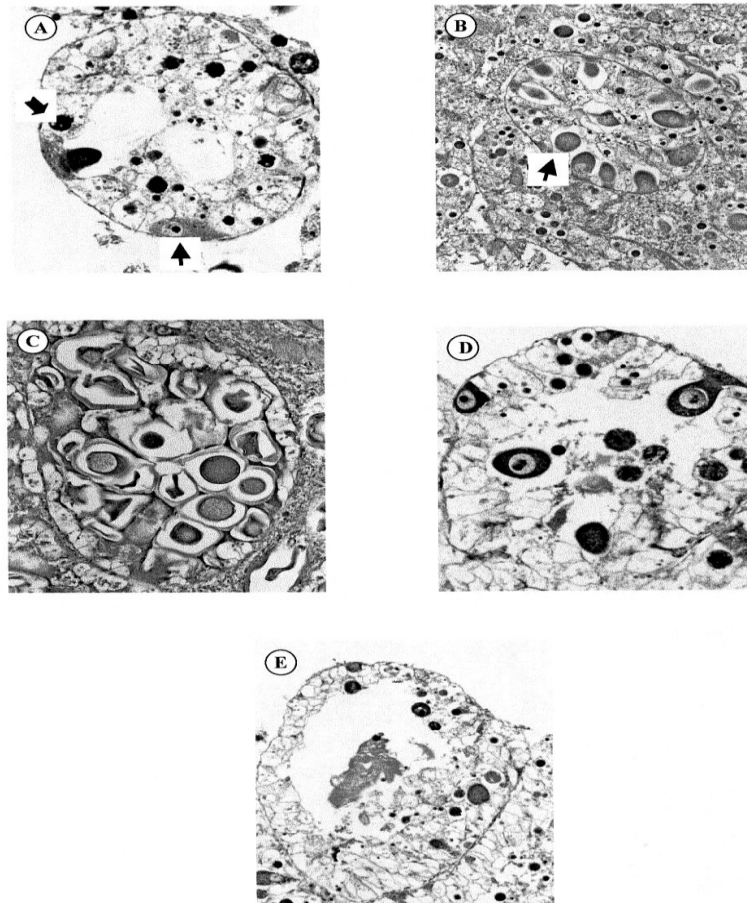


Figure 2.2: Photomicrographs of sections of female gonads of *Mya arenaria*

Indifferent stage (200x): The alveoli are filled with follicle cells (↗) which contain the distinctive female inclusion. Small primary oocytes (↘) are present in the alveolar membrane. B) Developing stage (100x): The primary oocytes, attached to the basal membrane of the alveoli, proliferate toward the centre of the alveolus. C) Ripe stage (100x): There are many mature, spherical oocytes that appear to be free within the lumen. The follicle cells have decreased in size. D) Spawning stage (200x): The ripe oocytes were ejected from the alveolus. E) Spent stage (200x): The alveoli are empty and the follicle cells reappear in the alveolar membrane.

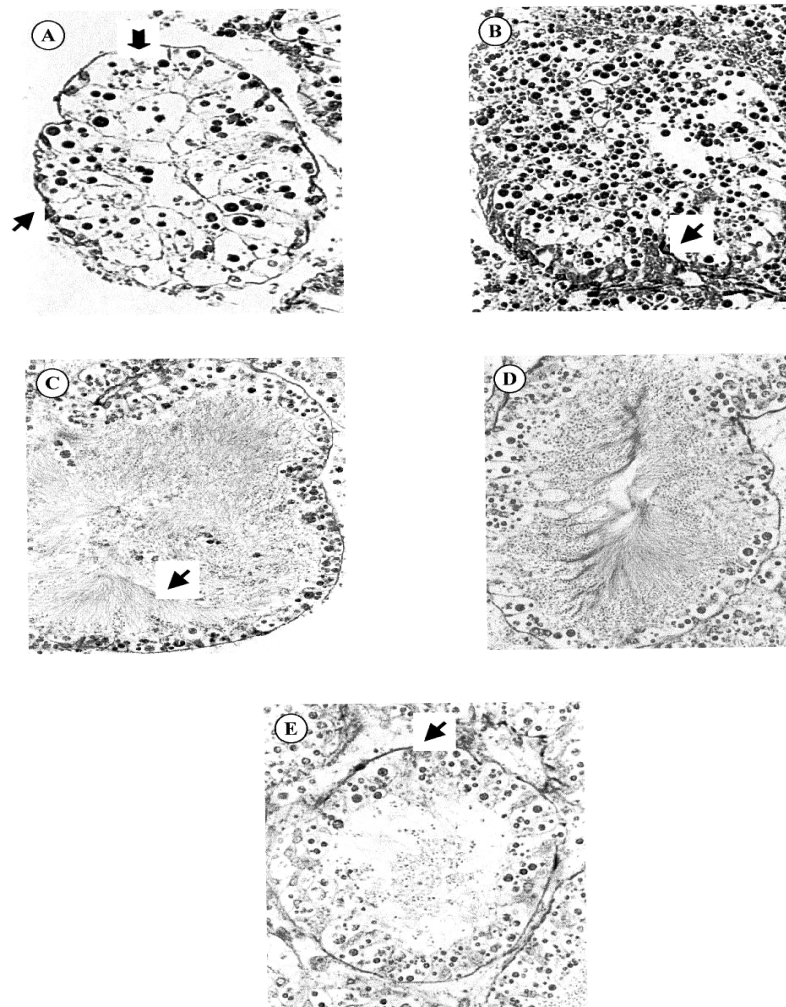


Figure 2.3: Photomicrographs of sections of male gonads of *Mya arenaria*

Indifferent stage (200x): The alveoli are filled with follicle cells (➡) which contain the typical male inclusion. A few spermatogonia (➡) are visible at the periphery of the lumen. B) Developing stage (200x): The primary spermatocytes at the basal membrane proliferate toward the centre of the alveoli C) Ripe stage (200x): The alveoli are filled with dense radiating bands of spermatozoa . Their tails are projected towards the central lumen. D) Spawning stage (200x): A few spermatozoa remain in the radiating bands. E) Spent stage (200x): Inclusions reappear within the follicle cells and some of the spermatogonia are visible.

individuals were in ripe stage (Fig. 2.4b). In September 83% of the males reached the ripe stage but no males were observed in spawning stage (Fig. 2.4b). However, 100% of the males were in development stage and 67% in November (Fig. 2.4b). We can then assume that males have spawned between September and October.

Nevertheless, the majority of females spawned in August (44%) and 70 % were in the spent stage in September where the individuals released completely their gametes (Fig. 2.4a). Progressive developments of the females' germs cells were observed in October where 67% of the females were in the development stage. In November 50% of the females reached the ripe stage (Fig. 2.4a).

2.5.2. Variation of gonad lipid levels

The gonad lipid levels for both males and females are presented in Figure 2.5. Lipids in the gonads of *M. arenaria* ranged from 43 mg/g weight wet (w.w) in July to 20 mg/g w.w in September. Gonad lipid levels decreased significantly by 50% in September in comparison with the month of July ($P < 0.05$).

2.5.3. Detection of progesterone using LC-MS

Detection of progesterone in multiple crude gonad extracts was carried out by ESI-LC-MS. Figure 2.6A shows a mass chromatogram of the steroids extracts. This chromatogram illustrates the complexity of the mixture between 17 and 39 minutes while

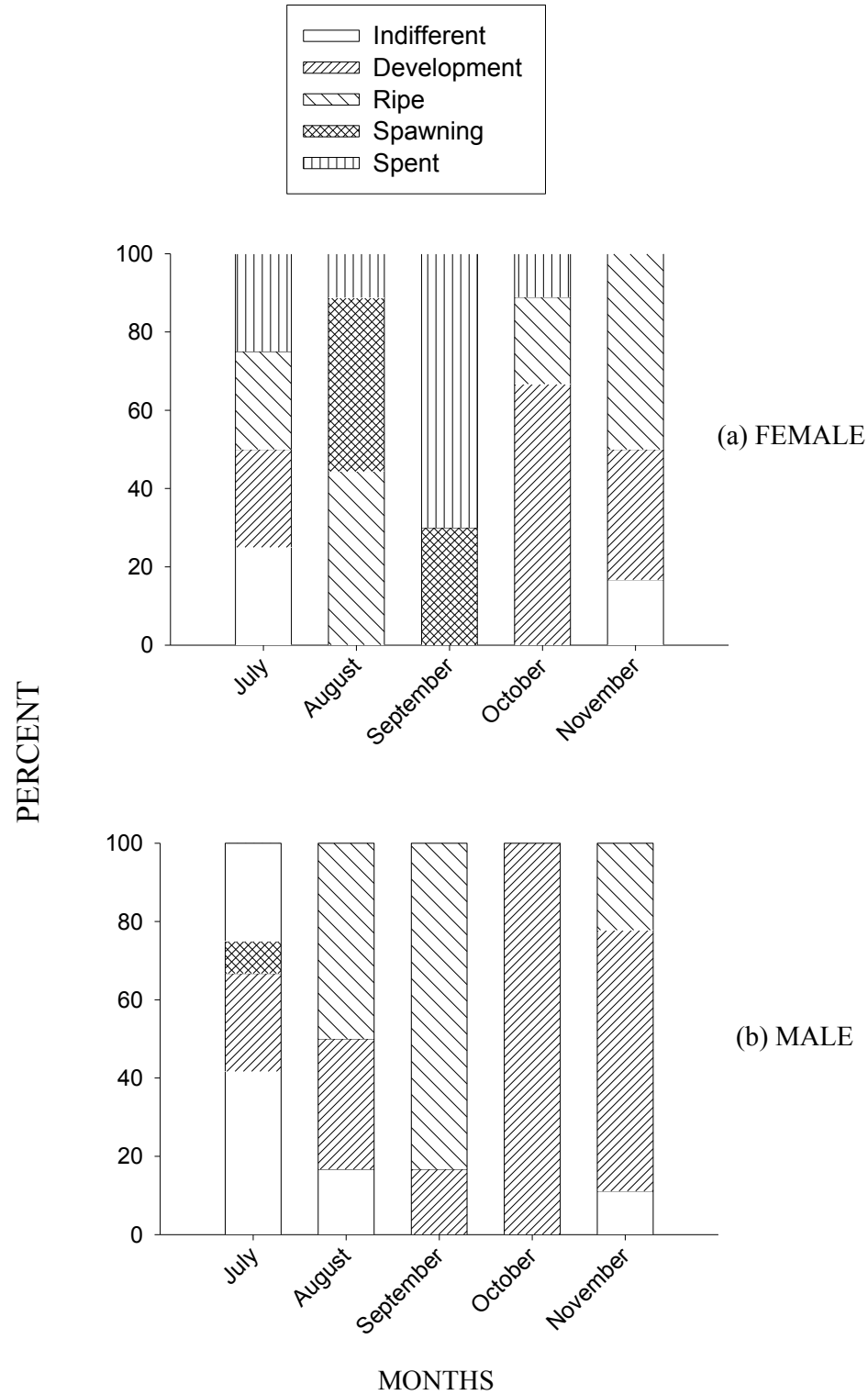


Figure 2.4: Percentage of females (a) and males (b) in each stage of reproductive cycle

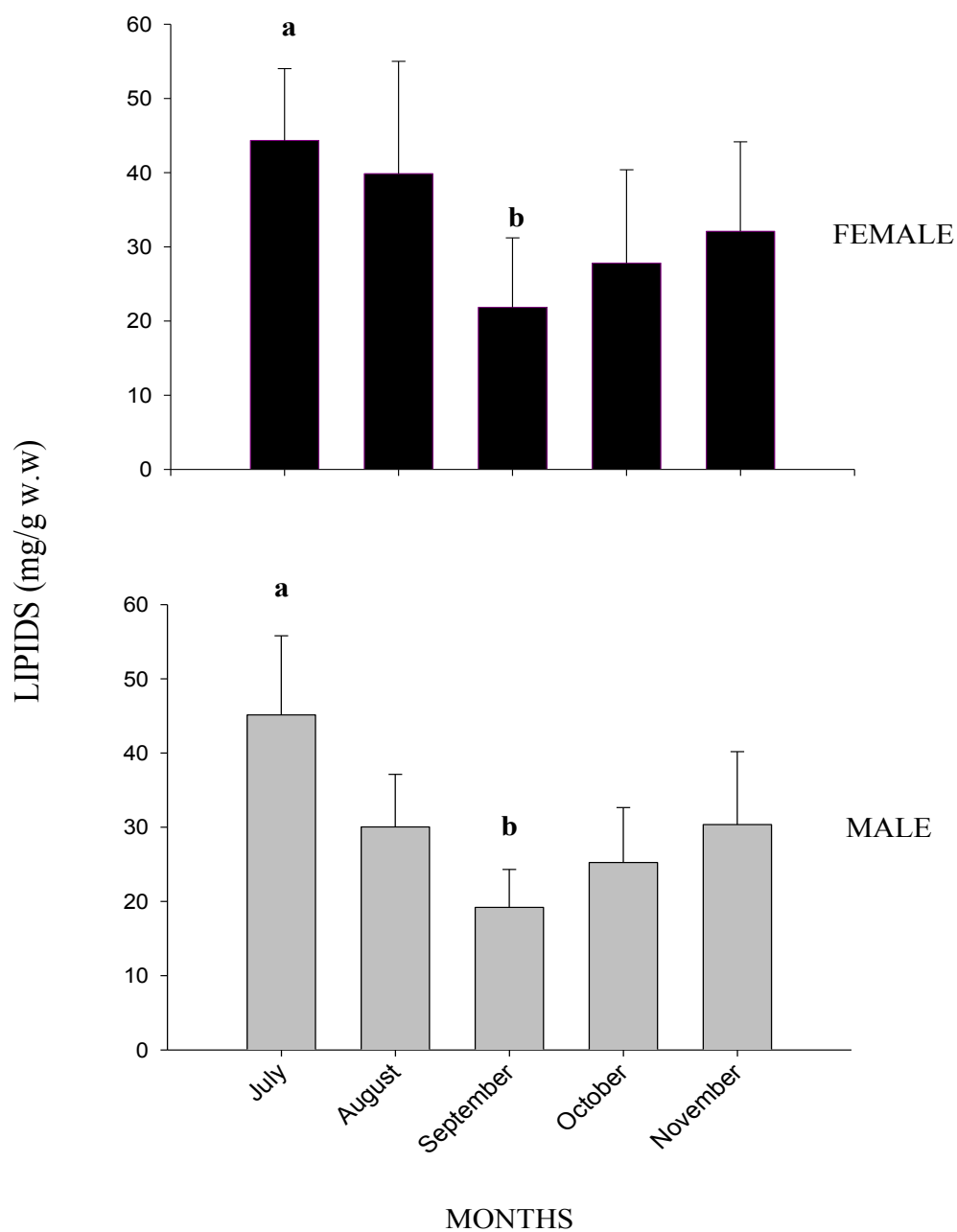


Figure 25: Variation of lipid concentration in the gonads of *Mya arenaria*. Each value of lipid concentration indicates the mean $\pm$ SE. $P=0.05$. a is significantly different from b

continuously scanning from m/z 155 to m/z 1100, with an increment of 1 μma . A profile of progesterone in the sample was extracted and individually observed by plotting the mass chromatogram for between m/z 314 – 316 Dalton (Fig. 2.6B). Only one peak was observed at 21.68 min (the retention time of the progesterone standard was of 22.39 min).

Figure 2.7A shows the ESI mass spectrum of progesterone illustrating the protonated molecules $[M+H]^+$ at m/z 315 with very few fragments detected within the scanned mass range (m/z 200-1100), and so, little structural information was obtained under these conditions. Furthermore, combination with chromatographic relative retention time, using standard analysis conditions, and comparison to the progesterone standard, permitted the identification of the compound at 21.68 min. The full MS/MS spectrum of this peak shows ions at m/z 315 $[M+H]$, 297 ($[M+H-18]$, base peak) and 279 $[M+H-18-18]$ and is similar to the characteristics of progesterone. The major peaks observed at m/z 296 and 279 were obtained by MS/MS spectra using positive ionisation mode in the range of 75 to 325 amu (Fig. 2.7B).

2.5.4. Gonado-somatic index and Progesterone trends in the gonads of *Mya arenaria*

Changes in the gonado-somatic index and progesterone levels of female and male clams during the reproductive cycle are shown in Figure 2.8A. The gonado-somatic index in both sexes has declined in September (6%) in comparison with August (9%) and reached a minimal value in November (3%) (Fig. 2.8A).

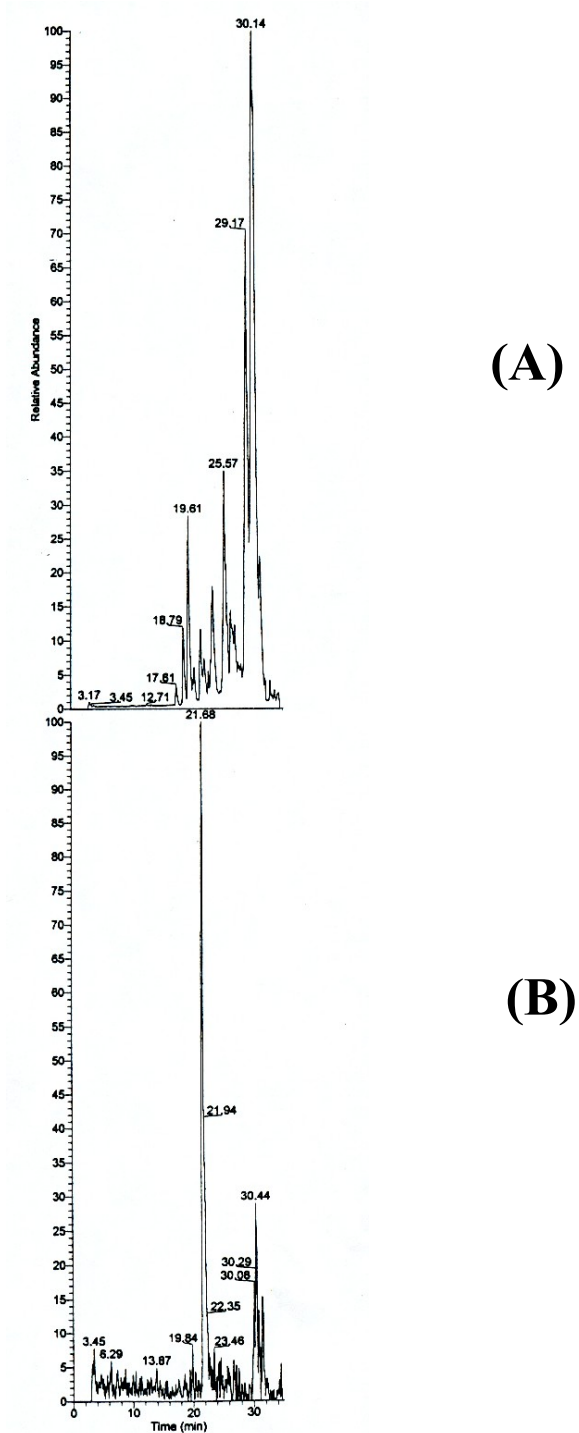


Figure 2.6: Full-scan mass chromatograms of m/z 155-1100 (A) and m/z 314-316 (B) molecular weight for the positive ion ESI-LC-MS analysis of gonad tissue extract

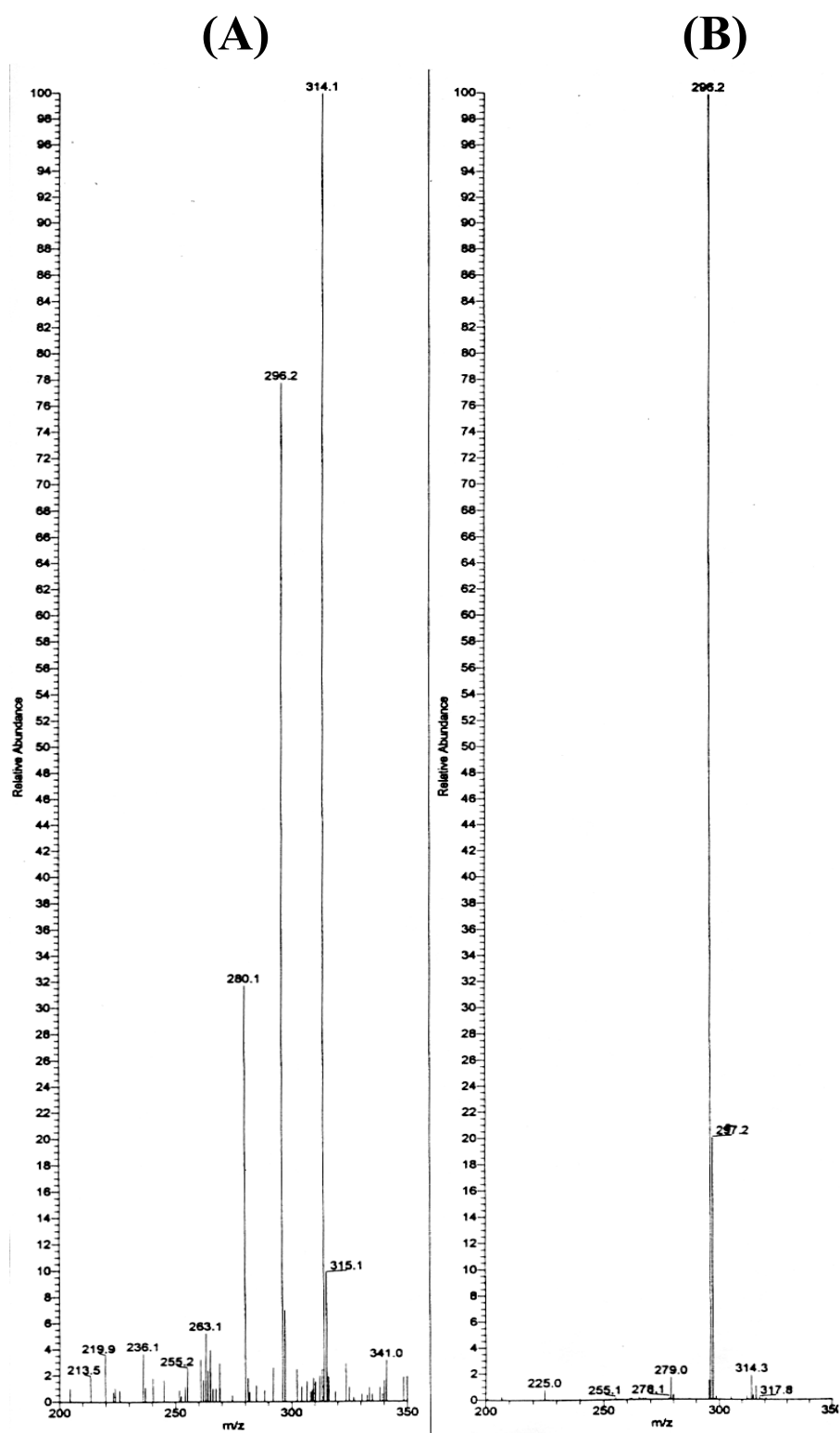


Figure 2.7: Full scan mass spectrum (A) and MS/MS spectrum (B) of the progesterone from gonad tissue extract

The progesterone levels in the different samples of *M. arenaria* of both sexes, collected between July and November 1998, are presented in Figure 2.8B. Progesterone levels in the gonads of both sexes showed a maximum in September (5 ng/g).

2.6. Discussion

Our data agree with other studies showing that spawning occurs in late spring and summer. In general, the reproductive cycle of *M. arenaria* is being distinguished by this bimodal pattern of reproduction linked to the availability of nutrients and auspicious temperatures (Roseberry et al., 1991; Brousseau 1978). Histological data has showed that gametogenesis occurred in September when most of the males were in the ripe stage and the females were in the spawning stage. In both male and female *M. arenaria* in Anse à l'Original, the gametogenesis was active in the summer season (July-September) while in the autumn (October-November) it was characterized by a redevelopment of germ cells. In the same site, Roseberry et al. (1991) have observed, in both sexes, that the spawning stage of the gonad of *M. arenaria* occurred in May and June 1986, whereas, the germ cells were developing during October and November 1986. Comparatively, in the other location along the St. Lawrence Estuary (Baie du Moulin-à-Baude), two periods of intense gametogenesis occurred in July 1997 and September-October 1997 (Gauthier-Clerc et al., 1998). Previous studies have suggested that mollusc energy reserves could be mobilized during periods of reproductive activity, to fuel the development of the gonad and the production of gametes (Pipe, 1987a, 1987b). In the blue mussel *M. edulis*, the follicle cells in the female and Sertoli cells in the male are the somatic support for gametes development (Pipe, 1987a).

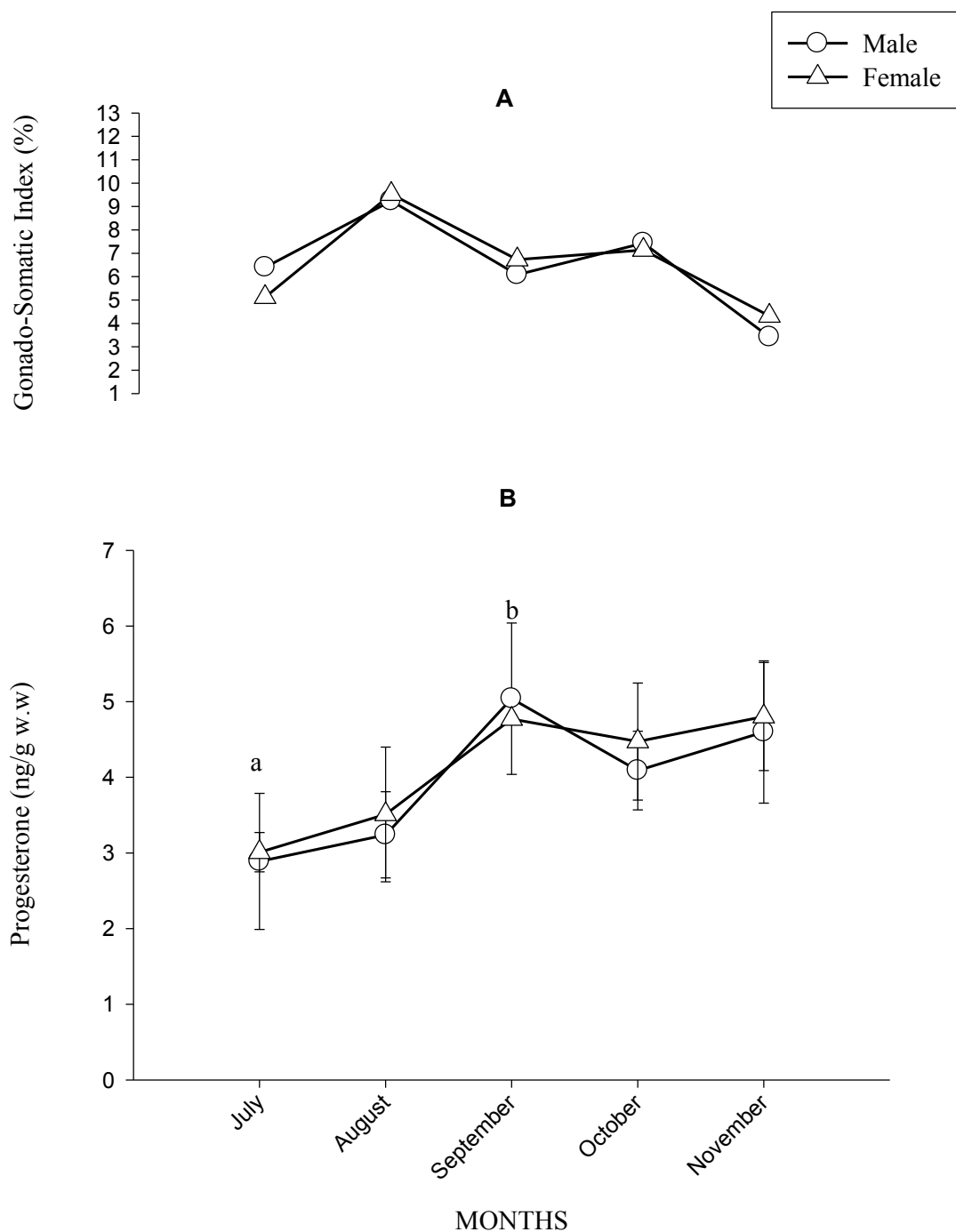


Figure 2.8: Variation in the gonadal index (A) and levels of progesterone (B) in the gonad of *Mya arenaria* males and females. Each value of progesterone indicates the mean $\pm$ SE. a is significantly different from b ($P=0.05$)

Their principal functions appear to be the regulation of material passing into the developing germ cells. During early gonad development, the follicle and the Sertoli cells are characterized by the presence of numerous lipid inclusions; however, during gametogenesis, the lipids are depleted (Pipe, 1987b). In this study, the results show a depletion of gonad lipids during the period of maturation in the male and the spawning period in the female. However, the tendency to increased gonad lipids seems to correspond to gonad development in October and November. Thus, in the gonads of *M. arenaria* collected in Anse à l'Original, the lipids are mobilized during the period of maturation and spawning (in September) and stored during the period of germ cells development (in October and November). Indeed, in *M. arenaria*, Clayton (1996) suggested that macromolecular lipoprotein complexes conveyed lipids toward tissues for storage. Stored lipids are mobilized to the gonad for the production of gametes.

In *M. edulis*, Peek and Gabbott (1990) demonstrated a general increase in lysosomal enzyme activity (cathepsin L for example) during the process of the maturation of the oocytes. Moreover, lysosomal destabilization has also been demonstrated in the digestive cells of *M. edulis* in response to progesterone and 17 β -estradiol (Moore et al., 1978). Peek et al. (1989) have proposed that these hormones may be produced by the follicle cells as a result of the stimulus from a neurohormone.

In this study, the presence of progesterone in the gonad of *M. arenaria* was demonstrated by LC-MS analysis. Electrospray ionisation (ESI) was selected for the

development of a qualitative LC-MS method because it has been shown that it is an excellent technique for the analysis of low-molecular-mass polar compounds, *i.e.* steroids, drugs and metabolites (Weidolf et al., 1988). The consecutive losses of 18 mass units are formally attributed to the elimination of water from the protonated molecule (Shindo et al., 1990).

The seasonal pattern of the progesterone is similar for both sexes and we presume that the progesterone could play the same role for males and females. Moreover, we have observed a peak in gonad progesterone levels that is concomitant with an active gametogenesis. Indeed, the results show higher levels of progesterone during the ripe stage in the male and the spawning stage in the female. Most likely, the increasing concentration of progesterone in the male could be used for the maturation of gonad before spawning. The levels of progesterone in other bivalves also vary during the annual gametogenesis cycle. Similar to *M. arenaria*, the presence of progesterone was demonstrated in both sexes for *Mytilus edulis* (Reis-Henriques et al., 1990). The level of progesterone (4ng/g of gonad) measured in *M. edulis* by Reis-Henriques and Coimbra (1990) is similar to our data (5ng/g of gonad) and the peaks of progesterone levels occurred during an active gametogenesis period (Reis-Henriques and Coimbra, 1990). As Reis-Henriques and Coimbra (1990) in *Mytilus edulis*, we support the hypothesis that progesterone is involved in the regulation of gametogenesis in *Mya arenaria* and possibly, in all marine bivalves. In these species, the progesterone may play a role in the development of gametes as a gonad messenger for neurohormones (Lubet, 1981; Lubet and Mathieu, 1982; Lubet et al., 1986; Mathieu and

Lubet, 1980). Recently, Pazos and Mathieu (1999) demonstrated in *Crassostrea gigas* and *M. edulis* that GnRH acts as a stimulator of DNA synthesis probably mediated by specific gonad GnRH receptors found in the gonad of *C. gigas*. Comparatively, in the sea star *Asterias vulgaris*, Hines and Watts (1992) have found a correlation between a peak of progesterone and oestradiol levels with the mitotic proliferation of germ cells. Probably, this neuroendocrine factor could have a stimulatory effect on the somatic cells of the gonad, which secrete steroids as progesterone. These steroids, in turn, might act on the proliferation and maturation of germ cells (Pazos and Mathieu, 1999). To confirm this hypothesis, more studies will be required to elucidate the germ cells responses to progesterone action.

To better understand the environmental problems associated with endocrine disruption, it has been shown that *M. arenaria* is a good bioindicator of pollution due to its capacity to bioaccumulate contaminants (Pellerin-Massicotte et al., 1993; Kure and Depledge, 1994; Blaise et al., 1999). Gauthier-Clerc et al. (1998) have observed a delay in the sexual maturation of *M. arenaria* in the Saguenay Fjord subjected to a pulse contamination. Indeed, it has been established that chemical pollutants present in the environment might act as environmental inhibitors of gonad activity. The impairment of reproductive process by xenobiotics has been related to hormonal imbalance. Before studying how xenobiotics might act to affect the sex steroid hormone patterns, it is necessary to understand the role of these hormones and their seasonal variation in the reproductive cycle.

Our study, for the first time, establishes the link between the progesterone pattern and the reproductive cycle and, moreover, the apparent key role of progesterone in the sexual maturation of gametes in *M. arenaria*. These results will serve for the near future as a reference for studies in marine ecotoxicology and invertebrate ecophysiology and possibly before using progesterone as a biomarker of environmental perturbations in *M. arenaria*.

2.7. References

- 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. *Environ. Toxicol.* 14 : 455-465.
- Brousseau, D.J., 1978. Spawning cycle, fecundity and recruitment in a population of soft-shell clam *Mya arenaria* from Cape Ann Massachusetts. *Fish. Bull.* 76 : 155-166.
- Clayton, M.E., 1996. Lipoproteins and heat shock proteins as measures of reproductive physiology in the soft-shell clam *Mya arenaria*. PhD thesis MIT/WHOI.
- Darvas, B., Székacs, A., Fonagy, A., Szécsi, M., Toth, I., 1997. Progesterone in *Periplancta americana* and *Neobelliera bullata* adults from the procuticle phase until first progeny production. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107 : 45-460.
- De Loncamp, D., Lubet, P., Drodowski, M., 1974. The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 22 : 116-127.
- Desrosiers, G., Brêthes, J.C.F., 1984. Étude bionomique de la communauté à *Macoma balthica* de la batture de Rimouski. *Sci. Tech. Eau* 17 : 25 - 30.
- Frings, C.S, Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin. Chem.* 18 : 673-674.

- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Blaise, C., 1998. Étude diagnostique de la condition physiologique et du potentiel reproducteur de *Mya arenaria* (mollusque bivalve endobenthique) exposée à la contamination du fjord du Saguenay. Canadian Technical reports- Halieutic and Aquatic Sciences, 2260 : 96-97.
- Hines, G.A., Watts, S.A., Sower, S.A., Walker, C.W., 1990. Sex steroid extraction from echinoderm tissues. J. Liquid Chromatogr. 13 : 2489-2498.
- Hines, G.A., Watts, S.A., 1992. Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. Gen. Comp. Endocrinol. 87 : 451-460.
- Jarzebski, A., 1985. Major sterols of bivalve molluscs from the inner Puck bay, southern Baltic. Comp. Biochem. Physiol. 81B : 989-991.
- Kure, L.K., Depledge, M.H., 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters. Env. Poll. 84 : 149-157.
- Lubet, P., 1981. Action des facteurs internes sur la reproduction des mollusques lamellibranches. Seminarios de Biologia Marina. Biol. Zool. 5 : 121-139.
- Lubet, P., Mathieu M., 1982. The action of internal factors on gametogenesis in Pelecypod Mollusks. Malacologia 22 : 131-136.
- Lubet, P., Albertini, L., Robbins, I., 1986. 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). C.R. Acad. Sci., Paris 303 : 575-580.
- Lubet, P., Mathieu, M., 1990. Les régulations endocriniennes chez les Mollusques bivalves. L'année biologique 29 : 235 - 252.
- Mathieu, M., Lubet, P., 1980. Analyse expérimentale en culture d'organes de l'action des ganglions nerveux sur la gonade adulte de la moule. Bull. Soc. Zool. Fr. 105 : 149-153.

- Mathieu, M., Robbins, I., Lubet, P., 1991. The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. Aquaculture 94 : 213-223.
- 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 steroids and cortisol. Cell Tiss. Res. 188 : 1-9.
- Pazos, A.J., Mathieu, M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad : stimulation of gametes DNA synthesis. Gen. Comp. Endocrinol. 113 : 112-120.
- Peek, K., Gabbott, P.A., Runham, N.W., 1989. Adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. II. Seasonal changes in the distribution of dispersed cells in a performed percoll density gradient. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 126 : 217-230.
- Peek, K., Gabott, P.A., 1990. Seasonal cycle of lysosomal enzyme activities in the mantle tissue and isolated cells from the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 104 : 403-412.
- Pellerin-Massicotte, J., Vincent, B., Pelletier, E., 1993. Évaluation écotoxicologique de la baie des Anglais à Baie-Comeau (Québec). Water Poll. Res. J. 4 : 665-686.
- Pipe, R.K., 1987a. Ultrastructure and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 96 : 519-528.
- Pipe, R.K., 1987b. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* : an ultrastructural study. Mar. Biol. 96 : 405-414.
- Potts, M., 1993. Effects of hematopoietic neoplasia on physiological processes in soft-shell clam, *Mya arenaria* (Linné). UMI Dissertation services, Ph.D. Thesis, University of New Hampshire, 150p.
- Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 1990. Variations in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. Comp. Biochem. Physiol. 95A : 343-348.

- Reis-Henriques, M.A., Le Guellec, D., Remy-Martin, J.P., Adessi, G.L., 1990. Studies of endogenous steroids from marine mollusc *Mytilus edulis* (L.) by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B : 303-309.
- Ropes, I.W., Stickney, A.P., 1965. Reproduction cycle of *Mya arenaria* L. in New England. *Biol. Bull. (Woods Hole)*. 128 : 315-327.
- Roseberry, L., 1988. Étude de la croissance et de la reproduction chez *Mya arenaria* (Bivalva : Mollusca) dans la zone intertidale de l'estuaire du Saint-Laurent. Mémoire de Maîtrise en Océanographie, Université du Québec à Rimouski, 117p.
- Roseberry, L., Vincent, B., Lemaire, C., 1991. Croissance et reproduction de *Mya arenaria* dans la zone intertidale de l'estuaire du Saint-Laurent. *Can. J. Zool.* 69 : 724-732.
- Semba, R., 1979. Contributions to semithin sectioning on a conventional rotary microtome. *Stain Tech.* 54 : 251-255.
- Shaw, W.N., Hammons, F., 1974. The present status of the soft-shell clam in Maryland. *U.S. Fish Wildl. Serv. Spec. Sci. Rep. Fish.* 508 : 5pp.
- Shindo, N., Yamauchi, N., Murayama, K., Fairbrother, A., Korlik, S., 1990. Identification of 17-hydroxyprogesterone and other steroid hormones in saliva from a normal child and patients with congenital adrenal hyperplasia by plasmaspay liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 4 : 171-174.
- Tremblay, R., 1992. Caractérisation de certains processus nutritionnels à différentes échelles temporelles chez deux bivalves vivant en zone intertidale dans l'estuaire maritime du Saint-Laurent. Master's Thesis, University of Quebec in Rimouski, Canada, 94pp.
- Weidolf, L.O., Lee, E.D., Henion, J.D., 1988. Determination of boldenone sulfoconjugate and related steroid sulfates in equine urine by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 15 : 283-289.

CHAPITRE 3

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).

A. SIAH¹, J. PELLERIN¹, J.-C. AMIARD², E. PELLETIER¹, L. VIGLINO¹

Comparative Biochemistry and Physiology part C (2003) 135 : 145-156

3.1. Résumé

Il est connu actuellement que des contaminants présents dans l'environnement aquatique peuvent altérer le niveau des hormones stéroïdiennes et affecter par voie de conséquence le système reproducteur des invertébrés exposés. Dans le but de vérifier si les métaux lourds et les organoétains affectent la maturation sexuelle chez *Mya arenaria*, des individus ont été collectés de juillet à novembre 1998 à différents sites le long de la rive sud de l'estuaire maritime du Saint-Laurent. À proximité du Port de Rimouski, les myes échantillonnées présentent de hauts niveaux en TBT, DBT dans leur gonade, un faible indice gonado-somatique ($GSI = \text{masse gonade (g)} / \text{masse de la chair humide sans coquille (g)} \times 100$), un faible niveau en progestérone et un délai de la maturation sexuelle en comparaison au site référence. Les organismes échantillonnés dans des sites présentant une contamination intermédiaire présentent des niveaux en progestérone sensiblement inférieurs aux organismes du site référence avec un faible délai de leur maturation sexuelle. Nous pouvons suggérer que le TBT et DBT peuvent être considérés comme des perturbateurs endocriniens chez les myes. Néanmoins, d'autres études sont nécessaires pour comprendre comment ces contaminants peuvent avoir affecté la production des hormones stéroïdiennes chez *Mya arenaria*.

Mots clés: Biomarqueur; Myes; Perturbateurs Endocriniens; Métaux Lourds; Progesterone; Gametogénèse; Saint Laurent; Tributylétain.

3.2. Abstract

There is a growing awareness that contaminants in the aquatic environment may alter steroid hormone levels and affect the reproductive success of the invertebrates. To verify if heavy metals and organotins affect sexual maturation in *Mya arenaria*, individuals were collected from July to November 1998, at different sites along the South coast of the St. Lawrence maritime Estuary. Near the Rimouski harbour, clams showed high levels of TBT, DBT in the gonad, along with a lower gonado-somatic index $\{GSI = \text{gonad wet weight (g)} / \text{body wet weight without shell (g)} \times 100\}$, low progesterone levels and a delay in sexual maturation when compared to the reference site. Sites that had intermediate levels of contaminants exhibited intermediate responses of hormones and sexual maturation stages. It is therefore suggested that TBT, DBT are endocrine disruptors in clams. Further studies will however be necessary to investigate in more details how contaminants as TBT can affect the steroid hormones production in the gonads of *Mya arenaria*.

Keywords: Biomarker; Clams; Endocrine disruptors; Heavy metals; Progesterone; Gametogenesis; St. Lawrence; Tributyltin.

3.3. Introduction

Pollution is known to be a problem in a number of local areas that discharge their effluents in rivers like the St. Lawrence. The pollutants that are present in effluents come from mines, pulp and paper mill wastes and domestic sewage (Pierce et al., 1998) and are also found in sediments, which are well known to be a sink for metals and organo-compounds in estuaries (Loring, 1978). In addition, the St. Lawrence River is the main entrance to the Canadian Great Lakes and is a major shipping route for cargo traffic (tankers, container ships and fishing boats) (Pelletier and Normandeau, 1997).

Despite the ban in 1989 of organotin based paints for boats less than 25 m, it has been shown that tributyltin (TBT) contamination is still persistent in marine waters of Canada (Chau et al., 1997). TBT significant levels have been recorded in sediments, mussels, sea stars, and beluga whales of the St. Lawrence River (Pelletier and Normandeau, 1997; Saint-Louis et al., 1997; Saint-Louis et al., 2000). Since mollusk bivalves are considered good bioindicators of environmental quality, we used an infaunal bivalve, *Mya arenaria* (Gagné et al., 2002; Blaise et al., 1999; Pellerin-Massicotte et al., 1993). This species lives buried in sediments, and therefore appears to be useful in providing indications on both sediment and water pollutant burden. Due to high uptake of chemicals and poor detoxification processes, *M. arenaria* has the potential to accumulate contaminants such as organotins from both water and sediment compartments, thus providing integrated levels of contaminants in coastal waters (Kure and Depledge, 1994). In the Saguenay Fjord, a major

tributary of the St. Lawrence River, *M. arenaria* exposed *in situ* to a mixture of contaminants, has shown a delay in sexual maturation (Gauthier-Clerc et al., 2002), due in part, to the presence of heavy metals (Gagné et al., 2002). In addition, the gonad development of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) in the Quebec City harbor was negatively affected by TBT (Regoli et al., 2001), inducing atresia of oocytes. Among the various hypotheses underlying the effects of endocrine disruptors on reproduction, inhibition of steroidogenesis is of particular importance. For example, in male and female sea stars, it has been found that the effects of cadmium on reproduction were related to decreased levels of progesterone and testosterone (Den Besten et al., 1989; 1991). Moreover, an important change in endogenous steroid content has been discovered in the clam *Ruditapes decussata* exposed to TBT (Morcillo and Porte, 2000). We have also showed recently in our laboratory, that progesterone is present in the gonads of *Mya arenaria* (Siah et al., 2002), and that hormone probably playing a key role in the sexual maturation. In view of the aforementioned, the aim of the present study was to investigate whether long-term exposure to heavy metals and TBT in field conditions, could affect sexual maturation and progesterone levels in the gonad of *M. arenaria* collected at different times of the year and at different sampling sites along the St. Lawrence River maritime estuary.

3.4. Materials and Methods

3.4.1. Sampling

Mya arenaria was collected at low tide with a hand rake at 15-20 cm depth in the St. Lawrence River during July 11-14, August 10-13, September 10-13, October 7-11, and November 4-7, 1998. At each sampling period, clams were sampled at four sites: (1) Anse à l'Original considered as a reference site since no direct sources of pollution are found at this site, (2) another one exposed to domestic and rural discharges of the Trois-Pistoles River, (3) near an harbor at Rimouski and (4), at Les Capucins near a dry dock area (Fig. 3.1). After rinsing clams with clean seawater, they were rapidly placed in coolers filled with crushed ice and transported to our field laboratory. Length and total weight of clams were recorded before dissection of tissues in the same day of collection.

3.4.2. Gonado-Somatic Index

After removal of the shells, the gonado-somatic index $\{GSI = \text{gonad wet weight (g)} / \text{body wet weight without shell (g)} \times 100\}$ was estimated for each clam.

3.4.3. Histological examination

One fraction (0.5 g wet weight) of each gonad was fixed for 24 hours in aqueous Bouin's fixative for histological determination. After fixation, this fraction of the gonad

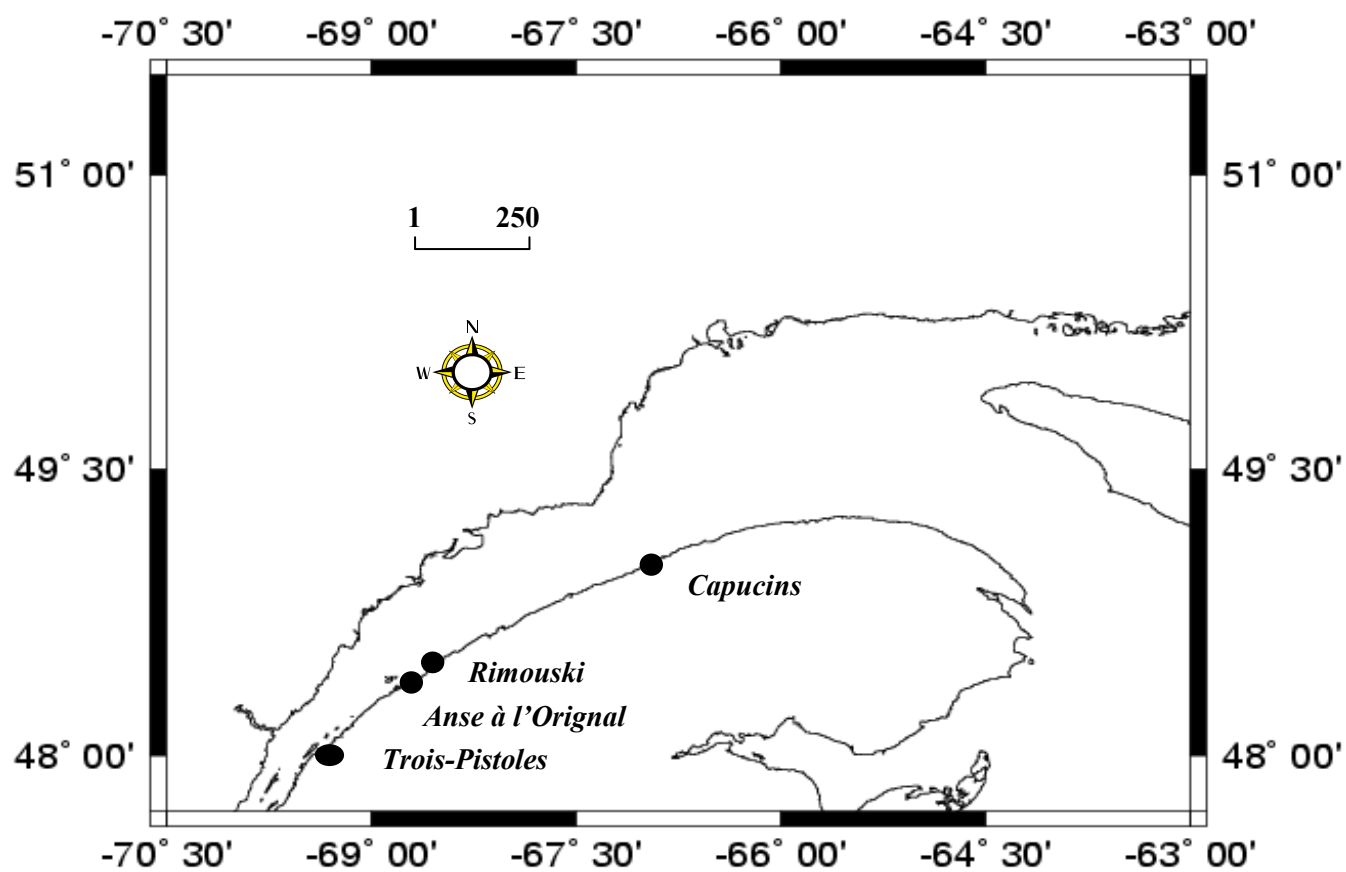


Figure 3.1: Map of the St. Lawrence area and location of the selected sites: Anse à l'Original (reference site), Trois-Pistoles, Rimouski and Les Capucins located on the south shore of the St. Lawrence River

was placed in 50% and then in 70% of ethyl alcohol (Alcools de Commerce Inc.) during 24 hours. Increasing concentrations (80%, 90%, 95%) of ethyl alcohol were then used to dehydrate the tissues. The tissues were embedded in methacrylate resin obtained from Polysciences, using the JB-4 embedding Kit (Marivac LTD) (Semba, 1979). Serial sections were cut at 3 μm and stained with Lee's methylene blue-basic fuchsine stain (Sigma-Aldrich LTD). The gonad organisation and the cytological characteristics of the germinal and somatic cells of both sexes were determined using a light microscope (Olympus BX50) (Siah et al., 2002).

Each stage was categorized by a maturity factor (MF=1 for indifferent, 2 for development, 3 for ripe, 4 for spawning and 5 for spent) and used to develop a maturity index ($\text{MI} = \sum(\text{Proportion of each stage} * \text{MF})$) more convenient to express variations between groups.

3.4.4. Steroid extraction

Steroid extraction in the gonads of *M. arenaria* were performed from the method developed by Hines et al. (1990) and adapted by Siah et al. (2002). Frozen tissues were thawed and samples of gonad (0.1g) were homogenised in 0.5 ml of nanopure water (The nanopure water was produced by the NANOpure UV Deionisation system, Series 733, ultrapure water system manufactured by Barnstead/Thermolyne Corporation) for 5 sec. To enhance the dissolution of steroids from binding proteins, 0.4 ml of pre-warmed 0.025 M

HCl (Anachemia) was added to homogenates and incubated for 15 min at 40°C. Methylene chloride (Fisher Scientific) (7 ml) was used to extract the steroids. After centrifugation, organic (steroid-containing) phase was removed, pooled and dried under nitrogen gas in a 40°C water bath. Steroids were then dissolved in 0.5 ml Enzyme ImmunoAssay (EIA) buffer for quantification with the Enzyme ImmunoSorbent Assay (ELISA).

3.4.5. Enzyme ImmunoSorbent Assay

Progesterone levels were quantified in gonadal extracts of male and female *M. arenaria* using ELISA Kits purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI). The method used is based on competitive immunoreactions with a progesterone-specific antibody with the free hormone and a steroid analogue linked to an acetyl cholinesterase reporter enzyme as a tracer. Cross-reactivity of various steroids with the antiserum was as follow: progesterone 100%, pregnenolone 61%, 17 β -oestradiol 7.2%, 5 β -pregnan-3 α -20-one 6.7%. The intra- and inter-assay variations were less than 10%. Standard curves were carried out with progesterone standards between 0 and 1000 pg/ml. Sample concentrations were extrapolated from these curves according to EIA Kits (Cayman Chemical Co). All samples and standards were prepared and analysed in duplicate.

3.4.6. Heavy metals analysis

Heavy metals analysis was performed according to Phaneuf et al. (1999). The gonads from clams sampled in August were digested using ultra pure nitric acid in Teflon bombs.

Cu, Zn, Cd and Pb were measured using argon plasma mass spectrometry (ICP-MS Perkin Elmer Sciex Elan 5000). Mercury levels were established using the cold vapour atomic absorption method with stannous chloride according to Phaneuf et al. (1999). Standard curves were generated in 50% nitric acid.

3.4.7. Lipid analysis

Total lipids were determined by a sulpho-phospho-vanilin reaction after homogenisation of gonads (0.1g) in phosphate buffer, pH=7 (Frings et al., 1972). Olive oil standards (Sigma-Aldrich LTD) between 0 and 10 mg/ml were used for standard curves. Absorbance was measured with a spectrophotometer Beckman DU 640 and lipid concentrations of samples were calculated from these curves.

3.4.8. Organotins analysis

Organotins analysis (TBT, DBT, MBT) was adapted from the method developed by Chau et al. (1997). Pools (2 to 3) of 0.4-0.5 g of freeze-dried gonad tissue from clams collected in July and August were digested in a 5 ml 25% tetramethylammonium hydroxide (TMAH, Sigma-Aldrich LTD) at 60°C for 60 min. After the addition of 25 ml of acetate buffer solution at pH 4 ± 0.1 , 2 ml of toluene (Omnisolv), 0.6 ml of 2% sodium tetraethyl borate (NaBEt_4 , Strem Chemicals Inc.) and tetrapentyltin (TPeT, Sigma-Aldrich LTD) as an internal standard, the mixture was mixed with a Vortex for 10 min. A further addition of 0.6 ml of 2% NaBEt_4 was done and mixing continued for an additional 10 min. The organic

phase was cleaned in a silica gel micro column of (6 x 1 cm outside diameter) and eluted with 4 ml of hexane-toluene v/v. Organotins were identified and quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The Perkin-Elmer gas chromatograph coupled to a Finnigan ion trap detector (GC-ITD) parameters were: sample volume 1 μl ; injection temperature 260°C; initial oven temperature, 110°C for 4 min followed by heating rate of 15°C min⁻¹ up to the final temperature 250°C, held for 10 min. The ion trap detector was operated in the mid scan mode over the range of 177-291 Daltons with the automatic gain control on, and using a scan rate of 1 scan s⁻¹. Standard curves for the quantification of organotins (TBT, DBT and MBT) were carried out with solutions of known concentrations of organotins mixture standards between 0 and 0.5 $\mu\text{g/ml}$. The detection limit for TBT, DBT and MBT was 6 ng/g w.w. The recovery of butyltin species from spiked gonad tissue homogenates was $69 \pm 7.5\%$ for TBT, $50 \pm 4\%$ for DBT and $62 \pm 6.2\%$ for MBT (n=6). Butyltin data have not been corrected for extraction recovery.

3.4.9. Statistical analysis

The results in this study are presented as the mean of the samples collected each month. Sigma Stat for Windows (Jandel Corp.) was used for statistical analysis. A Student t-test for a normal distribution was used to compare two groups. When the distribution was not normal, a Mann-Whitney rank sum has been used. To assess multiple comparisons, a parametric one-way analysis of variance (ANOVA) was performed on data with a Dunnett test to compare the contaminated sites (Les Capucins, Trois-Pistoles and Rimouski) to

control site (Anse à l'Original). When the distribution was not normal, a Kruskal-Wallis one way analysis of variance on ranks has been used.

3.5. Results

3.5.1. Histological data

The male to female sex ratio was equal to (1:1) in Anse à l'Original (n=77) and Les Capucins (n=82), (1.1:1) in Trois-Pistoles (n=67) and (0.9:1) in Rimouski (n=73). The percentage of males and females at each stage of development and the maturity index were calculated for all the sites and results are presented in Fig. 3.2.

In males (left column), in Anse à l'Original, the animals achieved the ripe stage in August (50%) and in September (83%). In Les Capucins, the germ cells achieved the ripe stage later in autumn: in October (58% of the individuals) and November (60%). In Trois-Pistoles and Rimouski, sexual maturity was delayed since no ripe stage was observed in males.

In females (right column), In Anse à l'Original, 44% of female clams spawned in August while 70% were in the spent stage in September. In November 50 % of the females reached the ripe stage. In Les Capucins, ripe ovocytes were observed in October (45%) and in November (70%). In Trois-Pistoles, 15% in October and 13% in November reached the ripe stage. However, no females in ripe stage were observed in Rimouski.

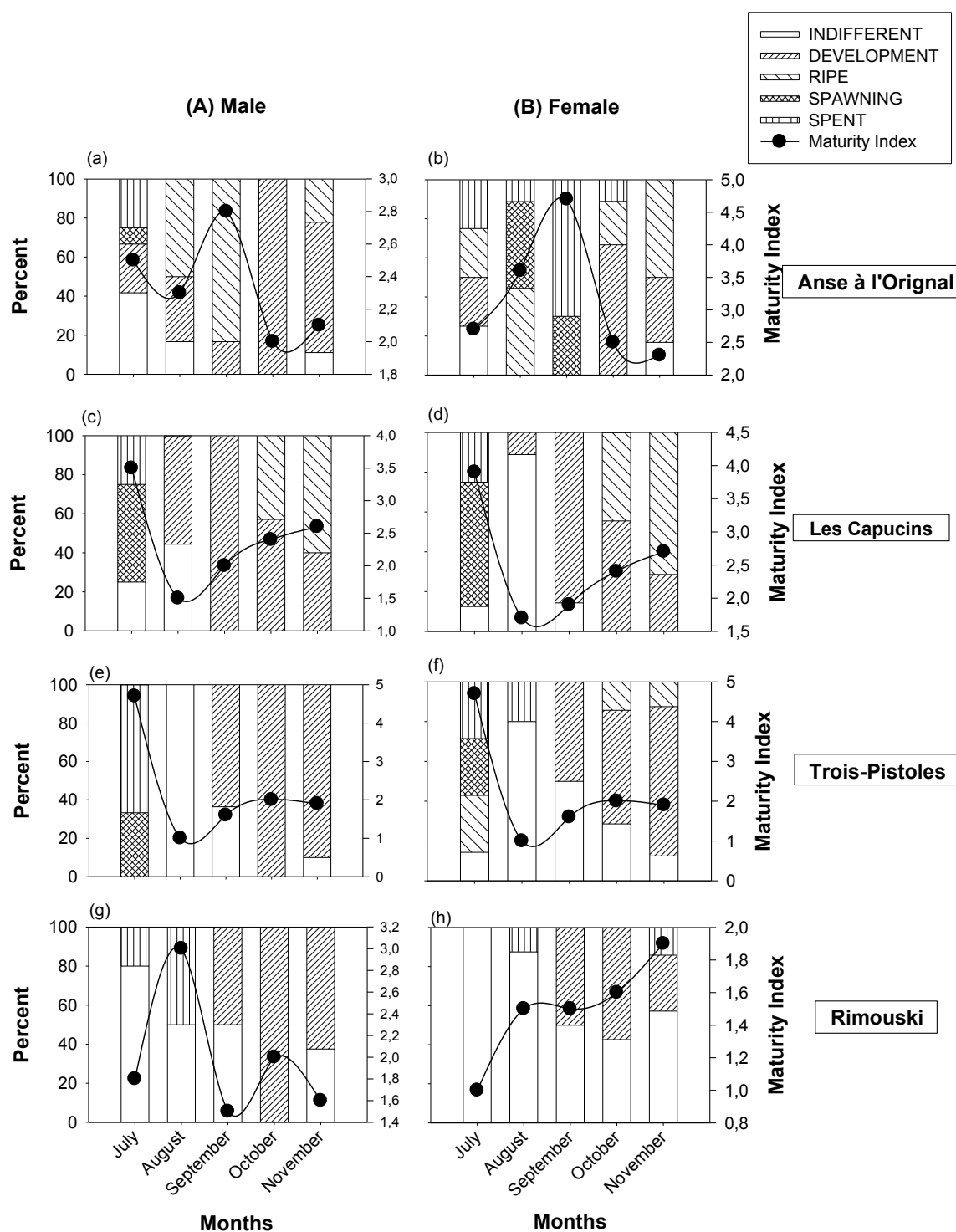


Figure 3.2: Percentage of males (n=3 to 12) and females (n=4 to 13) in each stage of the reproductive cycle and maturity index of males and females in the sampling sites, Anse à l'Original, Les Capucins, Trois-Pistoles and Rimouski

The pattern of maturity index in the females was similar in the males. In Les Capucins, the profile was comparable with Trois-Pistoles with a maximum in July (3.9 and 3.6 respectively). In Anse à l'Original, this index was important and peaked in September (4.7) whereas it was very low in Rimouski and vary between 1.0 in July and 1.9 in November.

The percentage values for each stage of the reproductive cycle of all individuals in the different sites and for all the sampling periods are shown in Fig. 3.3. In Anse à l'Original and Les Capucins, approximately 25% of the male and female gonads were in ripe stage while no gonads were observed in ripe and spawning stages in Rimouski. More than 30% in Trois-Pistoles and 50% in Rimouski of the gonads were in the indifferent stage in September, thus showing a clear delay in sexual maturation in these two sites. Furthermore, the proportion of both sexes Rimouski and male Trois-Pistoles ripe clams over the 5 months was significantly lower than Anse à l'Original ($P < 0.001$) by using the Fisher exact test.

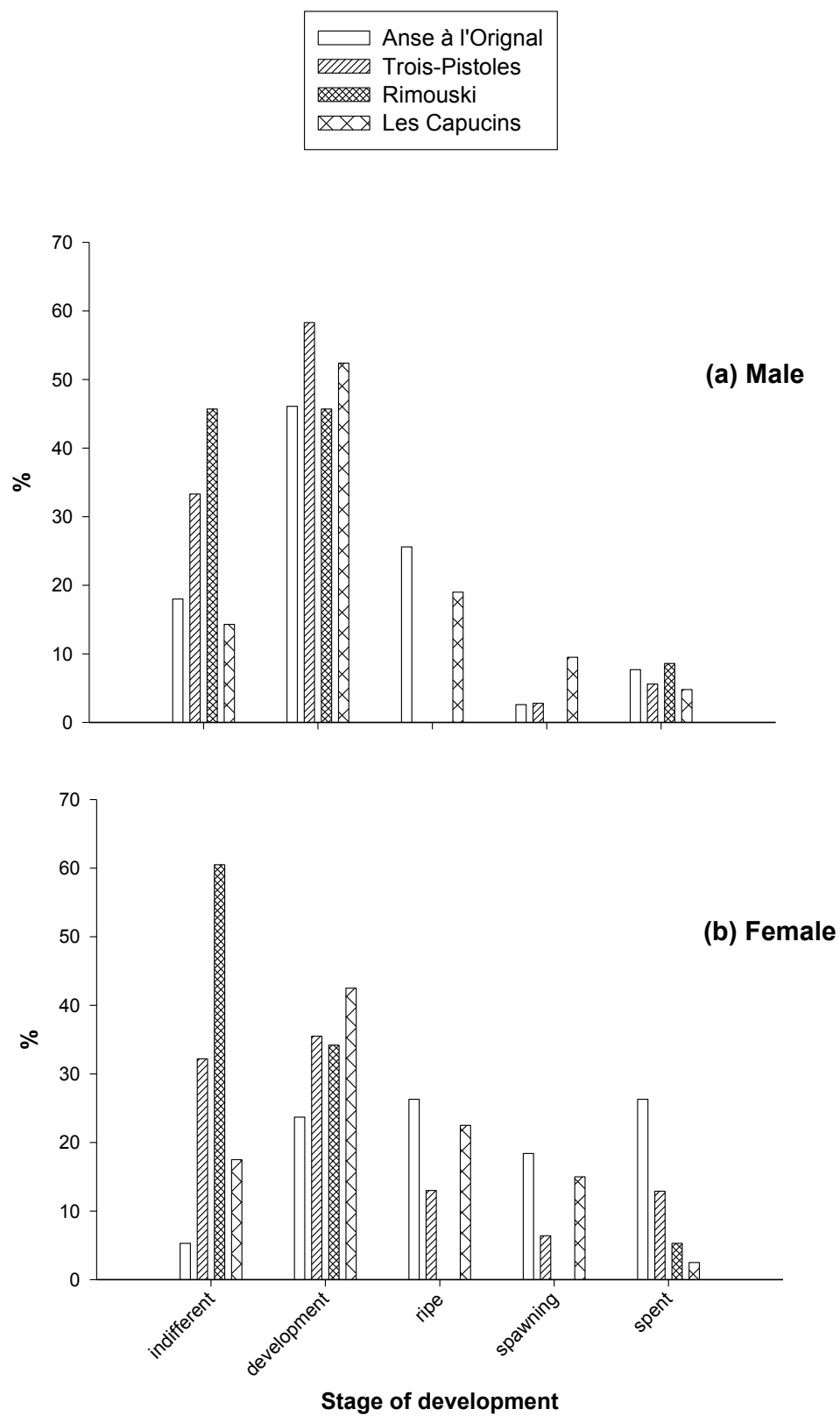


Figure 3.3: Percentage of males (a) and females (b) in each stage of the reproductive cycle in the different sites and for all the sampling periods

3.5.2. Gonado-somatic index

Variations in the gonado-somatic index of male and female clams are presented in Fig. 3.4. In Anse à l'Original, the gonado-somatic index of males and females reached a maximum in August (9%). It declined in September (6%) in comparison with August and reached a minimal value in November (5%). In Les Capucins, the GSI reached a maximum value in October (7%) and declined in November (3%). In Trois-Pistoles and Rimouski, the GSI was more constant than the two other sites. Nevertheless, the GSI of clams from Rimouski ranged from 2 to 4% and was lower than the one from Anse à l'Original.

3.5.3. Progesterone levels in the gonads

Variations of the progesterone levels in the gonads of *M. arenaria* of both sexes during the reproductive cycle are reported in Fig. 3.5. Progesterone levels reached a maximum level in September (5 ng/g) in Anse à l'Original and in October in Les Capucins. In Trois-Pistoles, the concentration of progesterone in the gonads increased from July to September, dropped in October (1 ng/g gonad) and increased in November to a value of 3 ng/g in males (Fig. 4a) and 4.5 ng/g in females (Fig. 3.5b). Nevertheless, the progesterone level in the gonad of *M. arenaria* from Rimouski was equal to 1/8 to the progesterone level measured in the gonad of *M. arenaria* from Anse à l'Original. In the females, the maximum value (0.6 ng/g, Fig. 3.5b) was reached in November while in the males, values of 0.6 ng/g were observed in October (Fig. 3.5a).

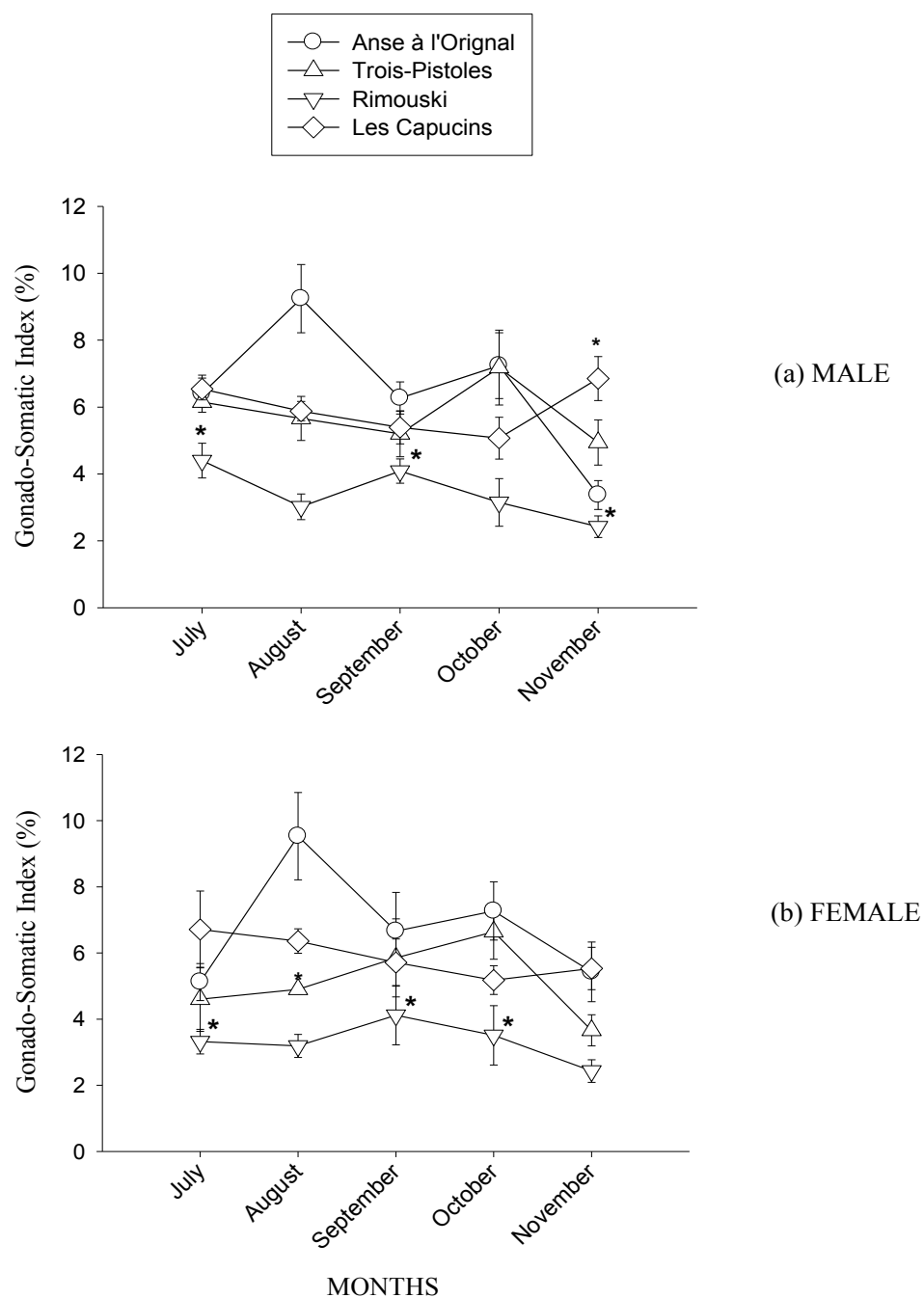


Figure 3.4: Variations in the gonado-somatic index of *Mya arenaria* male (a) (n=2 to 14) and female (b) (n=3 to 15). Each value of the gonado-somatic index is expressed as the mean $\pm$ S.E. An asterisk (*) indicates that values are statistically different from the reference site, Anse à l'Original for each month of sampling, at a level of $P < 0.05$ (ANOVA)

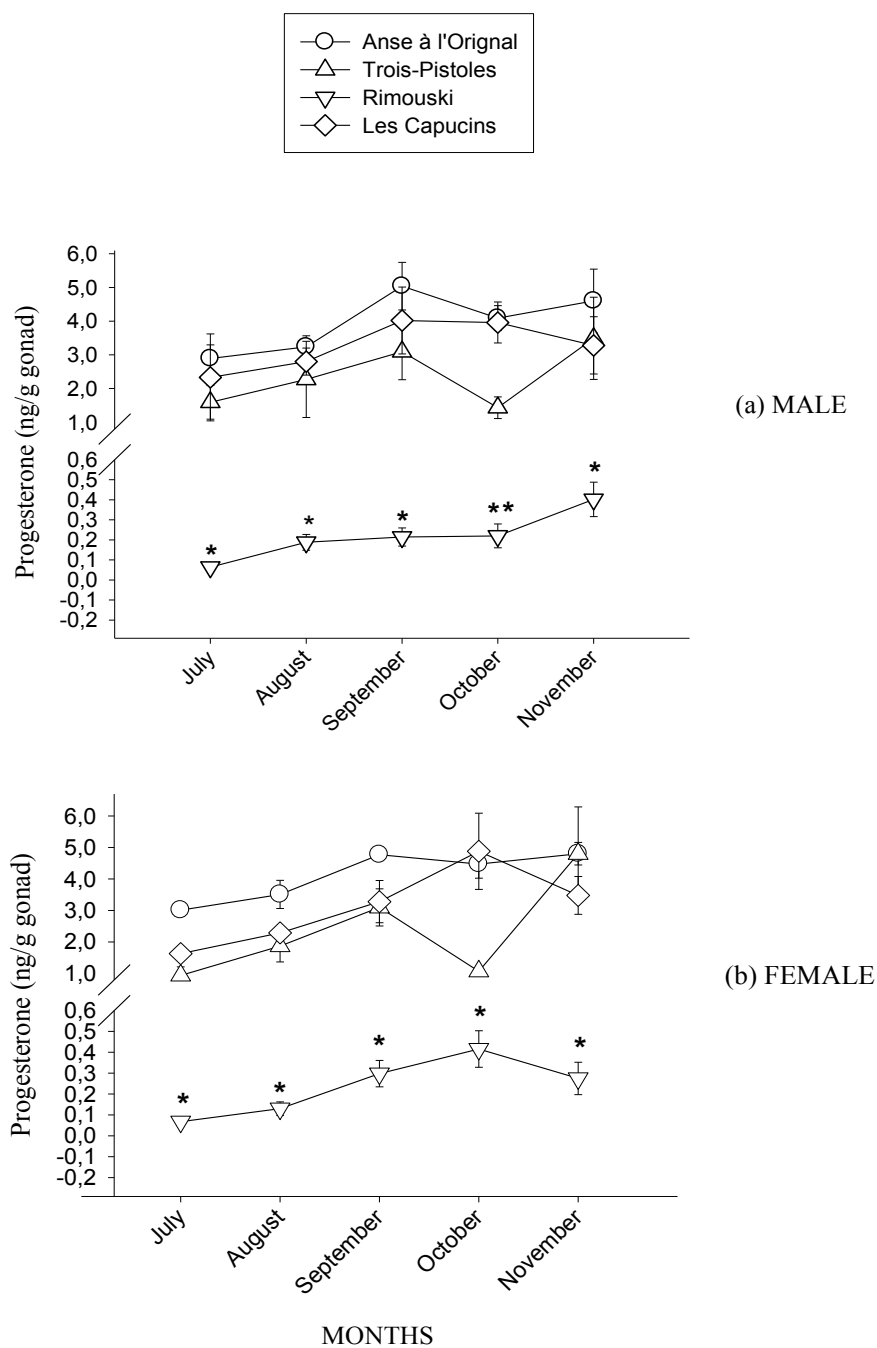


Figure 3.5: Variation of progesterone levels in the gonads of *Mya arenaria* male (a) (n=2 to 5) and female (b) (n=2 to 5). Each value is expressed as the mean $\pm$ S.E. An asterisk (*) indicates that values are statistically different from the reference site, Anse à l'Original and (**) from Les Capucins for each month of sampling, at a level of $P < 0.05$ (ANOVA)

3.5.4. Heavy metals concentration in the gonads

Concentration of copper, zinc, cadmium, lead and mercury in the gonads of *M. arenaria* collected in August at the different sites in Anse à l'Original, Trois-Pistoles, Les Capucins and Rimouski are shown in Fig. 3.6 as micrograms per gram wet weight (w.w.) of gonad tissue.

- Copper (Cu)

Copper in the gonads ranged from 11 to 46 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Anse à l'Original (n=10), from 13 to 35 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Trois-Pistoles (n=10), from 5 to 35 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Rimouski (n=11) and from 7 to 28 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Les Capucins (n=10). The mean concentrations of Cu in Rimouski were significantly lower than in Anse à l'Original ($P < 0.01$).

- Zinc (Zn)

The individual concentrations of Zn in the gonad of clams ranged from 60 to 78 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Anse à l'Original (n=10), from 73 to 148 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Trois-Pistoles (n=10), from 38 to 64 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Rimouski (n=11) and from 45 to 62 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Les Capucins (n=10). The mean concentrations were significantly lower in Rimouski and Les Capucins but in Trois-Pistoles the value was higher than in Anse à l'Original ($P < 0.05$).

- Cadmium (Cd)

The individual concentrations of Cd in the gonad of clams ranged from 0.11 to 0.28 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Anse à l'Original (n=10), from 0.13 to 0.38 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Trois-Pistoles (n=10), from 0.17 to 0.52 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Rimouski (n=11) and from 0.11 to 0.28 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Les Capucins (n=10). The mean concentrations of Cd in the gonads in Trois-Pistoles were significantly higher than in Anse à l'Original ($P<0.05$).

- Lead (Pb)

The individual concentrations of Pb in the gonad of clams ranged from 0.11 to 0.33 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Anse à l'Original (n=10), from 0.13 to 0.76 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Trois-Pistoles (n=10), from 0.12 to 0.64 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Rimouski (n=11) and from 0.06 to 0.11 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Les Capucins (n=10). The mean concentrations of Pb in the gonad in Trois-Pistoles were significantly higher than in Anse à l'Original ($P<0.05$). The values at Les Capucins were significantly lower than the reference site ($P<0.001$).

- Mercury (Hg)

The individual concentrations of Hg in the gonad of clams ranged from 0.01 to 0.11 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Anse à l'Original (n=10), from 0.01 to 0.19 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Trois-Pistoles (n=10), from 0.01 to 0.23 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Rimouski (n=11) and from 0.01 to 0.11 $\mu\text{g/g}$ w.w. in Les

Capucins (n=10). The means of the concentrations of Hg in the gonads at different sites were not significantly different with the mean value of Anse à l'Original.

3.5.5. Organotin concentrations in the gonads

Concentrations of TBT, DBT, MBT and total butyltin are reported in Fig. 3.6 as nanograms of Sn per gram-wet weight of lipids in the gonads. Mean concentrations of TBT ranged from 534 ± 142 ng Sn/g lipid w.w. in Trois-Pistoles to 1041 ± 245 ng Sn/ g lipid wet weight in Rimouski. Lesser amounts of DBT (152 ± 17 ng Sn/g gonad w.w.) were detected in the gonad tissues of Rimouski clams that made up 25% of the total butyltin in Rimouski while TBT exhibited 85 % of the total butyltin. MBT was not detected in the gonad tissues.

3.5.6. Histopathology

In Figure 3.7, it can be seen that the histology of gonads of *M. arenaria* from Rimouski is revealing the alteration of their reproductive capacity. The alveoli of clams (n=3) sectioned in November were devoid of germ cells (Fig. 3.7C,D) in comparison to the alveoli of the gonads of the females from Anse à l'Original which were filled with ripe ovocytes (n=6) (Fig. 3.7A) and spermatozooids for the males (n=9) sectioned in November (Fig. 3.7B).

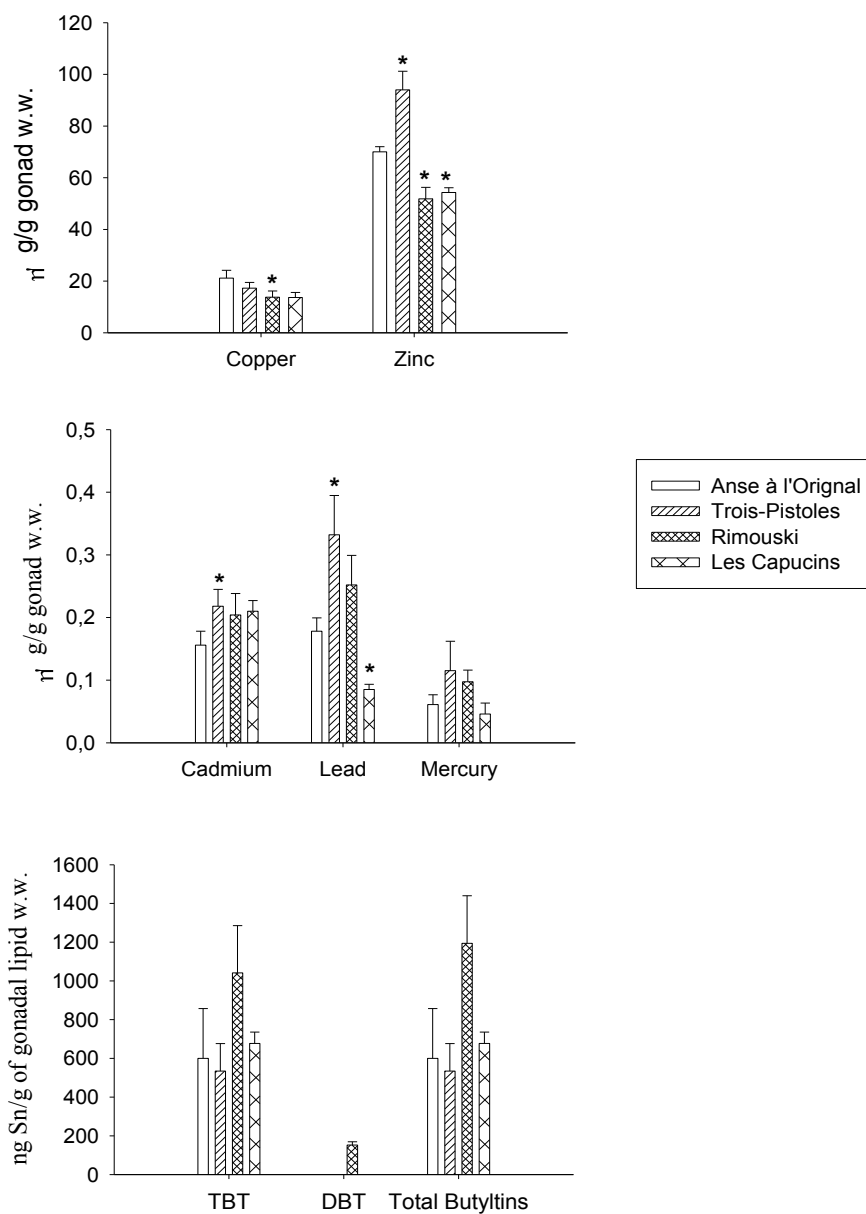


Figure 3.6: Concentrations of copper, zinc, cadmium, lead, mercury, TBT, DBT and total butyltin in the gonads of *Mya arenaria* for Anse à l'Original, Les Capucins, Trois-Pistoles and Rimouski sites sampled in August. Each value is expressed as the mean $\pm$ S.E. An asterisk (*) indicates that values are statistically different from the reference site, Anse à l'Original for each month of sampling, at a level of $P < 0.05$ (Student t-test).

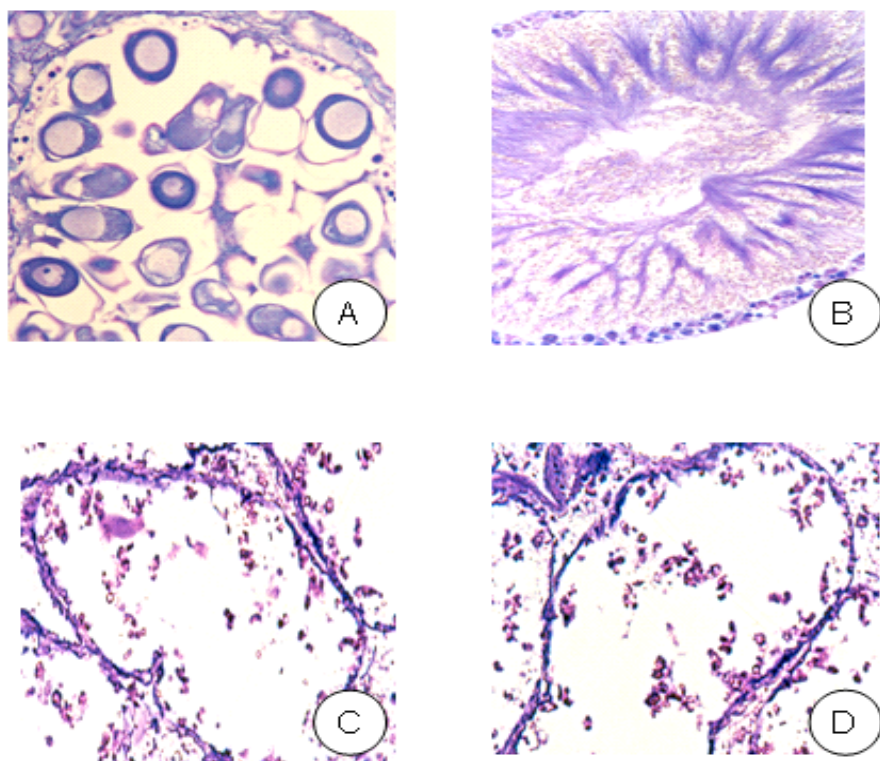


Figure 3.7: Photomicrographs of sections of the gonad tissues of ripe female (A) filled with mature, spherical oocytes (→) and male (B) filled with mature spermatozooids (→) *Mya arenaria* from Anse à l'Original and of the gonad tissues of *Mya arenaria* (C,D) from Rimouski

3.6. Discussion

Organotins and heavy metals have been measured in the gonads of *Mya arenaria* sampled in four sites characterized by different inputs of contamination, Anse à l'Original, Les Capucins, Trois-Pistoles and Rimouski. Organotin contamination in gonads of *M. arenaria* in this study was comparable to levels reported in mussels sampled in the St. Lawrence River with values ranging from 50 to 120 ng/g dry weight as Sn (Chau et al., 1997; Pelletier and Normandeau, 1997). Clams sampled at the Rimouski site near a harbour presented higher concentrations of total organotins in their gonad tissues in comparison with the other sites. Furthermore, Rimouski clams are containing higher levels of both TBT and DBT. Considering that *M. arenaria* has a low potential to degrade TBT (Kure and Depledge, 1994), the presence of DBT in the gonad of clams from Rimouski should indicate both recent and old contamination input in this harbor environment in comparison with the other sites. It is worth mentioning that TBT tends to accumulate in the lipids of many aquatic organisms because of its dual hydrophobic ($\text{Log } K_{ow}=4.1$) and ionic characteristics (Perreira et al., 1999). This could be an explanation of the high levels of TBT in the gonad of clams from Anse à l'Original and Trois-Pistoles because during sexual maturation, the organisms contain high lipid levels.

Values of heavy metals in the gonads ranged from 5-46 $\mu\text{g/g}$ w.w. for Cu, 38-148 $\mu\text{g/g}$ w.w. for Zn, 0.11-0.52 $\mu\text{g/g}$ w.w. for Cd, 0.06-0.76 $\mu\text{g/g}$ w.w. for Pb and 0.01-0.23 $\mu\text{g/g}$ w.w. for Hg. The comparison with concentrations of heavy metals in five aquatic

macroinvertebrates of the St. Lawrence River, near Cornwall, Ontario, (Filion and Morin, 2000) suggests that metal contamination was similar with our study except for lead, where the concentrations in the gonad of *M. arenaria* were lower. Concentrations of Zn, Cd and Pb were significantly higher in Trois-Pistoles in comparison with Anse à l'Original.

In another recent study, the gonad development of zebra mussel was negatively associated to TBT where levels ranged from 37 to 1078 ng Sn/g wet weight in the tissues of mussels of the Québec City Harbor in the St. Lawrence River (Regoli et al., 2001). This dysfunction of gonadal development of zebra mussels could be attributed to some potential impact of organotins. In another study, it was observed that *M. arenaria* exhibited a lower condition factor (Gagné et al., 2002) and a delay in gonad maturation (Gauthier-Clerc et al., 2002) in the upstream part of the Saguenay fjord, a site known for its contamination by heavy metals (Hg, Pb, Zn, Cu) (Barbeau et al., 1981). Furthermore, in both males and females *Mytilus edulis* exposed to 100 ppb cadmium in seawater, the growth of the follicles was inhibited (Kluytmans et al., 1988). In our study, no individuals achieved the ripe and spawning stages during the period of sampling in Rimouski, whereas the gametogenesis was active in the summer in Anse à l'Original. In Les Capucins and Trois-Pistoles, the gametogenesis began in September and the ripening stage was observed in October and November. Furthermore, our histological observations have shown that the gonads of organisms from the Rimouski site were devoid of mature germ cells. The same histopathological observations were reported by Regoli et al. (2001) in the freshwater zebra mussels (*D. polymorpha*) collected in the Quebec City Harbor area of the St. Lawrence

River. It was shown that TBT affects all mechanisms which intervene in the cell cycling as intracellular sequestration of Ca^{++} , macromolecule synthesis and protein phosphorylation (Girard et al., 1997). Furthermore, for *M. arenaria*, it was shown that DBT can reduce phagocytosis more than TBT, at a toxicant concentration of 10^{-6} M (Bouchard et al., 1999). Therefore, the presence of DBT in the gonad of clams collected in Rimouski could contribute to cell toxicity. Moreover, as for the histological data, the GSI of both sexes were significantly lower in Rimouski for both males and females.

In our previous data, we have shown that progesterone intervenes in the regulation of the reproductive cycle of *M. arenaria* in Anse à l'Original (Siah et al., 2002). We have shown that progesterone could play a key role in the sexual maturation in *M. arenaria*. Concentrations of Cd in the sea star gonads ranging from 0.75 to 1.43 $\mu\text{g/g}$ dry weight have been shown to cause significant reductions in the levels of progesterone in males and females (Den Besten et al., 1991). TBT has also been reported to inhibit cytochrome P450 system in fish (Fent and Stegeman, 1993; Padros et al., 2000). Clam NADH cytochrome reductase was reported to be particularly sensitive at a concentration as low as 50 μM TBT (Morcillo and Porte, 1997). NADH cytochrome reductase is an electron donor of cytochrome P450 system and inhibition of this enzyme would affect the function of the system (Bjorkem, 1982). The cytochrome P450 is known to play a key role in the metabolism of xenobiotic compounds and endogenous steroids in invertebrates (Kirchin et al., 1992). Inhibition of the cytochrome P450 system could have consequences for the metabolism of hormone steroids as progesterone, testosterone and 17β -oestradiol (Spooner

et al., 1991) but also for the protection of the organism against endocrine disruptors as heavy metals (Kluytmans et al., 1988; Den Besten et al., 1991). Our results have showed in this study, that progesterone levels in clams from Les Capucins and Trois-Pistoles were not significantly different from the ones in Anse à l'Original except in Trois-Pistoles when the level dropped dramatically in October. However, the level of progesterone in the gonad of *M. arenaria* in Rimouski was 1/8 of levels found in Anse à l'Original. Inhibition of synthesis of progesterone in the gonad may cause the delay in the germ cell development and then in the sexual maturation as it was observed in Rimouski clams.

In conclusion, clams sampled in Rimouski near a harbour presented a delay of their sexual maturation and showed decreased levels of the progesterone in the gonads. Since temperature and primary production are similar for both sites (Saucier et al., 1997), the strong negative correlation between the organotins (TBT, DBT) and progesterone levels in the gonad of *M. arenaria* reinforces the idea of the capacity of contaminants to disturb hormonal production in clams. However, non-specific interference is also present in immunometric assays. The antibody used could have a cross reactivity with pregnenolone (61%) a precursor of progesterone. In the environment, the presence of a large variety of contaminants seems to affect the hormone production but the mechanism remains to be elucidated although several possibilities are plausible. Our data support the findings of other authors that many contaminants were shown to inhibit steroidogenic enzyme activities (Morcillo and Porte, 1997; Monteiro et al., 2000), to prevent the mobilisation of the cholesterol to cytochrome P450 (Tremblay and Van Der Kraak, 1999) or to increase

metabolism of steroid hormones (Den Besten et al., 1991; Gagnon et al., 1994). However, such correlations are not entirely a proof for a cause-effect relationship and further work is in progress to establish the effect of contaminants on steroid hormone levels in bivalves. In our future work, we intend to clarify all these points using histochemistry to quantify the levels of conversion of pregnenolone to 17-OH- pregnenolone *via* the Cyt P450 17c and the conversion to progesterone by measuring the activity of the 3β -DH $\delta^{4,5}$ – isomerase.

3.7. Acknowledgments

The authors wish to thank the Individual Discovery Grants Program from NSERC and the Fondation de l'UQAR for their financial support to Jocelyne Pellerin.

3.8. References

- Barbeau, C., Bougie, R., Côté, J.E., 1981. Temporal and spatial variations of mercury, lead, zinc and copper in sediments of the Saguenay fjord. *Can. J. Earth Sci.* 18 : 1065-1074.
- Bjorkem, I., 1982. Rate limiting step in microsomal cytochrome P-450 catalyzed hydroxylations. In: Schenkman, J.B., Kupfer, D. (Eds), *Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System*. Academic Press, NY, pp. 645-666.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., 1999. Determination of vitellogenin-like properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord, Canada): A potentiel biomarker for endocrine disruption. *Environ. Toxicol.* 14 : 455-465.
- Bouchard, N., Pelletier, É., Fournier, M., 1999. Effects of butyltin compounds on phagocytic activity of hemocytes from three marine bivalves. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 : 519-522.

- Chau, Y.K., Yang, F., Brown M., 1997. Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue. *Anal. Chim. Acta* 338 : 51-55.
- Den Besten, P.J., Herwig, H. J., Zandee, D. I., Voogt, P. A., 1989. Effects of cadmium and PCBs on reproduction of the sea star *Asterias rubens*: Aberrations in the early development. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18 : 173-180.
- Den Besten, P.J., Elenbaas, J. M. L., Maas, J. R., Dieleman, S. J., Herwig, H. J., Voogt, P. A., 1991. Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens* L. *Aquat. Toxicol.* 20 : 95-110.
- Fent, K., Stegeman, J.J., 1993. Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P450 forms in marine fish. *Aquat. Toxicol.* 24 : 219-240.
- Filion, A., Morin, A., 2000. Effect of local sources on metal concentrations in littoral sediments and aquatic macroinvertebrates of the St. Lawrence River, near Cornwall, Ontario. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57 : 113-125.
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved determination of total lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin. chem.* 18 : 673-674.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., 2002. Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Mar. Environ. Res.* 53 : 295-310.
- 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? *Comp. Biochem. Physiol.* 131 : 457-467.
- Girard, J.P., Ferrua, C., Pesando, D., 1997. Effects of tributyltin on Ca^{2+} homeostasis and mechanisms controlling cell cycling in sea urchin eggs. *Aquat. Toxicol.* 38 : 225-239.
- Hines, G.A., Watts, S.A., Sower, S.A., Walker, C.W., 1990. Sex steroid extraction from echinoderm tissues. *J. Liquid Chromatogr.* 13 : 2489-2498.
- Kirchin, M.A., Wiseman, A., Livingston, D.R., 1992. Seasonal and sex variation in the mixed-function oxygenase system of digestive gland microsomes of the common mussel *Mytilus edulis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C : 81-91.
- Kluytmans, J.H., Brands, F., Zandee D.I., 1988. Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.* 24 : 189-192.

- Kure, L.K., Depledge, M.H., 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters. *Environ. Pollut.* 84 : 149-157.
- Loring, D.H., 1978. Geochemistry of zinc, copper and lead in the sediments of the estuary and Gulf of St. Lawrence. *Can. J. Earth Sci.* 15 : 757-772.
- Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 48 : 549-559.
- Morcillo, Y., Porte, C., 1997. Interaction of tributyl and triphenyltin with the microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the Western Mediterranean. *Aquat. Toxicol.* 38 : 35-46.
- Morcillo, Y., Porte, C., 2000. Evidence of endocrine disruption in clams -*Ruditapes decussata*- transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environ. Pollut.* 107 : 47-52.
- Padros, J., Pelletier, É., Reader, S., Denizeau, F., 2000. Mutual in vivo interactions between benzo(a)pyrene and Tributyltin in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19 : 1019-1027.
- Phaneuf, D., Côté, I., Dumas, P., Ferron, L.A., LeBlanc, A., 1999. Evaluation of the contamination of marine algae (seaweed) from the St. Lawrence River and likely to be consumed by humans. *Environ. Res.* 80(A) : S175-S182.
- Pellerin-Massicotte, J., Vincent, B., Pelletier, É., 1993. Evaluation écotoxicologique de la Baie des Anglais à Baie-Comeau (Québec). *Water Pollut. Res. J. Canada.* 28 : 665-686.
- Pelletier, É., Normandeau, C., 1997. Distribution of butyltin residues in mussels and sea stars of the St. Lawrence Estuary. *Environ. Technol.* 18 : 1203-1208.
- Perreira, W.E., Wade, T.L., Hostettler F.D., Parchaso F., 1999. Accumulation of butyltins in sediments and lipid tissues of the asian clam, *Potamocorbula amurensis*, near Mare Island Naval Shipyard, San Francisco Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 38 : 1005- 1010.
- Pierce, R.C., Whittle, D.M., Bramwell, J.B., 1998. Les contaminants chimiques dans les écosystèmes aquatiques du Canada. *Pêches et Océans*, 361 p.
- Regoli, L., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., Mikaelian, I., 2001. Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec city harbour area of the St. Lawrence River. *Aquat. Toxicol.* 53 : 115-126.

- Saint-Louis, R., Gobeil, C., Pelletier, É., 1997. Le tributylétain et ses produits de dégradation dans l'estuaire du Saint-Laurent (Canada). *Environ. Technol.* 18 : 1209-1218.
- Saint-Louis, R., De Mora, S., Pelletier, É., Doidge, B., Leclair, D., Mikaelian, I., Martineau, D., 2000. Hepatic butyltin concentrations in Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary and Northern Quebec, Canada. *App. Organomet. Chem.* 14 : 218-226.
- Saucier, F.-J., Chassé, J., Couture, M., Dorais, R., D'Astous, A., Gosselin, A., 1997. Atlas des courants de marée, estuaire du Saint-Laurent de cap de Bon-Désir à Trois-Rivières, Service Hydrogr. du Canada, Pêches et Océans Canada, Ottawa, 108 p.
- Semba, R., 1979. Contributions to semithin sectioning on a conventional rotary microtome. *Stain Technol.* 54 : 251-255.
- Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Goad, L.J., 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar. Environ. Res.* 32 : 37-49.
- Siah, A., Pellerin, J., Benosman, A., Gagné, J.P., Amiard, J.C., 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132(A): 499-511.
- Tremblay, L., Van Der Kraak, G., 1999. Comparison between the effects of the phytosterol β -sisterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 : 329-336.

CHAPITRE 4

TBT EFFECTS ON STEROID HORMONES IN *Mya arenaria*

A. SIAH, J. PELLERIN, J.-C. AMIARD, É. PELLETIER

Résultats Originaux

NON encore publié le 30 janvier 2004-01-30

**Article retiré de la version électronique
Pour le lire, demander l'exemplaire papier**

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux de notre équipe de recherche sur le potentiel reproducteur des myes du Fjord du Saguenay ont montré que les myes de la Baie Éternité présentent un retard dans la maturation sexuelle comparativement à l'Anse Saint-Étienne où les conditions environnementales sont similaires (Gauthier-Clerc et al., 2002). Ce retard de la maturation sexuelle révélé chez les organismes de la Baie Éternité semble être relié à un retard de la vitellogenèse. Ce délai de la vitellogenèse a été déterminé à partir de la mesure de la concentration en Alkali-Labile Phosphorus (ALP) dans l'hémolymphe chez *Mya arenaria*. Ce dosage permet de déterminer indirectement la teneur des protéines apparentées à la vitellogénine (Blaise et al., 1999). Au niveau de la Baie Éternité, la concentration en protéines apparentées à la vitellogénine dans l'hémolymphe était significativement plus faible par rapport aux organismes échantillonnés au cours du même mois à l'Anse Saint-Étienne (Blaise et al., 1999). Chez *Mya arenaria*, la synthèse des protéines apparentées à la vitellogénine est induite par le 17 β -oestradiol (Blaise et al., 1999). Une perturbation du système hormonal chez la mye pourrait être la cause du retard de la synthèse des protéines apparentées à la vitellogénine enregistré chez les organismes de la Baie Éternité (Blaise et al., 1999) et par voie de conséquence sur leur maturation sexuelle (Gauthier-Clerc et al., 2002).

La reproduction, qui permet la pérennité de l'espèce, repose sur des mécanismes physiologiques régulés par les hormones sexuelles. Les études majeures sur la synthèse des hormones stéroïdiennes et l'importance de leur rôle dans la reproduction ont été réalisées chez les vertébrés. Or, ce groupe représente moins de 5% de la totalité des espèces animales (Barnes, 1968). Les hormones stéroïdiennes semblent être bien conservées au cours de l'évolution malgré quelques différences physiologiques retrouvées chez quelques espèces Protostome telles que les crustacés qui utilisent des ecdystéroïdes comme régulateurs des processus de la reproduction (Charniaux-Cotton et Payen, 1988).

En se basant sur les effets des perturbateurs endocriniens chez les vertébrés (Guillette et al., 2000) et sur la conservation de la structure moléculaire des stéroïdes au cours de l'évolution, notre étude s'intéresse :

- 1/ à la variation saisonnière de la progestérone au cours du cycle reproducteur chez *Mya arenaria* d'un site référence,
- 2/ à la comparaison du niveau de cette hormone avec celui des organismes d'un site soumis à une contamination d'origine anthropique tout en considérant la variation saisonnière.

5.1. Rôle de la progestérone dans la maturation sexuelle chez *Mya arenaria*

La progestérone, hormone précurseur des androgènes et oestrogènes, semble jouer un rôle clé dans la maturation sexuelle de la gonade chez la moule bleue *Mytilus edulis* (Reis-

Henriques et Coimbra, 1990). Cependant, chez la mye, aucune étude n'a été réalisée sur la présence de la progestérone dans la gonade et son rôle dans la régulation de son cycle reproducteur.

Actuellement la plupart des études sur le cycle reproducteur chez *Mya arenaria* sont limitées à la description des stades de reproduction de cette espèce. À l'Anse à l'Original, les gonades des myes réinitialisent leur maturation sexuelle entre le mois de juillet et septembre 1998 (Fig. 2.4). Après des stades de ponte et passé observés chez la femelle et des stades mûrs chez le mâle entre le mois d'août et septembre, le développement des cellules germinales a lieu entre le mois d'octobre et novembre chez les deux sexes. Des études antérieures ont bien décrit cette gamétogenèse bimodale chez les myes de l'estuaire du Saint-Laurent caractérisée par un développement des gonades au printemps, une période de ponte au début de l'été et un redémarrage d'une seconde gamétogenèse à la fin de l'été et au début de l'automne (Roseberry et al., 1991). Comparativement, sur la rive nord de l'estuaire du Saint-Laurent (Baie du Moulin-à-Baude), deux périodes d'activité de la gamétogenèse ont été observées par Gauthier-Clerc et al. (2002) en juillet et septembre-octobre 1997. De même, deux périodes de ponte distinctes (printanière et automnale) ont été mises en évidence chez les myes de la côte Atlantique, du Nord du Massachussetts (Brousseau, 1978) jusqu'à la Baie de Chesapeake (Ropes et Stickney, 1965).

La maturation des cellules germinales nécessite une mobilisation des ressources énergétiques telles que les lipides (Pipe et al., 1987a,b). Les réserves lipidiques produisent

plus d'énergie et sont plus économiques en terme de masse comparativement au glycogène qui nécessite une grande quantité d'eau pour son stockage (Mathieu, 1994). La quantité totale de lipides chez les moules représentent 10% du poids total humide dont 10% sont représentés par les lipides de structure et 90% sont attribués aux lipides de stockage (Kluytmans et al., 1985). La méthode d'analyse de Frings et al. (1972) que nous avons utilisée permet de quantifier la teneur des lipides totaux contenus dans les gonades de myes (Fig. 2.5). Au cours de la période de ponte chez les femelles et de stade mûr chez le mâle, les teneurs en lipides gonadiques diminuent. On constate une tendance à une augmentation des concentrations en lipide gonadique au cours de la période de redémarrage de la gamétogenèse en automne. Ainsi, dans la gonade des myes de l'Anse à l'Original, les lipides pourraient être utilisés pour la maturation des cellules germinales et mobilisés dans la gonade au cours du re-développement de ces cellules. Chez *Mytilus edulis*, la présence d'un nombre important d'inclusions lipidiques a été mise en évidence dans les cellules folliculaires chez la femelle et les cellules de Sertoli chez le mâle au cours du développement des cellules germinales alors que ce nombre diminue au fur et à mesure que la gamétogenèse progressait (Pipe et al., 1987b). Chez *Mya arenaria*, Clayton (1996) a mis en évidence la présence de lipoprotéines capables de véhiculer les lipides depuis les tissus de stockage vers la gonade pour permettre la maturation des cellules germinales. De plus, chez *Mya arenaria*, une importante activité des enzymes lysosomiales de la glande digestive a été observée au cours de la maturation des cellules germinales (Tremblay et Pellerin-Massicotte, 1997). De même, cette augmentation de l'activité des enzymes lysosomiales a été observée chez *Mytilus edulis* au cours de la maturation sexuelle (Peek et

Gabbott, 1990). La déstabilisation de la membrane lysosomiale semblerait être induite par la progestérone et le 17β -estradiol (Moore et al., 1978). Ainsi, ces hormones interviendraient dans la maturation des cellules germinales en stimulant la mobilisation des réserves énergétiques (lipides) par les lysosomes vers les cellules germinales (Peek et al., 1989).

Reis-Henriques et Coimbra (1990) se sont intéressés à la progestérone chez *Mytilus edulis* et à son rôle dans le cycle reproducteur de cette espèce. Ils ont mis en évidence la présence de la progestérone chez cette espèce par GC-MS (Reis-Henriques et al., 1990) et ont observé que le niveau de la progestérone était maximum au cours de la maturation sexuelle des gonades mâles et femelles *Mytilus edulis* (Reis-Henriques et Coimbra, 1990). La progestérone semblerait ainsi jouer un rôle de régulateur hormonal des processus de maturation des cellules germinales mâles et femelles *Mytilus edulis* (Reis-Henriques et Coimbra, 1990).

Le cholestérol, précurseur des hormones stéroïdes, représente 45.2% de la quantité totale des stérols chez *Mya arenaria* (Jarzebski, 1985). Dans notre étude, nous avons pu caractériser par LC-MS chez *Mya arenaria* la présence de la progestérone identique à celle des vertébrés (Fig. 2.6 et 2.7). Nous pouvions ainsi utiliser des kits ELISA pour la mesure des teneurs en progestérone dans la gonade. Par l'utilisation des anticorps spécifiques, la technique présente l'avantage de mesurer de faibles quantités en hormone. Cependant, les réactions croisées que l'anticorps peut effectuer avec d'autres molécules non spécifiques

telles que la prégnénolone en sont les limites. Les concentrations en progestérone mesurées dans la gonade chez *Mya arenaria* varient de 2.5 à 5 ng de progestérone par gramme de gonade en poids humide (Fig. 2.8). Ces teneurs se retrouvent dans le même ordre de grandeur que celles enregistrées chez *Mytilus edulis* (entre 0.29 et 4 ng/g de gonade en poids humide) (Reis-Henriques et al., 1990). Chez l'étoile de mer *Asterias vulgaris* les teneurs en progestérone (entre 0.3 et 6.1 ng/g de gonade en poids humide) se situent aussi dans le même ordre de grandeur que nos résultats (Hines et Watts, 1992).

Le profil de la progestérone chez *Mya arenaria* au cours de notre période d'échantillonnage est similaire pour les deux sexes (Siah et al., 2002). Nous avons enregistré un pic de la progestérone au cours du mois de septembre qui correspond à la période de maturation sexuelle chez le mâle et de ponte chez la femelle. Le niveau de la progestérone augmente dans la gonade au cours de la période de forte activité gamétogénique. Chez *Mytilus edulis*, un pic de la progestérone a été mesuré au cours de la période de maturation sexuelle précédant la ponte (Reis-Henriques et Coimbra, 1990). Comme proposé par Reis-Henriques et Coimbra (1990), la progestérone pourrait jouer un rôle primordial dans la stimulation de la maturation des cellules primordiales mâles et femelles en spermatozoïdes et ovocytes capable d'être pondus. Les mécanismes endocriniens qui interviennent sur la stimulation de la synthèse de la progestérone dans la gonade chez *Mya arenaria* ne sont pas encore élucidés. Néanmoins, des études chez *Crassostrea gigas* (Pazos et Mathieu, 1999) ont montré que les gonades de cette espèce renfermaient des récepteurs à des neurohormones et que la GnRH pouvait stimuler la

prolifération et la maturation des cellules germinales. La production de la progestérone par la gonade est probablement le résultat d'une stimulation neuroendocrinienne mais cette hypothèse reste à confirmer.

Notre étude met en relation, pour la première fois, le niveau de la progestérone avec le cycle reproducteur chez *Mya arenaria*. D'après nos résultats, nous pouvons prétendre que le bon déroulement des processus de la gamétogenèse serait contrôlé par le niveau de la progestérone dans la gonade. Une augmentation du niveau de la progestérone stimulerait la prolifération et la maturation des cellules germinales mâles et femelles.

En revanche, une perturbation du niveau de la progestérone par la présence de perturbateurs endocriniens aurait des répercussions sur les processus de la gamétogenèse. Dans le but de pouvoir prévenir et agir contre les conséquences écologiques que peuvent induire les perturbateurs endocriniens chez ces espèces à la base du réseau trophique, il est nécessaire de valider des biomarqueurs capables de mettre en évidence d'une part l'exposition des organismes aux xénobiotiques et d'autre part de comprendre leurs effets sur les fonctions endocriniennes de l'organisme.

5.2. Comparaison du niveau de la progestérone gonadique chez *Mya arenaria* échantillonnée dans différents sites de l'estuaire du Saint-Laurent.

Les rivières et les estuaires sont des réceptacles importants d'une grande quantité de déchets domestiques et industriels. Récemment, il a été démontré que des niveaux de TBT

compris entre 37 et 1078 ng Sn/g gonade en poids humide affecte le développement des cellules germinales de la moule zébrée échantillonnée à proximité du port de la ville de Québec dans le fleuve du Saint-Laurent (Regoli et al., 2001). Au niveau du Fjord du Saguenay, dans le site de la Baie Sainte-Catherine, le sex-ratio des myes est significativement favorable pour le sexe mâle (Gagné et al., 2003). Cette masculinisation semble être reliée aux fortes teneurs en TBT (109 ng Sn/g en poids sec) mesurées dans la gonade des myes échantillonnées dans la Baie Sainte-Catherine (Gagné et al., 2003). D'autre part, les myes du Fjord du Saguenay fortement exposées à une contamination diffuse en métaux lourds (Hg, Pb, Zn, Cu) (Barbeau et al., 1981) présentent une faible condition physiologique (Gagné et al., 2002) et un délai de la maturation sexuelle (Gauthier-Clerc et al., 2002). La croissance des cellules germinales est inhibée chez *Mytilus edulis* exposée au cadmium (100 ppb) (Kluytmans et al., 1988).

Au cours de cette étude, nous avons mesuré la teneur des métaux lourds (ML) et des organoétains (TBT, DBT et MBT) dans la gonade des myes échantillonnées dans quatre sites du Saint-Laurent : l'Anse à l'Original considéré comme site référence et trois sites contaminés : à l'embouchure de la rivière Trois-Pistoles qui drainent des effluents industriels et urbains, proche du port de Rimouski et au niveau de la Baie Les Capucins non loin de la cale sèche des Méchins (Fig. 3.1).

La contamination au TBT est très importante chez les myes récoltées à proximité du port de Rimouski où la teneur en TBT est de 145.5 ± 34.02 ng Sn/g de gonade en poids sec

(PS) et dans les gonades des myes de Trois-Pistoles où les teneurs en TBT sont de 143.36 ± 38.21 ng Sn/g gonade PS). De fortes concentrations en TBT ont été mesurées dans la gonade des myes de l'Anse à l'Original (103.3 ± 44.8 ng Sn/g gonade PS), ce qui suppose une source de contamination en TBT au niveau de l'Anse à l'Original bien que moins importante par rapport à Rimouski ou à Trois-Pistoles. Comparativement, les teneurs en TBT dans les tissus des moules de l'estuaire du Saint-Laurent comprises entre 50 et 120 ng Sn/g en poids sec (Chau et al., 1997; Pelletier et Normandeau, 1997) et dans les gonades des myes du fjord du Saguenay (Gagné et al., 2003) sont de l'ordre de grandeur des concentrations que l'on a retrouvées dans nos gonades des myes (Tableau 5.1). D'autre part, les gonades des myes de Rimouski sont les seules échantillons qui renferment du DBT (24.95 ± 2.41 ng Sn/g gonade poids sec). Sachant que les myes présentent de faible capacité à dégrader le TBT (Kure et Depledge, 1994), la présence du DBT dans la gonade des myes de Rimouski laisse présager une contamination ancienne du milieu par le TBT.

Le TBT présente une dualité chimique car il est capable de se solubiliser dans le milieu aqueux grâce à son cation étain mais surtout le TBT est capable de s'accumuler dans les milieux riches en lipides grâce à ses groupements butyls (Perreira et al., 1999). Nous avons mesuré la teneur des gonades en lipides chez les organismes des différents sites et nous avons constaté que les myes de l'Anse à l'Original et de Trois-Pistoles renfermaient des teneurs élevées en lipides totaux comparativement à Rimouski. Ainsi, nous pouvons supposer que les gonades des myes de l'Anse à l'Original et Trois-Pistoles riche en lipides totaux étaient propices à une forte accumulation en TBT. Les concentrations en TBT

Organismes	Sites	TBT (ng Sn/g poids humide)	Références
<i>Ruditapes decussata</i>	Port d'El Masnou	4.9 - 230.5	Morcillo et Porte, 2000
<i>Ruditapes decussata</i>	Port de Barcelone	285	Morcillo et Porte, 1998
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Port de Barcelone	401 - 1151	Morcillo et Porte, 1998
	Port d'El Masnou	240 - 356	Morcillo et Porte, 1998
	Port Saint-Charles	201 - 283	Morcillo et Porte, 1998
<i>Mytilus edulis</i>	Estuaire du Saint-Laurent	30-70	Pelletier et Normandeau, 1997
<i>Mytilus edulis</i>	Estuaire du Saint-Laurent (Rimouski)	2.7 - 40	Saint-Louis et al., 1997
<i>Dreissena polymorpha</i>	Estuaire de Saint-Laurent (Ville de Québec)	37 - 1078	Regoli et al., 2001
<i>Mya arenaria</i> (gonade)	Estuaire du Saint-Laurent (Rive Sud)	9.1 - 15.2	Siah et al., 2003
	Baie Saint-Catherine (Fjord du Saguenay)	6 -15.3	Gagné et al., 2003

Tableau 5.1: Comparaison des concentrations en TBT (ng Sn/g en poids humide) chez différentes espèces de mollusque bivalve

rapportées à la quantité en lipides dans les gonades reflèteraient mieux le niveau de contamination. Par conséquent, le niveau en organoétains totaux par gramme de lipide gonadique sont deux fois plus élevés à Rimouski comparativement aux autres sites (Fig. 3.6).

La contamination des gonades des myes de l'estuaire du Saint-Laurent par les métaux lourds est comparable à celle des macroinvertébrés de l'estuaire du Saint-Laurent proche de la région de l'Ontario (Filion et Morin, 2000) à l'exception du plomb où les concentrations sont plus faibles dans les gonades de nos myes. Les teneurs en zinc, plomb et cadmium sont significativement plus importantes dans les gonades des myes de Trois-Pistoles en comparaison avec l'Anse à l'Original. Les concentrations en cadmium et plomb sont plus importantes bien que non significatives dans les gonades des myes de Rimouski en comparaison avec l'Anse à l'Original, alors que les niveaux de cuivre et de zinc sont significativement inférieures.

Nous avons comparé le pourcentage de chaque stade de développement de la gonade pour les différents sites (Fig. 3.2). Il en résulte qu'au cours de notre période d'échantillonnage, les myes de Rimouski n'ont pas abouti à la maturité sexuelle et qu'aucune gonade n'a été observée au stade de ponte. Les myes des Capucins et Trois-Pistoles ont atteint la maturité sexuelle en octobre et novembre mais n'ont pas effectué de ponte. Alors qu'à l'Anse à l'Original, les gonades des myes étaient au stade mûr en été et on a pu observé des femelles au stade de ponte en août et septembre. Le retard de la maturation

sexuelle évident chez les myes de Rimouski pourrait être relié à la présence probablement des métaux lourds mais surtout des organoétains (TBT et DBT) dans la gonade.

Au cours de notre analyse des différents stades de développement de la gonade, nous avons constaté que certaines alvéoles des gonades des myes de Rimouski renfermaient des cellules germinales atrésiques (Fig. 3.7). Les mêmes observations ont été effectuées chez la moule zébrée par Regoli et al. (2001). Les auteurs ont attribué ces anomalies cellulaires au TBT (Regoli et al., 2001). Dans le Fjord du Saguenay, la maturation des gonades mâles semble être affectée par la présence du TBT chez les myes de la Baie Sainte-Catherine (Gagné et al., 2003). Le TBT est capable d'interférer sur les mécanismes qui interviennent dans le cycle cellulaire. Il affecte la séquestration du calcium, la synthèse des macromolécules, la phosphorylation des protéines (Girard et al., 1997) et génère l'oxyde nitrique qui endommage les molécules d'ADN (Burney et al., 1999).

Les teneurs gonadiques en progestérone ont été comparées entre les différents sites (Fig. 3.5). Nous constatons que les concentrations en progestérone gonadique chez les myes de Rimouski sont huit fois plus faibles comparativement aux teneurs retrouvées dans les gonades des myes de l'Anse à l'Original. Chez l'étoile de mer *Asterias vulgaris*, des concentrations gonadiques en cadmium comprises entre 0.75 et 1.43 µg/g de gonade en poids sec induisent une réduction significative du niveau de la progestérone chez les deux sexes (Den Besten et al., 1991). De plus, le TBT semblerait inhiber le cytochrome P450, système enzymatique capable d'intervenir dans le métabolisme des xénobiotiques mais

aussi dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes chez les invertébrés (Bjorkem, 1982). Par conséquent, une inhibition du système cytochrome P450 pourrait interférer avec le métabolisme de la progestérone (Spooner et al., 1991), mais aussi empêcher l'élimination par l'organisme des perturbateurs endocriniens tels que les métaux lourds (Kluytmans et al., 1988; Den Besten et al., 1991).

Dans l'environnement, il existe une grande variété de contaminants qui peuvent interagir et venir perturber les systèmes endocriniens des organismes exposés (Morcillo et Porte, 1997; Monteiro et al., 2000; Tremblay et Van Der Kraak, 1999; Den Besten et al., 1991; Gagnon et al., 1994). La première étape de la production des hormones stéroïdiennes concerne la conversion du cholestérol en prégnénolone grâce au cytochrome P450 C_{27scc}. À son tour, la prégnénolone est ensuite utilisée comme précurseur par la 3 β -HSD pour la synthèse de la progestérone. Les perturbateurs endocriniens peuvent affecter la stéroïdogénèse en diminuant la disponibilité du cholestérol au cytochrome P450_{scc} dans la mitochondrie et/ou en réduisant l'activité de l'enzyme (Crain et al., 1999). Les xénobiotiques peuvent exercer leur effet directement sur l'activité de l'enzyme de la stéroïdogénèse et entraîner une diminution du niveau des hormones sexuelles (Kapur et al., 1978). Singh et Singh (1992) ont observé une diminution du niveau du 17 α -hydroxyprogesterone, de la testostérone et du 17 β -oestradiol à la suite d'une contamination des poissons chats d'eau douce (*Heteropneustes fossilis*) aux pesticides organophosphorés (malathion) et organochlorés (γ -BHC). Ces composés interféraient sur la sécrétion des gonadotrophines qui stimulent la stéroïdogénèse (Singh & Singh, 1992).

D'autre part, les effets des contaminants sur le niveau des hormones sexuelles peuvent avoir lieu de manière indirecte par stimulation des systèmes de détoxification tels que l'activité des oxygénases à fonction mixte (MFO). Des études réalisées sur l'impact des effluents de pâte kraft blanchie (BKME), libérés à partir d'usine de pâtes, sur la population de poissons benthiques meuniers noirs du lac Supérieur (*Catostomus commersoni*) ont montré une diminution du niveau du 17α , 20β dihydroxyprogestérone chez les deux sexes (Munkittrick et al., 1992). Dans cette étude, les organismes présentent une forte activité des MFO qui, outre leur action de conjugaison et d'élimination des xénobiotiques, sont capables de métaboliser les hormones stéroïdiennes (Waxman, 1996). Une autre espèce de meunier (*Catostomus catostomus*) et les corégones (*Coregonus chupeaformis*) de la Baie Jackfish exposées aux BKME présentent les mêmes effets mais à des amplitudes différentes (Munkittrick et al., 1992). Ces résultats suggèrent que l'activité des isoenzymes du système MFO serait augmentée en présence de contaminant issus des BKME ce qui en résulte une diminution du niveau des hormones stéroïdiennes (McMaster et al., 1991). Dans le même sens, plusieurs autres études ont montré le lien entre l'augmentation de l'activité du système MFO et la diminution du niveau des hormones stéroïdiennes suite à une exposition aux BPCs et HAPs (Sivarajah et al., 1978; Spies et al., 1988).

Le site de Rimouski Est, situé à proximité du port de Rimouski est propice à une forte contamination notamment en tributylétain (TBT). Les études de Saint-Louis et al. (1997) ont montré la présence du TBT dans les sédiments et les moules échantillonnés à proximité de ce port. Le mécanisme d'action du TBT au niveau hormonal n'est pas totalement élucidé

mais il semblerait intervenir comme inhibiteur de l'activité des cytochromes P450. Cependant, les études de Morcillo et Porte chez *Ruditapes decussata* (Morcillo et Porte, 1997 et 2000 ; Morcillo et al., 1998) montrent que l'action du TBT sur le système cytochrome P450 n'est pas dirigée à une isoenzyme spécifique du système.

Cette étude met en relief, pour la première fois chez *Mya arenaria*, le rôle de régulateur hormonal de la progestérone sur son cycle reproducteur et d'autre part, la caractérisation d'un site contaminé par une approche endocrinologique. Nos résultats montrent que le niveau de la progestérone chez les myes de Rimouski Est est très faible comparativement aux myes de l'Anse à l'Original. Cependant, il reste à élucider quels sont les facteurs qui interviennent dans cette perturbation et par quel mécanisme? Ainsi, pour mieux comprendre l'action des perturbateurs endocriniens sur le niveau des hormones sexuelles, il est nécessaire d'effectuer des études en milieu contrôlé pour pouvoir discriminer entre l'effet du ou des contaminant de celui des facteurs environnementaux naturels.

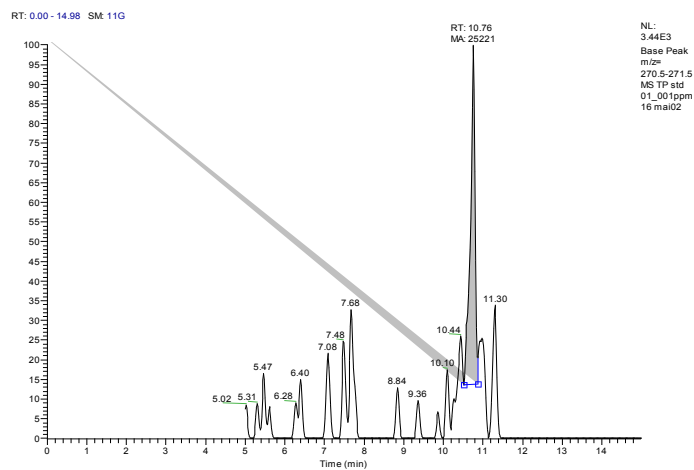
Ainsi, dans le but de vérifier l'effet du TBT sur le niveau des hormones stéroïdiennes chez *Mya arenaria*, nous avons effectué une étude d'exposition à moyen terme. Pour éliminer les facteurs environnementaux confondants, nous avons réalisé cette étude en mésocosme où ces facteurs ont été contrôlés, tout en suivant le cycle naturel *in situ*.

5.3. Effets du TBT sur le niveau des hormones sexuelles chez *Mya arenaria* : Étude en mésocosmes

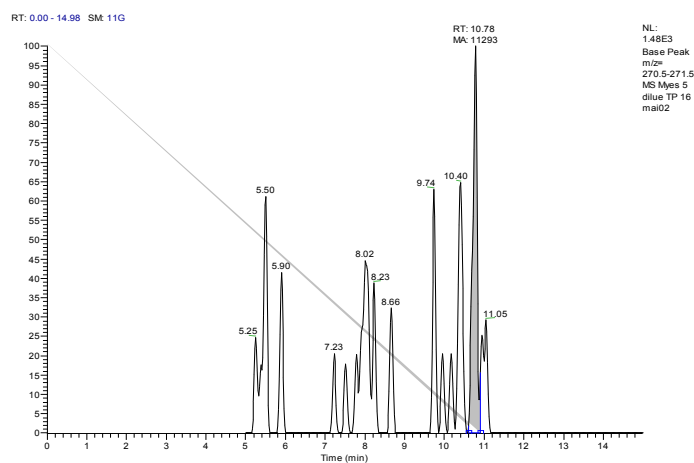
Au cours de cette étude, nous avons exposé des myes récoltées au niveau de l'Anse à l'Original à des concentrations différentes en TBT. Les myes ont été placées dans des bacs avec du sédiment à l'intérieur des mésocosmes remplis d'eau de mer (3000 litres). L'eau de mer est pompée de l'estuaire proche de la station aquicole de Pointe au Père. Cette étude vise à mettre en exergue l'effet du TBT sur le niveau des hormones sexuelles progestérone, testostérone et 17 β -estradiol chez *Mya arenaria*.

Le kit ELISA utilisé pour la mesure de la testostérone renferme des anticorps spécifiques à cette molécule. Pour la caractérisation de la testostérone chez la mye, nous avons utilisé un standard testostérone (Sigma). Par la technique LC-MS/MS, nous obtenons un pic (aire=25221) à 10.76 min. pour une concentration de 0.01 ppm (Fig. 5.1.A). Pour l'extrait de mye, un pic (aire=11293) apparaît au même temps de rétention que le standard (10.78 min.) (Fig. 5.1.B). Un ajout du standard testostérone (0.005 ppm) avec l'extrait a été réalisé (Fig. 5.1.C). Un pic unique (aire=24746) a été détecté au temps de rétention du standard (10.78 min.). Ces résultats semblent confirmer la présence de la molécule de testostérone dans les extraits de myes.

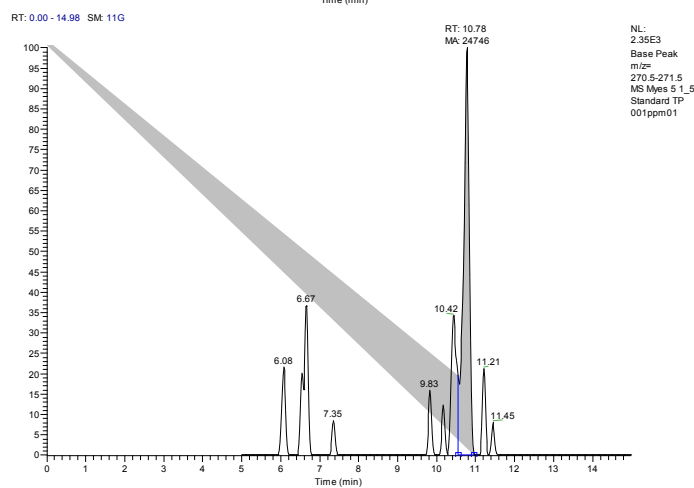
Il est nécessaire de comprendre au préalable le rôle de chaque hormone au cours du cycle reproducteur chez *Mya arenaria*. Nous avons ainsi réalisé des échantillonnages en milieu naturel en parallèle avec les mésocosmes.



(A)



(B)



(C)

Figure 5.1 : Chromatogrammes de standard testostérone (Sigma) 0.01 ppm (A), d'extrait de *Mya arenaria* (B) et du mélange de l'extrait avec le standard (C).

5.3.1. Niveau des hormones sexuelles en fonction du cycle reproducteur chez *Mya arenaria* de l'Anse à l'Original

L'échantillonnage des myes a été effectué de juin à octobre 1999. D'après les résultats histologiques, nous avons constaté que les organismes ont pondu en juin (Fig. 4.3). Les gonades sont entrées en phase de repos en août et la gamétogenèse a redémarré en septembre et octobre caractérisée par des stades de développement cellulaire chez les femelles et de maturation sexuelle chez les mâles. Cette période de forte activité gamétogénique coïncide avec un pic du niveau des hormones sexuelles. Dès le mois d'août on assiste à une augmentation du niveau de la progestérone, testostérone et 17β -estradiol chez les organismes mâles et femelles (Fig. 4.6). Les fortes teneurs en hormones stéroïdiennes se maintiennent en septembre mais chutent en octobre. D'autre part, nous constatons que le pic de ces hormones sexuelles est lié aux températures élevées enregistrées dans le sédiment (environ 14°C) (Fig. 4.1). Ces résultats laissent présager que les facteurs environnementaux comme la température pourraient intervenir comme stimulateur de la production des hormones sexuelles gonadiques chez *Mya arenaria*. En retour, ces hormones déclencheraient la prolifération et la maturation des cellules germinales. Ces mêmes hormones interviennent dans la régulation de la gamétogenèse chez d'autres espèces bivalves comme la moule bleue *Mytilus edulis* (Reis-Henriques et Coimbra, 1990), les huîtres du pacifique *Crassostrea gigas* (Matsumoto et al., 1997) ou encore l'étoile de mer *Asterias vulgaris* (Hines et Watts, 1992). Bien que ces hormones semblent intervenir de la même manière chez différentes espèces, les concentrations

mesurées chez *Mya arenaria* en testostérone et 17β -oestradiol sont différentes en comparaison avec d'autres espèces. Par exemple, les niveaux du 17β -oestradiol sont plus élevés chez *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 1998), plus faibles chez le pétoncle *Platinopecten yessoensis* et l'huître *Crassostrea gigas* (Matsumoto et al., 1997) alors que les niveaux enregistrés chez l'étoile de mer *Asterias vulgaris* (Hines et Watts, 1992) sont similaires à ceux mesurés chez *Mya arenaria*. Néanmoins il faut noter que les techniques utilisées pour les mesures des hormones sexuelles sont différentes. La plupart des mesures chez les différentes espèces mentionnées ont été effectuées par radioimmunoétalonnage (RIA).

5.3.2. Niveau des hormones sexuelles chez *Mya arenaria* exposée au TBT

Mya arenaria a été exposée à différentes concentrations en TBT. Nous avons contaminé de manière continue l'eau des mésocosmes (renouvellement total de l'eau de mer des mésocosmes à tous les 48 heures) à des concentrations nominales 0.1, 1, 10 et 100 ng TBTCl (commercial)/L d'eau de mer. Nous avons utilisé des mésocosmes pour représenter au mieux le milieu naturel tout en contrôlant les paramètres environnementaux tels que la température, la salinité et le mode alimentaire similaire à tous les mésocosmes. Les niveaux de contamination des mésocosmes se rapprochent des niveaux enregistrés dans les eaux du large (entre 0.1 et 1 ng TBTCl/L), dans les estuaires (environ 10 ng TBTCl/L) et au niveau des zones portuaires (environ 100 ng TBTCl/L).

Grâce à ses groupements butyles le TBT est capable de s'accumuler dans les tissus des organismes. *Mya arenaria* est capable d'accumuler le TBT par un facteur 57 000 jusqu'à 220 000 (Kure et Depledge, 1994). Après trois mois d'alimentation des myes en mésocosmes (identique à ceux que nous avons utilisé) avec une culture d'algues phytoplanctoniques contaminées au TBT, Saint-Hilaire (1997) a observé une accumulation du TBT dans les tissus des organismes. Le niveau du TBT dans les tissus des myes est passé de 25.9 ± 2.7 ng/g chair humide au début de l'expérience à 133.2 ± 14 ng/g chair humide après trois mois d'exposition (Saint-Hilaire, 1997). Dans notre étude, en début d'expérience (après un mois d'adaptation), le niveau du TBT est en dessous du seuil de détection. Les organismes exposés à 0.1 et 10 ng TBTCl/L, l'accumulation du TBT dans la gonade est comprise entre 409 et 646 ng/g de gonade poids sec après deux mois d'exposition. Alors qu'après trois mois d'exposition, les niveaux en TBT dans la gonade de ces organismes est plus faible. Cependant, nous constatons que l'accumulation dans les gonades est linéaire au cours du temps seulement chez les organismes exposés à 100 ng TBTCl/L. Les myes exposées à 100 ng TBTCl/L, le niveau en TBT gonadique atteint 491 ng/g poids sec après deux mois d'exposition et augmente à 1031 ng/g de gonade poids sec après trois mois d'exposition (Fig. 4.5). Dans le milieu naturel, des moules zébrées récoltées dans un environnement portuaire de la ville de Québec contaminé au TBT renferment dans leurs tissus des concentrations en TBT situées entre 37 et 1078 ng/g en poids humide (Regoli et al., 2001). Au cours de notre étude réalisée en 1998 à différents sites de l'estuaire, nous avons enregistré des concentrations en TBT dans les gonades des myes à Rimouski avoisinant 145 ng/g de gonade poids sec (Fig. 3.6).

Au niveau des hormones, la teneur de la testostérone augmente de 50% chez les myes dont le niveau en TBT gonadique est compris entre 400 et 600 ng/g de gonade poids sec (Fig. 4.9 et 4.10). Le niveau en 17β -oestradiol augmente dans les gonades des myes qui renferment de fortes concentrations en TBT (1000 ng/g gonade en poids sec) (Fig. 4.10). Chez les mollusques bivalves, les seules études réalisées sur l'effet du TBT sur le niveau des hormones sexuelles ont été entreprises chez *Ruditapes decussata* au niveau des régions portuaires de la méditerranée en Espagne. Chez cette espèce, le niveau de contamination dans les tissus varie de 200 à 1100 ng/g gonade en poids humide (Morcillo et Porte, 1999). Chez les organismes qui renferment environ 290 ng/g gonade en poids humide, le niveau de la testostérone augmente de 33% alors que le niveau en 17β -oestradiol diminue (Morcillo et Porte, 2000). L'inhibition du système cytochrome P450-aromatase qui intervient dans l'aromatisation de la testostérone en 17β -oestradiol par le TBT a été proposée comme la cause de l'augmentation de la testostérone dans les tissus (Morcillo et al., 1998). Cependant, le TBT n'intervient pas sur le niveau du 17β -oestradiol chez *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 1998). De plus, à notre connaissance, aucune étude chez les mollusques bivalves n'a montré une inhibition directe du TBT sur le système cytochrome P450-aromatase (Morcillo et Porte, 1998). Le mécanisme par lequel le TBT induit une accumulation de la testostérone dans les tissus restent actuellement spéculatif. Néanmoins, il a été postulé que le TBT interfère sur le métabolisme d'élimination de la testostérone comme observé chez *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 1998) et/ou sur le métabolisme des neurohormones qui induisent une augmentation de la testostérone dans les tissus de *Ilyanassa obsoleta* (Oberdörster et McClellan-Green, 2000). Par contre, le TBT n'a pas

d'effet significatif sur le niveau du 17β -estradiol des microsomes de *Ruditapes decussata* (Morcillo et al., 1998).

Dans notre étude, nous n'avions pas observé d'effet significatif du TBT sur le niveau de la progestérone. Cependant, nous avons constaté des anomalies histologiques au niveau des gonades des myes exposées à 100 ng/l et après trois mois d'exposition (Fig. 4.11). Nos observations démontrent une atrophie des cellules germinales comme il a été mentionné chez la moule zébrée de l'estuaire du Saint-Laurent (Regoli et al., 2001) et chez les myes collectées proche du port de Rimouski (Siah et al., 2003).

Ces résultats confirment que le TBT perturbe le niveau de la testostérone et du 17β -oestradiol chez *Mya arenaria*. Quels sont les mécanismes d'action du TBT impliqués dans cette perturbation hormonale? Quelles sont les conséquences sur les mécanismes régulés par ces hormones tels que la vitellogenèse? L'atrophie des cellules germinales ainsi observée émane-t-elle de la perturbation hormonale ou de l'action cytologique du TBT? Ainsi, le TBT reste une menace pour la pérennité de l'espèce malgré les restrictions d'utilisation de ce composé. Les observations émergeant de cette étude nous poussent à entreprendre des études plus approfondies sur le mécanismes d'action du TBT au niveau de l'histopathologie cellulaire et de l'endocrinologie moléculaire.

5.4. Conclusions et perspectives

Le rôle central des hormones stéroïdes dans la régulation des processus physiologiques de la reproduction est bien établi chez les vertébrés. Les molécules de base semblent être bien conservées au cours de l'évolution et sont synthétisées aussi bien par les organismes eucaryotiques que procaryotiques. Cependant, le rôle de ces hormones dans les processus régulateurs de la reproduction semble diverger au cours de l'évolution. En revanche, la régulation des fonctions de la reproduction chez les échinodermes (étoiles de mer) et les mollusques bivalves (moules) par les hormones stéroïdes (progestagènes, androgènes et oestrogènes) a été bien documentée.

Nos travaux ont montré la présence de la progestérone dans la gonade chez *Mya arenaria*. Le profil saisonnier de cette hormone est relié avec le cycle de la gamétogenèse des organismes. Le niveau de cette hormone dans la gonade des organismes de l'Anse à l'Original est faible à la fin et au début de la gamétogenèse et augmente au cours du développement et de la maturation des cellules germinales. Ainsi, on pourrait supposer que la progestérone intervient dans la régulation du cycle gamétogénique chez *Mya arenaria*.

Les alvéoles des gonades de myes renferment à la fois des cellules folliculaires (cellules de stockage des réserves lipidiques) et des cellules germinales. Étant donné que la progestérone est présente dans la gonade, nous pourrions supposer que la synthèse est réalisée par les cellules folliculaires qui renfermeraient le cholestérol, molécule précurseur de la progestérone. Le rôle probable de cette hormone dans la régulation de la gamétogenèse pourrait avoir lieu sur deux processus physiologiques clés. La progestérone

pourrait intervenir de manière autocrine sur les cellules folliculaires elles-mêmes pour la mobilisation des réserves énergétiques tels que les lipides et/ou une fonction paracrine sur la division des cellules germinales (Fig. 5.2) d'autant plus que des récepteurs aux stéroïdes ont été identifiés dans les gonades de myes.

Au cours des dernières années, les substances perturbatrices des systèmes endocriniens présentes dans les environnements aquatiques sont devenues un sujet de préoccupation majeur. Par le développement technologique des appareils d'analyse chimique tels que le GC-MS ou LC-MS, il nous est possible de détecter de faibles concentrations des perturbateurs endocriniens et d'en comprendre les effets sur les fonctions endocriniennes des espèces exposées. Les métaux lourds et le TBT sont reconnus pour jouer un rôle de perturbateur endocrinien chez les organismes aquatiques. Les teneurs en cadmium, TBT et DBT dans la gonade des myes de Rimouski et Trois-Pistoles de la rive sud de l'estuaire du Saint-Laurent sont élevées comparativement à l'Anse à l'Orignal et les Capucins.

Au niveau de l'histologie reproductive, les organismes de Rimouski et Trois-Pistoles présentent un retard de la maturation sexuelle comparativement à l'Anse à l'Orignal. Ce retard est plus prononcé chez les organismes échantillonnés proches du port de Rimouski où le niveau de la progestérone est huit fois inférieur à celui de l'Anse à l'Orignal. La faible

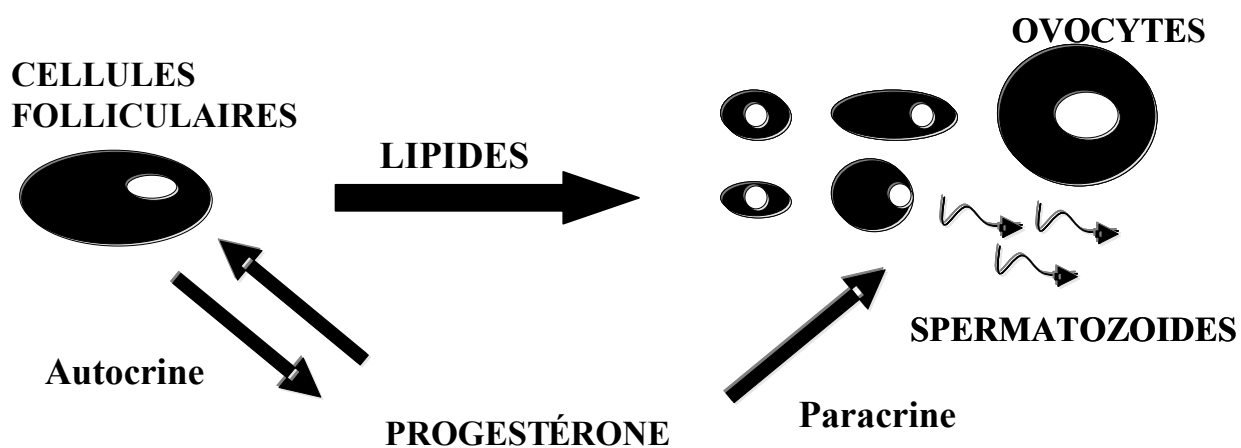


Figure 5.2: Schéma hypothétique de la régulation de la maturation des cellules germinales par la progestérone chez *Mya arenaria*

quantité de progestérone enregistrée dans la gonade des myes de Rimouski pourrait être insuffisante pour induire tous les processus de la gamétogenèse. Plusieurs facteurs pourraient intervenir sur le niveau de la progestérone. La présence des contaminants dans la gonade des myes en forte concentration en particulier le TBT et DBT, pourrait jouer un rôle majeur dans la perturbation de la synthèse de la progestérone. Les effets observés sur le niveau de la progestérone dans la gonade chez *Mya arenaria* sont-ils le résultat de l'interaction synergique de plusieurs contaminants ou spécifique à un contaminant? Ces effets sont-ils la conséquence des différences des facteurs environnementaux entre les sites? Les données de température, salinité et matière particulaire en suspension recueillies par Assoi-Etchian en 1999 pour les quatre sites (communication personnelle) montrent que seule la salinité diffère entre ces sites.

De ce fait, une étude en mésocosme était nécessaire pour mieux comprendre l'effet d'un contaminant sur le niveau des hormones sexuelles tout en contrôlant les facteurs environnementaux. Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés aux effets du TBT sur le niveau des hormones sexuelles chez les myes de l'estuaire du Saint-Laurent. Les niveaux de la testostérone et 17β -oestradiol mesurés dans la gonade évoluent de la même manière que la progestérone. La teneur de ces hormones augmente de manière significative au cours du stade de développement et de maturation des cellules germinales. Chez les bivalves de la Méditerranée, l'équipe de Morcillo et Porte ont démontré que le TBT induisait une augmentation du niveau de la testostérone chez *Ruditapes decussata*. Dans notre étude, l'accumulation du TBT entraîne une augmentation significative du

niveau de la testostérone chez les femelles et du 17β -estradiol au niveau des deux sexes mais n'affecte pas le niveau de la progestérone. La perturbation du niveau des hormones sexuelles par le TBT est plus prononcée chez les femelles comparativement aux mâles. Nos résultats suggèrent que le TBT induit une augmentation du niveau de la testostérone chez les femelles *Mya arenaria*. Nous pouvons supposer que l'augmentation du niveau du 17β -estradiol est le résultat de l'aromatisation des fortes teneurs en testostérone. L'augmentation du 17β -estradiol se traduit par une augmentation de l'indice de maturité entre le mois de septembre et octobre alors que celui du témoin diminue. Néanmoins, on constate que l'indice de maturité total est plus faible chez les organismes exposés au TBT. D'autre part, des observations histologiques relatent une atrophie des cellules germinales chez les organismes exposés à de fortes concentrations en TBT (100 ng TBTCI/L).

Le TBT subsiste une menace pour les organismes marins en particulier les bivalves dont les mécanismes de dégradation de ce composé sont peu efficaces. Ces résultats nous poussent à approfondir les études du mécanisme d'action du TBT sur le niveau des hormones sexuelles chez *Mya arenaria*. Le système enzymatique aromatase ne semble pas être affecté par le TBT mais d'autres voies de recherche pourraient être prospectées comme par exemple la voie neurohormonale.

Les hormones pourraient être utilisées comme marqueur moléculaire d'une perturbation des fonctions reproductrices des espèces exposées aux perturbateurs endocriniens. Cependant, les conséquences et les mécanismes d'action de ces substances

perturbatrices ne pourront être caractérisées par cette approche. Au cours des dernières décennies, les développements des technologies en biologie moléculaire permettent de mieux appréhender les modifications de l'expression génique du tissu d'un organisme exposé à une contamination du milieu. Par exemple, l'analyse différentielle du transcriptome en système ouvert permet de cibler les gènes différentiellement régulés par des xénobiotiques. On arrivera donc à quantifier l'expression des gènes ayant subis une modification. Le développement de ces outils est nécessaire pour étudier les effets d'un contaminant, pour mieux comprendre les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens et pouvoir prédire les conséquences sur l'environnement.

Cette nouvelle démarche pourra être utilisée dans les programmes de surveillance d'une contamination du milieu par le TBT chez une espèce sentinelle telle que *Mya arenaria*. Les connaissances actuelles concernant le génome de *Mya arenaria* sont extrêmement limitées ce qui impose l'utilisation de technique en système ouvert d'analyse de transcriptome. L'utilisation des techniques de la PCR différentielle (DD-PCR) et la construction de banque d'ADNc soustractive représentent des outils adéquats dans le criblage des gènes cibles. Ces techniques nous permettront d'identifier des gènes inconnus dont l'expression a été modifiée par la présence du TBT dans la gonade.

Cette approche représentera une nouvelle avenue dans la compréhension des mécanismes d'action du TBT sur la stéroïdogénèse chez *Mya arenaria*. L'expression des gènes différentiellement régulés par la présence du TBT constituera des biomarqueurs

d'exposition ou d'effet. Après identification des gènes cibles, ils pourront servir dans l'élaboration de puces d'ADN capable de nous prévenir sur les effets du TBT dans des gonades de myes exposée.

5.5. Références

- Barbeau, C., Bougie, R., Côté, J.E., 1981. Temporal and spatial variations of mercury, lead, zinc and copper in sediments of the Saguenay fjord. *Can. J. Earth Sci.* 18 : 1065-1074.
- Barnes, R.D. (1968). "Invertebrate zoology", Saunders, Philadelphia, p. 1-4.
- Bjorkem, I., 1982. Rate limiting step in microsomal cytochrome P-450 catalyzed hydroxylations. In: Schenkman, J.B., Kupfer, D. (Eds), *Hepatic Cytochrome P-450 Monooxygenase System*. Academic Press, NY, pp. 645-666.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.* 424 : 37-49.
- 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. *Environ. Toxicol.* 14 : 455-465.
- Brousseau, D.J., 1978. Population dynamics of the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Mar. Biol.* 50 : 63-71.
- Charniaux-Cotton, H., Payen, G., 1988. Crustacean reproduction. (Eds.) Laufer, H. et G.H. Downer "Endocrinology of selected invertebrate types" : 279-303.
- Chau, Y.K., Yang, F., Brown, M., 1997. Evaluation of derivatization techniques for the analysis of organotin compounds in biological tissue. *Anal. Chim. Acta.* 338 : 51-55.
- Clayton, M.E., 1996. Lipoproteins and heat shock proteins as measures of reproductive physiology in the soft-shell clam *Mya arenaria*. PhD thesis MIT/WHOI.

- Crain, D.A., Rooney, A.A., Orlando E.F., Guillette, J.J.L., 1999. Endocrine disrupting contaminants and hormone dynamics : lessons from wildlife, dans Guillette, L.J.Jr. and Crain, D.A. (eds), Environmental endocrine disruptors : an evolutionary perspective, New York, Taylor and Francis Publishing, p. 1-21.
- Den Besten, P.J., Elenbaas, J. M. L., Maas, J. R., Dieleman, S. J., Herwig, H. J., Voogt, P. A., 1991. Effects of cadmium and polychlorinated biphenyls (Clophen A50) on steroid metabolism and cytochrome P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias rubens* L. Aquat. Toxicol. 20 : 95-110.
- Filion, A., Morin, A., 2000. Effect of local sources on metal concentrations in littoral sediments and aquatic macroinvertebrates of the St. Lawrence River, near Cornwall, Ontario. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 57 : 113-125.
- Frings, C.S., Fendley, T.W., Dunn, R.T., Queen, C.A., 1972. Improved determination of total serum lipids by sulfo-phospho-vanilin reaction. Clin. Chem. 18 : 673-674.
- 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? Comp. Biochem. Physiol. 131 (C) : 457-467.
- Gagné, F., Blaise, C., Pellerin, J., Gauthier-Clerc, S., 2002. Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. Mar. Environ. Res. 53 : 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*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Québec, Canada). Comp. Biochem. Physiol. 134C : 189-198.
- Gagnon, M.M., Dodson, J. J., Hodson, P.V., 1994. Ability of BKME (bleached kraft mill effluent) exposed white suckers (*Catostomus commersoni*) to synthesize steroid hormones. Comp. Biochem. Physiol. 100C (2) : 265-273.
- Girard, J.P., Ferrua, C., Pesando, D., 1997. Effects of tributyltin on Ca^{2+} homeostasis and mechanisms controlling cell cycling in sea urchin eggs. Aquat. Toxicol. 38, 225 -239.
- Guillette, L.J.Jr., Crain, A.D., Gunderson, S.A.E., Kools, M.R., Milnes, E.F., Rooney A.A., Woodward, A.R., 2000. Alligators and endocrine disrupting contaminants : a current perspective. Am. Zool. 40 : 438-452.
- Hines, G.A., Watts, S.A., 1992. Sex steroid levels in the testes, ovaries, and pyloric caeca during gametogenesis in the sea star *Asterias vulgaris*. Gen. Comp. Endocrinol. 87 : 451-460.

- Jarzebski, A., 1985. Major sterols of bivalve molluscs from the inner Puck Bay, Southern Baltic. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B(4) : 989-991.
- Kapur, K., Kamaldeep, K., Toor, H.S., 1978. The effect of fenitrothion on reproduction of the teleost fish, *Cyprinus carpio communis* Linn. A biochemical study. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20 : 438-442.
- Kluytmans, J.H., Boot, J.H., Oudejeans, R.C.H., 1985. Fatty acid synthesis in relation to gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B (4) : 959-963.
- Kluytmans, J.H., Brands, F., Zandee D.I., 1988. Interactions of cadmium with the reproductive cycle of *Mytilus edulis* L. *Mar. Environ. Res.* 24 : 189-192.
- Kure, L.K., Depledge, M.H., 1994. Accumulation of organotin in *Littorina littorea* and *Mya arenaria* from Danish coastal waters. *Env. Poll.* 84 : 149-157.
- Mathieu, M., 1994. Endocrine control of carbohydrate metabolism in molluscs, dans Davey, K.G., Peter R.E., Tobe S.S. (eds), *Persp. Comp. Endocrinol.* NRCC, Ottawa, 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. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B : 811-817.
- McMaster, M.E., Van Der Kraak, G.J., Portt, C.B., Munkittrick, K.R., Sibley, P.K., Smith, I.R., Dixon, D.G., 1991. Changes in hepatic mixed function oxygenase (MFO) activity, plasma steroid levels and age at maturity of a white sucker (*Catostomus commersoni*) population exposed to bleached kraft pulp mill effluent, *Aquat. Toxicol.* 21 : 199-218.
- Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat. Toxicol.* 48 : 549-559.
- 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 steroids and cortisol. *Cell Tiss. Res.* 188 : 1-9.
- Morcillo, Y., Porte, C., 1999. Evidence of endocrine disruption in the imposex-affected gastropod *Bolinus brandaris*. *Environ. Res.* 81 : 349-354.

- Morcillo, Y., Porte, C., 2000. Evidence of endocrine disruption in clams -*Ruditapes decussata*- transplanted to a tributyltin-polluted environment. *Environmental Pollution*. 107 : 47-52.
- Morcillo, Y., Porte, C., 1997. Interaction of tributyl and triphenyltin with microsomal monooxygenase system of molluscs and fish from the western Mediterranean. *Aquat. Toxicol.* 38 : 35-46.
- Morcillo, Y., Ronis, M.J.J., Porte, C., 1998. Effects of tributyltin on the phase I testosterone metabolism and steroid titres of the clam *Ruditapes decussata*. *Aquat. Toxicol.* 42 : 1-13.
- Munkittrick, K.R., McMaster, M.E., Portt, C.B., Van Der Kraak, G.J., Smith, I.R., Dixon, D.G., 1992. Changes in maturity, plasma sex steroid levels, hepatic mixed function oxygenase activity, and the presence of external lesions in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) exposed to beached kraft mill effluent. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 49 : 1560-1569.
- Oberdörster, E., McClellan-Green, P., 2000. The neuropeptide APGWamide induces imposex in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*. *Peptides* 21 : 1323-1330.
- Pazos, A.J., Mathieu, M., 1999. Effects of five natural gonadotropin-releasing hormones on cell suspensions of marine bivalve gonad: stimulation of gonial DNA synthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 113 : 112-120.
- Pelletier, É., Normandeau, C., 1997. Distribution of butyltin residues in mussels and sea stars of the St. Lawrence Estuary. *Environ. Technol.* 18 : 1203-1208.
- Peek, K., Gabbott, P.A., Runham, N.W., 1989. Adipogranular cells from the mantle tissue of *Mytilus edulis* L. II. Seasonal changes in the distribution of dispersed cells in a preformed Percoll density gradient. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 126 : 217-230.
- Peek, K., Gabott, P.A., 1990. Seasonal cycle of lysosomal enzyme activities in the mantle tissue and isolated cells from the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 104 : 403-412.
- Perreira, W.E., Wade, T.L., Hostettler F.D., Parchaso F., 1999. Accumulation of butyltins in sediments and lipid tissues of the asian clam, *Potamocorbula amurensis*, near Mare Island Naval Shipyard, San Francisco Bay. *Mar. Pollut. Bull.* 38 : 1005- 1010.
- Pipe, R.K., 1987a. Ultrastructure and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 96 : 519-528.
- Pipe, R.K., 1987b. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis* : an ultrastructural study. *Mar. Biol.* 96 : 405-414.

- Regoli, L., Chan, H.M., De Lafontaine, Y., Mikaelian, I., 2001. Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec city harbour area of the St. Lawrence River. *Aquat. Toxicol.* 53 : 115-126.
- Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 1990. Variation in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Comp. Biochem. Physiol.* 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.
- Ropes, J., Stickney, A.P., 1965. Reproductive cycle of *Mya arenaria* in New England. 128 : 315-327.
- Roseberry, L., Vincent, B., Lemaire, C., 1991. Croissance et reproduction de *Mya arenaria* dans la zone intertidale de l'estuaire du Saint-Laurent. *Can. J. Zool.* 69 : 724-732.
- Saint-Hilaire, N., 1997. Conséquences physiologiques d'une exposition chronique au tributyltin chez *Mya arenaria* (L.) et *Mytilus edulis* (L.). Mémoire de Maîtrise en Océanographie, Université du Québec à Rimouski, 95p.
- Saint-Louis, R., Gobeil, C., Pelletier, É., 1997. Le tributylétain et ses produits de dégradation dans l'estuaire du Saint-Laurent (Canada). *Environ. Technol.* 18 : 1209-1218.
- Spooner, N., Gibbs, P.E., Bryan, G.W., Goad, L.J., 1991. The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk *Nucella lapillus*, and the development of imposex. *Mar. Environ. Res.* 32 : 37-49.
- Siah, A., Pellerin, J., Benosman, A., Gagné, J.P., Amiard, J.C., 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132 (A) : 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). *Comp. Biochem. Physiol.* 135 (C) : 145-156.
- Singh, P.B., Singh, T.P., 1992. Impact of malathion and γ BHC on steroidogenesis in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Aquat. Toxicol.* 22 : 69-80.

- Sivarajah, K., Franklin, C.S., Williams, W.P., 1978. The effects of polychlorinated biphenyls on plasma steroid levels and hepatic microsomal enzymes in fish. *J. Fish Biol.* 13 : 401-409.
- Spies, R.B., Rice, D.W.J., Felton, J., 1988. Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder *Platichthys stellatus* in San Francisco Bay. I. Hepatic contamination and mixed-function oxidase (MFO) activity during the reproductive season *Mar. Biol.* 98 : 181-189.
- Tremblay, R., Pellerin-Massicotte, J., 1997. Effects of the tidal cycle on lysosomal membrane stability in the digestive gland of *Mya arenaria* and *Mytilus edulis* L. *Comp Biochem Physiol.* 117A(1) : 99-104.
- Tremblay, L., Van Der Kraak, G., 1999. Comparison between the effects of the phytosterol β -sisterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 : 329-336.
- Waxman, D.J., 1996. Steroid hormones and other physiologic regulators of liver cytochromes P450 : Metabolic reactions and regulatory pathways. *Adv. Mol. Cell Biol.* 14 : 341-374.

RESUME :

Les principaux objectifs de cette étude sont de mettre en évidence l'influence de la progestérone sur la gamétogenèse et d'étudier l'effet du tributylétain (TBT) sur le niveau des hormones sexuelles (progestérone, testostérone et 17β -estradiol) chez *Mya arenaria*. Après caractérisation de la progestérone dans la gonade chez *Mya arenaria*, un pic de cette hormone en relation avec la période de maturation sexuelle a été mesuré. Le délai de la maturation sexuelle constaté chez les myes de Rimouski semblerait être lié aux faibles niveaux de la progestérone mesurés chez ces organismes. La présence des perturbateurs endocriniens tels que le TBT et DBT dans la gonade de ces myes pourrait être la cause des teneurs faibles en progestérone. Les organismes exposés à une contamination nominale de 100 ng TBTCI/L renferment dans leur gonade 491 ng Sn (TBT)/g (poids sec) après deux mois d'exposition et 1031 ng Sn/g après trois mois d'exposition. Les niveaux de testostérone augmentent de 50% chez les femelles exposées à 10 et 100 ng TBTCI/L après un mois d'exposition suivi par une augmentation du niveau en 17β -oestradiol après trois mois d'exposition comparativement aux contrôles.

Mots Clés : *Mya arenaria*, Progestérone, Gamétogenèse, Tributylétains, Perturbateurs endocriniens, Hormones stéroïdes.

ABSTRACT :

The goals of this study were to examine the link between progesterone and gametogenesis and Tributyltin (TBT) effects on steroid hormones (progesterone, testosterone and 17β -estradiol) in *Mya arenaria*. Progesterone has been characterized in the gonad of *Mya arenaria* and for the first time the link has been established between the gametogenesis cycle and the level of progesterone in this species. The level of progesterone in the gonad of *Mya arenaria* from Rimouski was 12% of those of levels found in Anse à l'Original. Inhibition of synthesis of progesterone by the presence of endocrine disruptors as TBT and DBT in the Rimouski gonad clams may cause the delay in the sexual maturation. When *Mya arenaria* was exposed to 100 ng TBTCI/L we obtained an accumulation of 491 ng of TBT as Sn/g gonad dry weight for a period of two months and of 1031 ng TBT as Sn/g gonad dry weight after three months of exposure. Mesocosms experiments have shown an increase of testosterone by 50% in August followed by an increase of 17β -estradiol between September and October in female gonads exposed to 10 and 100 ng TBTCI/L in comparison to the controls.

Key words: *Mya arenaria*, Progestérone, Gamatogenesis, Tributyltins, Endocrine disruptors, Steroid hormones