



**LA VITELLOGENINE COMME BIOMARQUEUR D'EXPOSITION ET D'EFFET AUX
PERTURBATEURS ENDOCRINIENS CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM* ET *EURYTEMORA
AFFINIS* : DEVELOPPEMENT ET APPLICATION *IN SITU*.
VITELLOGENIN AS BIOMARKERS OF EXPOSURE AND IMPACT OF ENDOCRINE
DISRUPTORS IN *GAMMARUS FOSSARUM* AND *EURYTEMORA AFFINIS* :
DEVELOPMENT AND FIELD IMPLEMENTATION.**

Programme

Rapport final de contrat

C. Boulangé-Lecomte, A. Chaumot, C. Fonbonne, J. Forget-Leray, O.
Geffard, G. Jubeaux, H. Quéau, A. Salvador, R. Simon, B. Xuereb

Irstea UR MAEP

Olivier Geffard, Laboratoire
d'Ecotoxicologie, Irseta UR MAEP, 5,
rue de la Doua 69626 Villeurbanne
Cedex, France

Date : 15/01/2013

N° de contrat : 0006942

Date du contrat : 10/07/2009

Résumé :

En réponse à la Directive Cadre sur l'Eau, le présent projet a eu pour objectif de proposer des outils permettant de diagnostiquer la présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement en utilisant des crustacés comme espèces sentinelles, ceci dans l'objectif d'améliorer les démarches actuellement mises en place pour l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques. Plusieurs méthodes bio-analytiques et analytiques ont été abordées pour caractériser et quantifier la vitellogénine (Vtg) chez deux espèces i.e. *Gammarus fossarum* et *Eurytemora affinis*. Parmi ces méthodes, la quantification absolue par LC-MS/MS s'est montrée être une approche de choix. Elle est facile à développer, spécifique et peut être transférée et utilisée chez des espèces proches. Parallèlement, un anticorps anti-Vtg chez *E. affinis* a été développé et est aujourd'hui disponible pour la quantification de cette protéine. Ces travaux ont permis de valider/confirmer le rôle de cette protéine dans la reproduction de ces espèces, c'est à dire comme source d'énergie pour le développement embryonnaire.

Le croisement des diverses approches développées chez ces deux espèces a montré la difficulté de transférer une méthode d'une espèce à l'autre, notamment lorsqu'il s'agit d'une protéine comme la Vtg dont la séquence a varié énormément au cours de l'évolution. Dans ce contexte, c'est l'approche basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) qui s'est montrée la plus prometteuse dans le développement de méthodes transférables.

L'intérêt de cette protéine comme biomarqueur spécifique d'une exposition à des perturbateurs endocriniens a été étudié à l'aide d'exposition au laboratoire et sur le terrain. Au laboratoire et pour les deux espèces, les résultats ont montré que la production de cette protéine chez les mâles pouvait être modulé par la présence de contaminants. Cependant et en comparaison aux connaissances disponibles chez les vertébrés, de très faibles facteurs d'induction ont été obtenus.

Enfin, la dernière partie de ce travail, centrée sur le gammare, concernait l'utilisation de la mesure de la Vtg sur le terrain. Les résultats obtenus montrent l'impact de facteurs environnementaux, non identifiés, sur la teneur en Vtg chez les organismes mâles, rendant la sensibilité de la mesure faible. Peu d'inductions ont été observées chez les organismes exposés sur des sites contaminés, avec des facteurs d'induction très faibles. Contrastant avec les développements chez le poisson, ces travaux montrent la difficulté aujourd'hui de proposer la Vtg comme biomarqueur de perturbations endocriniennes chez les crustacés, soulignant la nécessité de revenir à une meilleure description et caractérisation des mécanismes et hormones impliqués dans la régulation endocrine de la reproduction chez ces espèces.

Abstract :

In Water Framework Directive context, this project aimed to provide tools allowing to assess endocrine disruptors exposure, using crustacean as sentinel species, in order to improve scientific schemes currently performed for assessing the biological quality of aquatic ecosystems. In this project, several bio-analytical and analytical methods were addressed to identify and to quantify vitellogenin (Vtg) in the two selected species, *Gammarus fossarum* and *Eurytemora affinis*. Among these approaches, absolute quantification by LC-MS/MS proved to be a robust, easy and accurate method. This method is easily developed and is a transferable method across species. In the same time, an anti-Vtg antibody has been developed in *E. affinis* and it is now available for the measurement of this protein. This study allowed to validate/confirm the role of this protein in the reproduction of these two species, i.e. as an energy sources for embryonic development. The use of developed methods in the two selected species showed the difficulty to propose one method easily transferable across species, in particular for proteins for which a high level of evolutionary divergence between phylogenetic groups, such as Vtg. In this context, mass spectrometry (LC-MS/MS) appeared to be the most promising approach to develop transferable methods. At last, the relevance of this protein as specific endocrine disruptor biomarkers was assessed using laboratory and field experiments. Laboratory results showed that Vtg production could be modulated by a contamination exposure in the two species. However and in comparison with observations made in vertebrates, the Vtg inductions observed in exposed organisms were very low with a maximal factor of 15. Finally, the last part of this study concerned the use of Vtg measurement for field survey. Our results showed that unknown environmental factors greatly influence the Vtg levels of male organisms and , leading to a

low robustness and sensitivity of the Vtg measurement and limiting its use as a tool for field monitoring. These observations were confirmed by our results obtained in our large-scale field study, since the high Vtg variability observed for reference stations highlights the significant inductions observed in only two of sixteen stations studied, with very low inductions. Therefore, these results show that it is difficult to propose Vtg measurement in *G. fossarum* as a specific endocrine disruptor biomarker, emphasizing the need to know mechanisms and hormones involved in the endocrine regulation of the reproduction in these two species.

1 – Objectifs du projet de recherche

En réponse à la Directive Cadre sur l'Eau, le présent projet a eu pour objectif de proposer des outils pour diagnostiquer la présence et l'impact de perturbateurs endocriniens (PE) dans les milieux aquatiques, ceci en utilisant les crustacés comme espèces sentinelles et dans l'objectif d'améliorer les démarches actuellement mises en place pour l'évaluation de la qualité de ces environnements. Ce projet se proposait de répondre à l'absence de biomarqueurs spécifiques d'une perturbation endocrinienne chez les invertébrés aquatiques notamment chez les crustacés.

Au cours de la dernière décennie, le nombre croissant de publications liées à la problématique des PE traduit une forte préoccupation scientifique quant à l'impact de ces composés dans les milieux aquatiques. Jusqu'ici, les travaux se sont principalement intéressés d'une part à la régulation hormonale en lien avec la reproduction des organismes, étant donné son rôle crucial dans le maintien des populations et d'autre part aux vertébrés aquatiques, notamment les poissons (Matthiessen, 2003; Langston *et al.*, 2005). Ces travaux ont conduit au développement d'outils de diagnostic pouvant être utilisés *in situ*, tels que l'induction de la vitellogénine (Vtg) chez les mâles et les juvéniles, l'inhibition de la croissance testiculaire, le retard dans la maturité sexuelle, la présence d'individus intersexués, la féminisation ou la masculinisation des caractères sexuels secondaires ou enfin la concentration anormale en hormones stéroïdiennes circulantes. En revanche et ceci bien qu'ils représentent la majorité des espèces animales et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques, peu voire pas d'outils sont actuellement disponibles chez les invertébrés et utilisables sur le terrain. Ce constat résulte en partie d'une mauvaise connaissance de leur système de régulation hormonale, d'une part liée au fait que l'on a affaire à des systèmes endocriniens très différents de ceux des vertébrés, notamment pour les crustacés et d'autre part que les espèces d'intérêt en écotoxicologie sont des espèces à cycle de vie court et par conséquent de petite taille, ce qui constitue un frein méthodologique fort à la mise en place d'étude d'endocrinologie.

Au même titre que les vertébrés et leurs « proches » cousins deutérostomiens (*e.g.* prochordés, échinodermes), les invertébrés protostomiens régulent leurs grandes fonctions physiologiques, telles que la croissance, la reproduction ou le développement, via des hormones de signalisation dont la régulation peut être modulée par la présence de contaminants (Mu and LeBlanc, 2004 ; Wang *et al.*, 2005). Cependant, étant donné la distance phylogénétique entre espèces et par conséquent les divergences existantes entre les systèmes endocriniens, les invertébrés protostomiens ne peuvent pas être simplement considérés comme des vertébrés par simple transposition des outils lorsqu'il s'agit de biomarqueurs dont la modulation est directement en lien avec des effets toxiques sur les systèmes hormonaux. Par conséquent, avant leur utilisation chez les invertébrés, les biomarqueurs disponibles chez les vertébrés doivent être confirmés et re-validés aussi bien par leur identification moléculaire que par leur interprétation en terme de fonction biologique.

Chez les crustacés, espèces retenues dans ce projet, la régulation hormonale de la reproduction repose sur des hormones ecdystéroïdiennes (hormone de mue) et sesquiterpénoïdes, connues sous le nom d'hormones juvéniles chez les insectes et de méthyl-farnésolate chez les crustacés (Verslycke *et al.*, 2007). Par conséquent, dans un objectif d'évaluation des risques de composés (REACH) et/ou de la qualité des milieux aquatiques (Directive Cadre sur l'eau), une classification ou priorisation de composés reconnus comme PE sur la base d'une évaluation portant sur les vertébrés semble peu généralisable et protectrice pour de nombreuses espèces d'invertébrés aquatiques et particulièrement les ecdysozoaires. Ceci montre et implique la nécessité de développer des outils de diagnostic (exposition et effet) spécifiques chez ces espèces.

Le projet proposé a eu pour but de développer, chez deux espèces de crustacé d'intérêt en écotoxicologie environnementale (une espèce d'eau douce *Gammarus fossarum* et une espèce estuarienne *Eurytemora affinis*), des outils de diagnostic permettant non seulement la détection de PE dans les milieux aquatiques mais également la caractérisation de leurs effets, en lien avec la reproduction. Pour cela, la mesure de la Vtg a été développée chez ces deux espèces par une double approche (dosage des transcrits et des protéines) et des méthodologies analytiques performantes. En vue d'une utilisation sur le terrain, l'impact des facteurs abiotiques (facteurs de confusion) sur la réponse de ce biomarqueur a été déterminé. Enfin, sur le plan technique, ces travaux ont également eu pour but d'initier une réflexion sur l'intérêt de l'utilisation de méthodes analytiques de type

chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour le développement de biomarqueurs protéiques applicables entre espèces.

2 – Eléments méthodologiques mis en place dans ce projet

Le projet a été structuré en trois étapes, allant du développement méthodologique pour la mesure de la Vtg jusqu'à son utilisation dans le milieu comme indicateur d'une contamination par des PE. L'objectif de cette partie du rapport est de faire le point sur les méthodes et démarches mises en place pour répondre aux questions scientifiques posées.

2.1 Etape 1 : développement de la mesure de la Vtg

Cette première étape du projet a traité deux grandes questions scientifiques, 1 – développement de méthodes bio-analytiques et analytiques pour l'identification et la quantification de la Vtg chez les deux espèces de crustacé retenues, 2 – étudier la généralisation (transfert d'une espèce à l'autre) de ces méthodes.

2.1.1 Développements méthodologiques :

Plusieurs approches ont été proposées pour identifier et quantifier la Vtg, via le transcrit et la production de protéines.

2.1.1.1 *Gammarus fossarum*.

Au démarrage du projet, la mesure de l'expression du gène codant pour la Vtg était disponible chez cette espèce (Xuereb *et al.*, 2011). Pour cette première phase du projet, les travaux se sont focalisés sur le développement et la validation de la mesure de la Vtg par LC-MS/MS. Dans le but d'augmenter le nombre de peptides protéotypiques à tester, la séquence de 593 pb initialement disponible chez *G. fossarum* (GU985184) a été amplifiée par RACE-PCR. Une séquence de 816 pb a ainsi pu être identifiée *in fine*. Cette approche a permis un design *in silico* de peptides à partir d'une séquence de 271 acides aminés contre 197 initialement. Afin d'identifier quels peptides peuvent être utilisés comme rapporteurs pour la mesure de cette protéine par LC/MS-MS, les étapes suivantes ont été réalisées :

- Identification des peptides protéotypiques détectés chez le gammare (sur des gonades et organismes femelles entiers)
- Sélection des peptides rapporteurs les plus sensibles d'un point de vue analytique
- Développement d'une méthode de quantification absolue, via un peptide marqué
- enfin, validation de la fonction physiologique de ce peptide rapporteur de la Vtg, en décrivant son profil chez les mâles, les femelles au cours du cycle de reproduction et les embryons au cours de leur développement. Ces données ont été mises en regard des connaissances acquises sur la reproduction de cette espèce (Geffard *et al.*, 2010)

2.1.1.2 *Eurytemora affinis*.

Le travail préliminaire au développement des méthodes bio-analytiques pour l'identification et la quantification de la Vtg a consisté à (1) déterminer les conditions optimales de stabulation des copépodes, (2) développer la culture d'algues au laboratoire afin de permettre le nourrissage des individus et (3) caractériser le cycle de reproduction d'*E. affinis*.

Aucune méthode transcriptomique ou protéique n'étant disponible chez cette espèce, ces deux approches ont été développées dans le cadre de ce projet. Le développement d'une méthode transcriptomique a nécessité dans un premier temps le clonage du cDNA codant pour la Vtg chez l'espèce considérée, par RT-PCR dégénérée et RACE-PCR après alignement des séquences de Vtg de copépodes disponibles dans les banques de données (GenBank). La caractérisation de la Vtg chez *E. affinis* a permis dans un second temps de mettre au point le dosage des transcrits Vtg par RT-PCR quantitative en temps réel. Les niveaux d'expression ont été calculés selon la méthode de quantification absolue, le manque de connaissance du transcriptome d'*E. affinis* ne permettant pas de disposer d'un nombre suffisant de gènes de référence pour permettre une analyse relative. Afin de déterminer les niveaux de base de l'expression de la Vtg, le dosage des transcrits a été réalisé chez le mâle et la femelle à différents stades du cycle de reproduction.

Pour la mesure protéique, deux approches ont été testées et mises en place *i.e.* (1) l'utilisation d'anticorps anti-Vtg et (2) l'utilisation de la LC/MS-MS. Actuellement, il n'existe pas d'anticorps

spécifique pour la Vtg de cette espèce. Cette partie du travail a consisté à faire un bilan des anticorps disponibles (dans la littérature et/ou chez les fabricants) et de tester leur utilisation pour identifier et quantifier la Vtg. Six anticorps - 5 anticorps gracieusement fournis par S. Tuberty (Appalachian State University, Etats-Unis) et DC Volz (Syngenta Crop Protection Inc., Etats-Unis) et un anticorps commercialisé (Cusabio) - spécifiques de vitellines de crustacés (décapodes ou amphipode) et d'insecte ont ainsi été testés en Western blot ou ELISA (**Tableau 1**). Aucun des anticorps testés n'a permis de détecter spécifiquement la Vtg chez *E. affinis*. A l'issue de ce screening, la séquence nucléique ayant été identifiée, la stratégie adoptée a consisté à produire un anticorps polyclonal à façon chez le lapin après immunisation de l'animal pendant 60 jours par un peptide de synthèse caractérisé à partir de la séquence protéique déduite (Millegen).

Tableau 1 : liste des anticorps testés pour la détection de la Vtg chez *E. affinis*. Six anticorps spécifiques de vitellines de crustacés (décapodes ou amphipodes) et d'insectes ont été testés en Western blot ou ELISA (1 à 6). Un anticorps spécifique de la Vtg d'*E. affinis* a été produit à façon (7).

anticorps			technique
espèce	subphylum/ordre	source	
① <i>Palaemonetes pugio</i>			Western blot
② <i>Rithropanopeus harrisi</i>	crustacé	Tuberty <i>et al.</i> , 2002	
③ <i>Uca panacea</i>	décapode		
④ <i>Lepidophthalmus louisianensis</i>			
⑤ <i>Leptocheirus plumulosus</i>	crustacé amphipode	Volz and Chandler, 2004	
⑥ <i>Nasonia vitripennis</i>	hexapode hyménoptère	CUSABIO CSB-E11629i	ELISA
⑦ <i>Eurytemora affinis</i>	crustacé copépode	Production à façon Millegen	Western blot ELISA

2.1.2 Généralisation des méthodes :

La question de la « transférabilité » des méthodes d'une espèce à l'autre est une question cruciale en écotoxicologie aquatique puisqu'elle constitue un des verrous forts dans l'utilisation des biomarqueurs en monitoring. Cette limite est d'autant plus forte pour des biomarqueurs comme la Vtg dont la structure (séquence génomique et protéique) a énormément divergé au cours de l'évolution. Dans cette partie du travail, l'étude de l'utilisation généralisée des méthodes de mesure de la Vtg s'est faite à différentes échelles.

Dans un premier temps et une fois les différentes approches développées pour une des deux espèces (RT-PCR et LC/MS-MS chez *G. fossarum* et anticorps chez *E. affinis*), nous avons cherché à savoir si elle permettait d'identifier et quantifier la Vtg chez la seconde espèce retenue. Pour ceci ; 1 - les amorces permettant la mesure de l'expression du gène Vtg chez *G. fossarum* ont été testées chez *E. affinis*, 2 - les anticorps testés pour identifier la Vtg chez *E. affinis* par Western blot ont également été testés chez *G. fossarum* et enfin 3 - les peptides rapporteurs définis chez *G. fossarum* à partir de la séquence protéique, ont été recherchés chez *E. affinis*.

Dans un second temps, nous avons plus particulièrement développé cette question de « transférabilité » autour de l'approche protéique par LC/MS-MS et ceci pour plusieurs raisons ; 1 – en comparaison à la mesure de l'expression de gènes par RT-PCR qui est lourde à mettre en place et par conséquent difficilement envisageable comme outil de biomonitoring, l'utilisation de la LC/MS-MS se montre une approche plus prometteuse et permet la quantification de marqueurs (protéines) intégrant les voies de signalisation amont et pouvant être directement liés aux effets individuels (effets sur la reproduction), 2 – contrairement aux approches anticorps, la LC/MS-MS est une méthode spécifique, enfin 3 – la LC/MS-MS permet la quantification d'une protéine d'intérêt en se basant sur l'utilisation d'un ou plusieurs peptides rapporteurs, par conséquent la mise en place d'une stratégie de sélection de ces peptides en se focalisant sur les fractions de séquence peptidique les plus conservées au cours de l'évolution doit permettre le développement de méthodes généralistes. Pour ceci, nos travaux ont été structurés en deux sous-questions :

- la généralisation de la démarche est elle possible pour un grand nombre d'espèces ? Chez les espèces d'invertébré dont une séquence de Vtg est connue, l'utilisation de la LC/MS-MS permet elle une identification rapide et fiable de peptides rapporteurs de cette protéine ? Pour ceci et à partir des banques de séquences disponibles, nous avons identifié et validé la spécificité de peptides rapporteurs de la Vtg pour des espèces représentatives de divers groupes phylogénétiques (bivalve, gastéropode, crustacé et insecte).
- La méthode développée à partir d'une espèce séquencée, permet-elle d'identifier spécifiquement la Vtg chez des espèces non séquencées ? Pour chaque groupe d'espèces utilisé précédemment, nous avons étudié si les peptides identifiés à l'aide d'une espèce dont une séquence de Vtg est connue (*i.e. Daphnia magna*) sont retrouvés chez des espèces plus ou moins proches (*D. pulex* et *Ceriodaphnia dubia*) et non séquencées.

2.2 Etape 2 : validation de la Vtg comme marqueur d'une exposition à des PE.

Cette deuxième étape du projet a eu pour objectif de valider la mesure de la Vtg comme biomarqueur d'exposition aux PE chez les deux espèces retenues.

2.2.1 Récupération des organismes et stabulation

2.2.1.1 *Gammarus fossarum*.

Les organismes utilisés dans ce projet proviennent d'un site sur la partie amont de la rivière Bourbre (Isère, France), situé à La Tour du Pin (longitude:05°27'34"E, latitude: 45°27'34"N). Ce site est clas sé de bonne qualité et héberge une importante population de gammares, exclusivement de l'espèce *G. fossarum*. Les organismes ont été prélevés à l'aide d'un troubleau, tamisés sur site entre des tamis de maille de 2 et 2.5 mm et ramenés au laboratoire dans de l'eau de la rivière. Une fois au laboratoire, les organismes ont été répartis dans des aquariums de 30 L maintenus à une température de $12 \pm 1^\circ\text{C}$ et contenant de l'eau du site. Cette eau a été remplacée aux gouttes à gouttes par un mélange d'eau de forage et d'eau osmosée à un pH entre 7.4 et 7.8 et une conductivité de $600 \pm 50 \mu\text{S/cm}$ correspondant au pH et à la conductivité du site de prélèvement. Un bullage dans chaque aquarium permet de maintenir un taux d'oxygénation à saturation. La photopériode a été fixée à 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Les gammares ont été acclimatés au moins 15 jours au laboratoire avant toute expérimentation. Durant cette période, ils ont été alimentés *ad libitum* avec des feuilles d'aune (*Alnus glutinosa*) récoltées en automne dans une région peu anthropisée. Des tubificidae déshydratés ont également été distribués deux fois par semaine comme complément alimentaire.

2.2.1.2 *Eurytemora affinis*.

Préalablement au développement des méthodes de dosage de la Vtg, il a été indispensable de (1) déterminer les conditions optimales de stabulation des copépodes, (2) développer la culture d'algues au laboratoire afin de permettre le nourrissage des individus, (3) caractériser le cycle de reproduction d'*E. affinis* (figure 1). Pour chaque expérimentation, les organismes sont prélevés dans l'estuaire de Seine à proximité du Pont de Tancarville (longitude : 0°15'52"E, latitude : 49°29'19"N) à l'aide d'un filet (200 μm) puis conservés dans de l'eau de Seine pendant le transport jusqu'au laboratoire, réalisé le plus rapidement possible dans des glacières afin de limiter les variations de températures. Une fois au laboratoire, les copépodes sont répartis dans des aquariums de 40 L maintenus à une température de $15 \pm 1^\circ\text{C}$ contenant de l'eau saumâtre artificielle de salinité 15 (mélange d'eau de mer traitée aux UV puis filtrée et d'eau déionisée). Un bullage dans chaque aquarium permet de maintenir un taux d'oxygénation à saturation. La photopériode est fixée à 12 heures de jour et 12 heures de nuit (figure 1A). Les organismes sont acclimatés au moins 7 jours au laboratoire avant toute expérimentation. Ils sont alimentés tous les 2 jours avec des algues de l'espèce *Rhodomonas marina* à raison de 20 000 cellules.ml⁻¹. Les cultures d'algues sont réalisées au laboratoire en conditions semi-stériles à 20°C dans des aquariums de 10 L sous illumination fluorescente continue dans un milieu de type Conway (figure 1B). Après observation des copépodes à la loupe binoculaire, 1 seul stade adulte a été identifié chez le mâle (figure 1C) alors que 4 stades de reproduction ont été définis chez la femelle (figure 1D)

: femelles à gonades vides (immature, stade 1), femelles à gonades mi-pleines (immature, stade 2), femelles à gonades pleines (mature, stade 3) et femelles ovigères à gonades vides (ponte, stade 4).

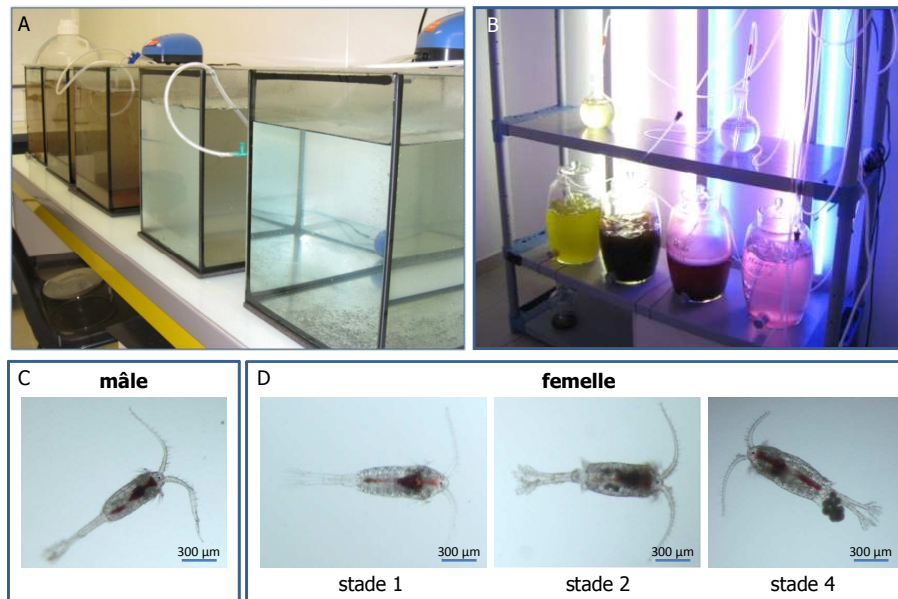


Figure 1 : Pré-requis indispensables à la mise au point des analyses moléculaires chez le copépode *E. affinis*. (A) Détermination des conditions optimales d'élevage des copépodes en laboratoire. (B) Mise en place de la culture d'algues en conditions semi-stériles pour le nourrissage des copépodes. (C & D) Identification de stades de reproduction chez *E. affinis*. Un seul stade adulte a été déterminé chez le mâle alors que 4 stades ont été identifiés chez la femelle (D) dont 3 ont été illustrés ci-dessus : stade 1 (immature, gonades vides), stade 2 (immature, gonades mi-pleines), stade 4 (ovigères à gonades vides).

2.2.2 Exposition à des molécules modèles

2.2.2.1 *Gammarus fossarum*.

Aujourd'hui, une des limites pour le développement de biomarqueurs moléculaires spécifiques d'une perturbation endocrinienne chez les organismes mâles est le choix de molécules modèles à utiliser pour valider ces biomarqueurs. Par conséquent, dans ce projet, nous avons choisi de tester plusieurs familles de composés (**Tableau 2**), (1) des hormones de crustacés, la 20-hydroxyecdysone et le méthyl-farnésoate, pour lesquelles des données sont disponibles uniquement chez les femelles, (2) des composés pharmaceutiques comme l'anti-cancéreux (le cyprotérone), l'anti-épileptique (la Carbamazépine), l'anti-UV (benzophénone) couramment détectés et quantifiés dans les rejets de stations d'épurations et pour lesquels une demande forte d'informations sur leur impact chez les invertébrés existe (Ferrari *et al.*, 2003 ; Fent *et al.* 2006) et (3) des pesticides avec le méthoxyfénozide, interagissant avec le récepteur EcR-USP chez les insectes et le propiconazole, un fongicide azolé, largement utilisé en agriculture et qui inhibe l'expression du gène codant pour le Vtg chez *D. magna* (Soetaert *et al.*, 2006).

Les expositions ont été réalisées selon la méthode décrite par Geffard *et al.* (2010). Succinctement, pour chaque condition 3 réplicats de 7 couples d'organismes ont été placés dans un bain marie à 12°C et maintenus pendant 21 jours avec de la nourriture *ad libitum* (feuille d'aulne). Les expositions ont été réalisées en semi-statique avec un renouvellement des milieux tous les jours. Pour chaque composé, les solutions mères ont été préparées dans un solvant (acétone). Pour chaque condition la concentration en acétone est de 1/20000. Des contrôles avec et sans acétone ont été réalisés.

Tableau 2 : Liste des molécules testées chez *Gammarus fossarum*.

20-hydroxyecdysone	Hormone
méthyl-farnésoate	hormone
Propiconazole	Fongicide
Méthoxyfénozide	Insecticide

Carbamazépine
Cyprotérone
Benzophénone

Médicament anti-épileptique
Médicament anti-cancéreux
Substance industrielle

Suite aux expositions, les organismes (mâles et femelles) ont été récupérés, sexés, pesés et stockés individuellement à -80°C en attendant la mesure de Vtg. Pour chaque condition, la mesure de la Vtg a été réalisée sur 10 organismes. Les teneurs en Vtg ont été déterminées chez les femelles exposées uniquement à la 20-hydroxyecdysone et au méthyl-farnesoate, alors que la teneur en Vtg a été déterminée chez les mâles exposés à l'ensemble des contaminants testés.

2.2.2.2 *Eurytemora affinis*.

Après stabulation pendant 7 jours en laboratoire, les individus, nourris quotidiennement (*Rhodomonas marina*), ont été exposés pendant 24 à 96h en condition semi-statique avec renouvellement quotidien du milieu sous oxygénation. A l'issue de l'exposition, les individus mâles ont été triés à la loupe binoculaire (20 copépodes par réplicat, 3 réplicats), congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C en vue des analyses moléculaires ultérieures. Les molécules retenues pour cette exposition à court terme (24 à 96h) étaient le méthylfarnesoate (MF) en raison de sa fonction clef dans la régulation hormonale de nombreux aspects du développement, de la croissance et la reproduction et le 4-nonylphénol (4-NP) pour ses propriétés estrogénomimétiques. Les composés ont été solubilisés dans l'acétone avant d'être dilués dans les milieux d'exposition selon 3 concentrations pour le MF (*i.e.* 0,01, 1 et 100 $\mu\text{g/L}$) et 2 concentrations pour le 4-NP (*i.e.* 1 et 5 $\mu\text{g/L}$). Pour chaque condition, la concentration en acétone était de 1/10000^e. Un contrôle avec acétone a été réalisé. Du fait du nombre limité d'individus exposés, seuls les niveaux de transcrits ont été déterminés par RT-PCR quantitative chez les mâles.

2.2.3 Mesure de la Vtg

2.2.3.1 par LC/MS-MS.

La méthode de quantification par LC-MS/MS est basée sur le dosage de peptides spécifiques de la protéine étudiée (de 6 à 20 acides aminés), obtenus après digestion enzymatique des protéines par la trypsine, produisant des clivages peptidiques spécifiques et prédictibles. Dans ce contexte, à partir d'une séquence génomique partielle (593 pb) codant pour la Vtg chez *Gammarus fossarum* (numéro d'accès : GU985184), on a pu prédire les peptides protéotypiques que l'on obtiendrait après digestion de la Vtg chez le gammare. Ces peptides prédits « *in silico* » ont été recherchés par LC-MS/MS chez le mâle et la femelle à différents stades de maturation ovocytaire et ceci à partir de gonades et d'organismes entiers. Les peptides détectés ont été triés en fonction de leur spécificité vis-à-vis de la Vtg à l'aide de corrélations inter-peptides au cours de la maturation ovocytaire et de leur sensibilité analytique (détection en faible quantité chez le mâle). Ces travaux nous ont permis de sélectionner le meilleur candidat pour développer une méthode de quantification absolue : le peptide ILIPGVGK. Plusieurs paramètres de la méthode de quantification que nous proposons (Simon *et al.*, 2010) ont été optimisés : broyage des organismes, dé-lipidation des échantillons, digestion enzymatique des protéines (notamment le temps de digestion), conditions de séparation des peptides par chromatographie liquide, quantification du peptide d'intérêt par spectrométrie de masse (notamment la linéarité entre le peptide natif et son étalon marqué ILIPGV*GK utilisé pour quantifier). Pour la quantification chez le mâle, une étape de concentration sur phase solide d'extraction (SPE) a été mise au point pour augmenter la sensibilité analytique de la mesure.

Concernant le développement de la méthode de quantification de la Vtg chez *Eurytemora affinis*, la même approche a été utilisée : prédiction « *in silico* » des peptides tryptiques potentiels à partir de la séquence génomique partielle (3994 pb) codant pour la Vtg chez *Eurytemora affinis*, recherche de ces peptides chez des organismes femelles et corrélations inter-peptide chez différents organismes afin de s'assurer de la spécificité des peptides identifiés. Ainsi, 22 peptides ont pu être détectés. Parmi ces peptides, 14 présentaient une bonne corrélation entre eux après analyse de 13 pools d'organismes. Aucun de ces peptides n'a été détecté chez les mâles. Afin d'optimiser la méthode et de permettre un dosage de la Vtg chez cette espèce, le peptide donnant le meilleur signal a été synthétisé avec un marquage par des isotopes stables (^{13}C , ^{15}N). Ce peptide a pour séquence EEFSPLR.

Pour la partie de l'étude concernant la généralisation et le transfert de l'approche LC/MS-MS chez d'autres espèces, le travail consistait à rechercher et identifier, à partir des peptides obtenus *in silico* à l'aide des séquences disponibles, les peptides rapporteurs de la Vtg. Afin de pouvoir attribuer ces peptides à la fonction de la Vtg (réserve énergétique de l'oeuf), dans tous les cas, nous avons comparé les profils peptidiques obtenus chez des organismes femelles et mâles.

2.2.3.2 par RT-PCR.

Afin de déterminer les niveaux de base de l'expression de la Vtg, le dosage des transcrits a été réalisé chez le mâle et chez la femelle à différents stades du cycle de reproduction. Pour cela, les copépodes ont été triés sous loupe binoculaire selon leurs caractères sexuels secondaires. Des pools de 15 à 50 individus triés sous loupe binoculaire ont été systématiquement réalisés en triplicats. Les ARN ont été extraits, rétro-transcrits et les cDNA Vtg ont été amplifiés par PCR quantitative en temps réel (Rotor-Gene Q 2-plex HRM, Qiagen) grâce à des amorces spécifiques dessinées à l'aide d'un logiciel approprié (« Universal Probe Library », Roche Diagnostics). Les taux de transcrits ont été déterminés par quantification absolue grâce à l'établissement d'une courbe étalon (fragment de cDNA Vtg à différentes concentrations connues amplifié à l'aide d'une polymérase haute-fidélité).

2.2.3.3 par Western blot et ELISA.

Les analyses protéiques ont été réalisées dans un premier temps sur des pools de copépodes (tout stade et sexe confondus ; 200 mg) puis dans un second temps, sur des échantillons d'individus mâles et de femelles ovigères triés sous loupe binoculaire (western blot, n=250 ; ELISA, n=70). Les protéines ont été extraites dans un tampon de lyse contenant des antiprotéases par broyage/homogénéisation dans des tubes à billes de céramique (diamètre : 2,8 mm) sous agitation (5 000 rpm, 3 fois 10 sec ; Precellys) puis dosées par la méthode de Bradford.

Le Western blot était réalisé après séparation des protéines totales sur gel d'acrylamide 10% alors que la méthode de quantification par ELISA choisie était indirecte et non compétitive. Les anticorps polyclonaux de lapin testés ont été répertoriés dans le tableau 1. Ils étaient (1) dirigés contre des vitellines de crustacé (décapodes et amphipode) et d'insecte ou (2) produits à façon à partir d'un peptide de synthèse déduit de la séquence Vtg d'*E. affinis*. L'anticorps secondaire utilisé était un anticorps anti-immunoglobuline de lapin couplé à la peroxydase du Raifort.

La détection du signal généré après ajout d'un substrat spécifique (Western blot : ECLplus, Amersham ; ELISA : TMB, Sigma-Aldrich) a été effectuée à l'aide soit d'un système d'imagerie (ChemiDoc XRS, BioRad ; Western blot) soit d'un spectrophotomètre (Infinite M200, TECAN ; ELISA).

2.3 Etape 3 : Application terrain

Cette dernière partie du projet concerne l'utilisation de la mesure de la Vtg comme outil de monitoring. Comme pour tous les biomarqueurs, leur but est de pouvoir identifier la présence et éventuellement l'impact des contaminants dans les milieux. Pour ceci, une des contraintes fortes est que la modulation du biomarqueur soit uniquement le résultat d'une exposition à des contaminants et non pas de l'impact de facteurs de confusion, tels que la température ou les paramètres physico-chimiques (pH, dureté, etc...) du milieu. De nombreuses publications ont montré que la réponse des biomarqueurs peut être influencée par des variables environnementales autres que la contamination (Cailleaud *et al.*, 2007; Geffard *et al.*, 2007 ; Xuereb *et al.*, 2009 ; Lacaze *et al.*, 2011). Ainsi et dans un objectif de les utiliser sur le terrain, il est indispensable de décrire et de caractériser la variabilité naturelle de ces outils, pour une interprétation fiable de leur niveau de réponse.

Cette partie du travail a été réalisée sur le gammare pour lequel le laboratoire d'écotoxicologie de Irstea dispose à l'heure actuelle d'une expérience solide dans son utilisation sur le milieu (transplantation d'organismes). Les travaux ont été organisés pour répondre à deux questions :

- Quelle est la variabilité naturelle (spatiale et temporelle) de la Vtg chez les mâles, utilisés comme organisme test lors des expérimentations de terrain (encagement) pour le diagnostic de la qualité des milieux ?
- Peut-on observer des inductions de Vtg chez des organismes exposés à des milieux soumis à une pression toxique d'origine anthropique ?

Pour répondre à ces questions, deux études de terrain ont été menées. La première a consisté à exposer des gammars mâles durant 21 jours sur deux stations de référence en tête de bassin de l'Ardière (69) et de la Bourbre (38). Ces deux stations ont fait l'objet de plusieurs études dans notre laboratoire et ont été utilisées à de nombreuses reprises pour évaluer la variabilité saisonnière de plusieurs biomarqueurs (Xuereb *et al.*, 2009 ; Lacaze *et al.*, 2011b). Ces deux stations se caractérisent par des variations saisonnières de température similaires, en revanche, l'une est très faiblement calcique (Ardière) et l'autre fortement (Bourbre). Quatre séries d'expérimentation ont été menées, au printemps, en été, en automne et en hiver.

La seconde étude avait pour objectif d'évaluer la sensibilité de la mesure de Vtg comme biomarqueur de perturbations endocriniennes sur le terrain. Pour ceci, nous avons bénéficié d'une étude menée sur les niveaux de contamination de 30 sites de la région Rhône-Alpes (Besse *et al.*, 2013). Dans cette étude, des valeurs seuils (au-dessus desquelles la concentration dans le gammare révèle une contamination biodisponible dans le milieu) ont été définies pour sept métaux et vingt-neuf composés organiques. A partir de ces valeurs seuils, nous avons défini une station comme référence lorsque sur les 36 composés recherchés, aucun ne dépassait la valeur seuil. Ainsi, nous avons constitué un jeu de sites, avec 5 sites de référence et 16 sites présentant une contamination biodisponible plus ou moins marquée. L'ensemble de ces sites est réparti sur les divers bassins versants de la région et par conséquent ils sont caractérisés par des températures et paramètres physico-chimiques très divers. Sur chacun de ces sites, des organismes mâles (taille homogène) ont été exposés pour une durée de 21 jours et nourris *ad libitum* à l'aide de feuilles d'aulne. A la suite de l'exposition, les organismes ont été récupérés, ramenés au laboratoire et les taux de survie ont été déterminés. Pour chaque site, 15 individus ont été pesés et stockés individuellement à -80°C en attendant la mesure de la Vtg. Etant donné le nombre de sites étudiés pour la partie terrain de ce projet, il a été choisi de mesurer la Vtg uniquement par LC/MS-MS. La mesure de l'expression de gène n'était pas envisageable, aussi bien en terme de temps d'analyse, qu'en terme de coût.

3 – Difficultés scientifiques rencontrées

Plusieurs contre-temps ont eu lieu au cours de la première phase du projet, se traduisant par du retard dans nos travaux, bien que faibles par rapport à la programmation que l'on avait indiquée dans le projet. Ces contre-temps sont l'incendie du laboratoire d'analyse d'A. Salvador, l'arrêt maladie de G. Jubeaux (thèse Cemagref) pendant 4 mois et le congé de maternité de C. Boulangé-Lecomte. Sur le plan technique, l'équipe du Havre s'est confrontée à des problèmes de contamination bactérienne de leurs élevages d'*E. affinis*.

4 – Résultats obtenus

4.1. Etape 1 : Développement de la mesure de la Vtg

4.1.1 Chez *G. fossarum* par LC/MS-MS

4.1.1.1 Développement analytique

A partir de la séquence partielle codant pour la Vtg et disponible sur Genbank pour *Gammarus pulex*, une séquence partielle de la Vtg chez *G. fossarum* a été identifiée et décrite (genbank accession number : GU985184). A l'aide de cette séquence génomique, une séquence protéique a été traduite et utilisée pour prédire *in silico* les peptides protéotypiques susceptibles d'être rapporteurs de cette protéine d'intérêt. Huit peptides protéotypiques ont été détectés avec une bonne sensibilité (Simon *et al.*, 2010). Sur ces 8 peptides candidats, 7 se sont montrés spécifiques avec de très bonnes corrélations entre eux quelle que soit la concentration en Vtg dans l'échantillon. Enfin et parmi ces différents candidats, un peptide spécifique et présentant la plus forte sensibilité analytique (ILIPGVGK) a été sélectionné comme rapporteur pour la mesure de la Vtg.

4.1.1.2 Validation de la fonction de cette protéine

La validation de la fonction physiologique de cette protéine d'intérêt, via la quantification du peptide rapporteur ILIPGVGK, a été réalisée en mettant en regard l'évolution de la surface des ovocytes (traduisant l'ovogenèse ; Geffard *et al.*, 2010) et les teneurs en peptides rapporteurs au cours du

cycle de reproduction de la femelle (**Figure 2**). Ces résultats montrent que la protéine, tracée à l'aide du peptide rapporteur, est fortement impliquée dans la fonction de reproduction et plus particulièrement dans la maturation des ovocytes ($R^2 = 0.98$). De plus, nous avons pu observer que le peptide est fortement présent chez la femelle alors qu'il est à des concentrations extrêmement faibles chez le mâle (résultats non présentés).

Cette fonction dans la reproduction (source de réserves) a été confirmée par les observations faites sur les embryons au cours de leur développement (**Figure 2**), puisque les résultats montrent clairement une diminution rapide de cette protéine au cours de l'embryogenèse. Ces résultats valident d'une part l'utilisation du peptide ILIPGVGK pour la mesure et la quantification absolue de la Vtg chez *G. fossarum* et d'autre part la fonction de cette protéine comme source de réserve pour le développement des embryons.

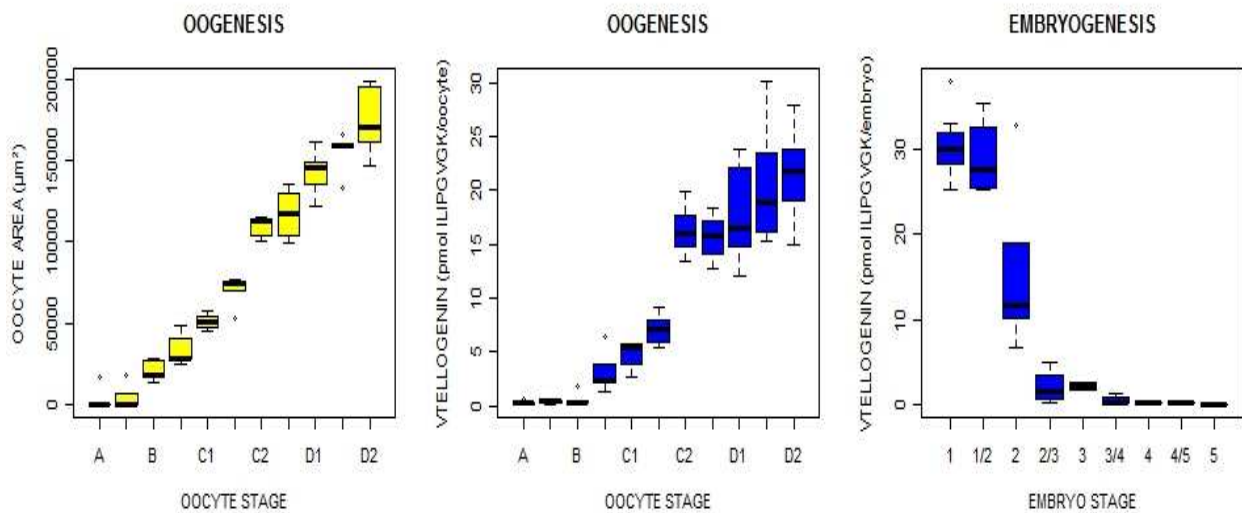


Figure 2 : Evolution de la surface ovocytaire exprimée en μm^2 par ovocyte (boîtes à moustache jaunes, $n=5$ femelles / stade de mue) et de la quantité de vitellogénine exprimée en pmole de peptide ILIPGVGK par ovocyte (boîtes à moustache bleues, $n=5$ femelles / stade de mue) pendant l'ovogenèse et l'embryogenèse

4.1.1.3 Exposition à des composés modèles chez les femelles

Des femelles ont été exposées au laboratoire à deux composés modèles (cf. section 2.2.2.1), la 20-hydroxyecdysone et le méthyl-farnesoate (de 10 ng/L à 100 $\mu\text{g/L}$) pendant 21 jours. Les résultats sont présentés dans la Figure 3. Ces résultats montrent que la 20-hydroxyecdysone n'impacte pas la production de Vtg et son accumulation dans les ovocytes au cours de la vitellogénèse et donc ne semble pas avoir de rôle clef dans ce processus physiologique chez cette espèce. Cependant, plusieurs études ont précédemment montré qu'il existait une corrélation positive entre les teneurs en 20-hydroxyecdysone et en Vtg au cours de la maturation des ovocytes chez les isopodes (Suzuki *et al.*, 1996) et les décapodes (Jayasankar *et al.*, 2002). De la même façon, chez le homard, Tiu *et al.* (2010) ont montré que le 20-hydroxyecdysone seul ou en combinaison avec le méthylfarnesoate stimule la production de Vtg chez la femelle. A l'inverse, Hannas *et al.* (2011) ont mis en évidence que ce composé, ainsi que ses mimétiques, inhibent l'expression du gène codant pour la Vtg. Ces résultats montrent une nouvelle fois que la régulation endocrinienne, notamment de la reproduction, chez les crustacés est très mal connue.

Concernant le méthylfarnesoate, plusieurs études ont montré que ce composé stimule plusieurs processus comme la gamétogénèse chez le mâle et la vitellogénèse (Laufer and Biccferst, 2001 ; Nagaraju *et al.*, 2003). Nos résultats, à l'inverse, montrent que chez *G. fossarum* le méthylfarnesoate inhibe significativement la production de Vtg, conduisant à des femelles avec des ovocytes plus petits que ceux observés pour les organismes témoins. Cependant, étant donné que la vitellogénèse est très fortement corrélée au cycle de mue (Geffard *et al.*, 2011), une interprétation fiable de ces inhibitions ne peut se faire sans l'examen des stades de mue des femelles étudiées. Or, aucun retard de la mue n'a été observé chez les femelles exposées, ceci confirmant que le méthylfarnesoate inhibe de façon spécifique la production de la Vtg et son accumulation dans les

ovocytes. Des observations similaires à celles obtenues dans notre étude ont été faites par Mak *et al.*, 2005 chez le crabe *Charybdis feriatus*. Ces travaux ont été publiés dans Jubeaux *et al.*, 2012a

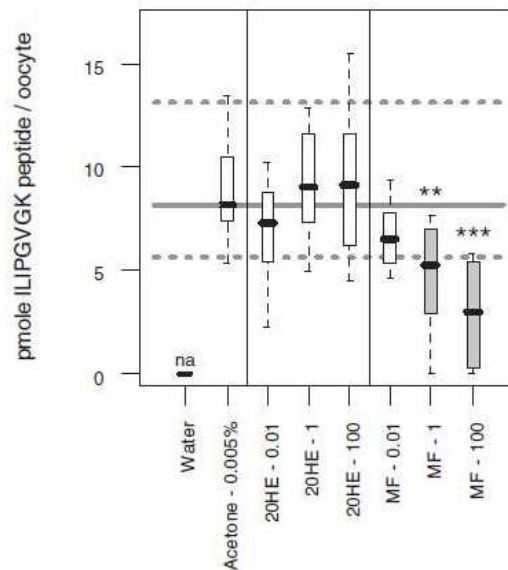


Figure 3 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole du peptide ILIPGVGK par ovocyte) chez des femelles *G. fossarum* suite à leur exposition au 20-hydroxyecdysone (20-EH : 0.01, 1 et 100 µg/L) et au méthyl-farnesoate (MF : 0.01, 1 et 100 µg/L). Water : contrôle (non disponible) ; solvant : contrôle avec solvant à 0.005%. La boîte à moustache représente le premier et troisième quartile avec la médiane. ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$.

4.1.2 Chez *E. affinis*

4.1.2.1 Approche par la RT-PCR

L'approche par RT-PCR a nécessité au préalable l'identification d'une séquence Vtg chez *E. affinis*. Un cDNA de 5491 pb incluant un cadre de lecture ouvert de 5310 pb a été identifié (**Figure 4**). La séquence protéique déduite compte 1769 acides aminés. L'analyse fonctionnelle de la séquence (NCBI's Conserved Domain Database) a mis en évidence les 3 régions caractéristiques de la Vtg *i.e.* les domaines vitellogenin N (position 25-701), DUF1943 (Domain of Unknown Function 1943 ; position 752-1018) et vWD (VonWillebrand factor type D ; position 1462-1622). Le poids moléculaire et le point isolélectrique de la protéine ont été évalués respectivement à 199,8 kDa et 8,34 (Drummond *et al.*, 2011 ; Geneious v5.4, <http://www.geneious.com/>). La comparaison des séquences protéiques au sein de la sous-classe des copépodes a montré que la Vtg était peu conservée puisque les pourcentages d'identité n'excédaient pas 36,7% (alignement par paire ; ClustalW2, European Bioinformatics Institute ; **Figure 4**). L'analyse des pourcentages d'identité suggère que la séquence identifiée serait l'orthologue de la Vtg 2. L'analyse phylogénétique représentée **Figure 4** a été réalisée après alignement global de séquences protéiques d'arthropodes (Blosum62) selon le modèle Jukes-Cantor (Neighbor-Joining ; Geneious v5.4). Elle a permis d'identifier 4 clades parmi les crustacés (maxillopodes, malacostracés et branchiopodes) et les hexapodes (insectes). La position de la Vtg d'*E. affinis* au sein de l'arbre phylogénétique confirme l'hypothèse d'orthologie avec la Vtg 2.

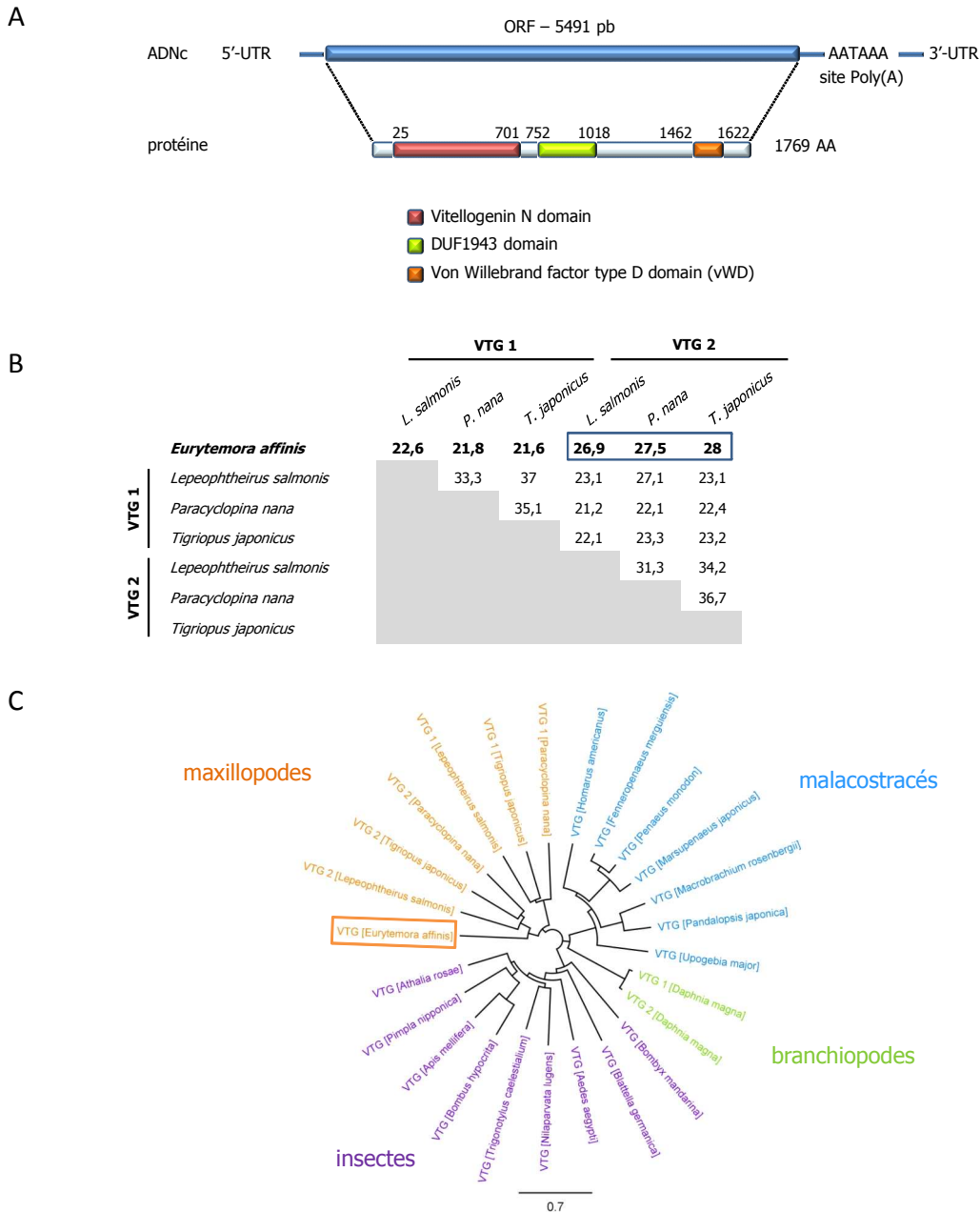


Figure 4 : Caractérisation de la vitellogénine chez *E. affinis*. (A) Représentation schématique de l'ADNc Vtg identifié chez *E. affinis* et de la séquence protéique déduite. La séquence protéique déduite de 1769 acides aminés (AA) présente les 3 régions caractéristiques de la Vtg *i.e.* les domaines vitellogenin N, DUF1943 et vWD. (B) Conservation de la Vtg au sein de la sous-classe des copépodes. Les pourcentages d'identité ont été calculés après alignement deux à deux des séquences protéiques. La protéine apparaît peu conservée au sein des copépodes. (C) Analyse phylogénétique de la Vtg chez les arthropodes. Quatre clades distincts appartenant d'une part aux crustacés *i.e.* maxillopodes, malacostracés, et branchiopodes et d'autres part aux hexapodes (insectes) ont été mis en évidence.

Afin de déterminer les niveaux de base de l'expression de la Vtg chez *E. affinis*, le dosage des transcrits a été réalisé chez le mâle et chez la femelle à différents stades du cycle de reproduction. Les taux de transcrits ont été déterminés par quantification absolue pour 2 raisons : 1- la méthode de dosage par quantification relative, plus couramment utilisée, nécessite de disposer chez l'espèce d'intérêt de gènes de référence. Cette approche est rendue impossible à l'heure actuelle chez *E. affinis* par le manque de données génomiques disponibles, 2- les gènes de référence utilisés en quantification relative, bien qu'étant choisis parmi les gènes de ménage, s'avèrent fréquemment

instables. Le dosage de la Vtg chez *E. affinis* a permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression du gène au cours de la maturation sexuelle chez les femelles (**Figure 5**). Cette augmentation était de l'ordre d'un facteur 3,6 entre le stade 1 (immature, gonades vides) et le stade 3 (mature, gonades pleines). Ces variations restent toutefois statistiquement non significatives, du fait du nombre de réplicats limité (n=3). Par ailleurs, un niveau de base extrêmement faible a été détecté chez les mâles. En effet, le nombre de copies d'ADNc était environ 2 000 fois moins important chez les mâles que chez les femelles stade 1.

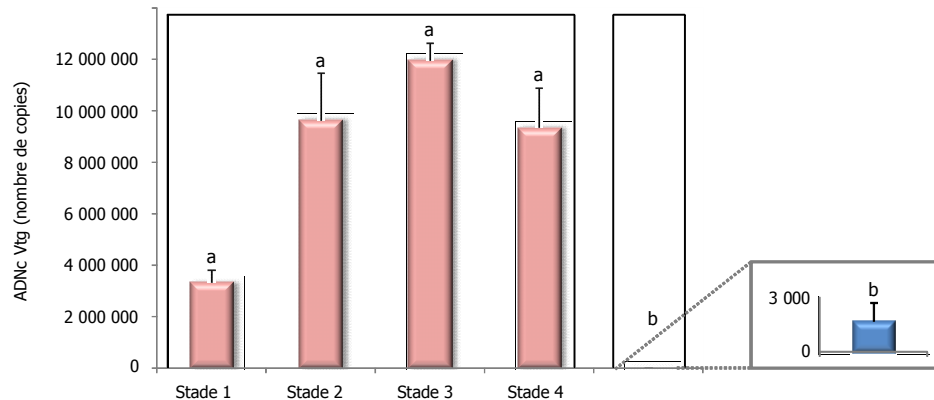


Figure 5 : Détermination des niveaux de base de transcrits Vtg chez *E. affinis* selon la différenciation sexuelle et au cours de la gamétogenèse chez la femelle. L'ADNc Vtg a été amplifié par RT-PCR quantitative à partir de 50 ng d'équivalent ARN. Les variations statistiquement significatives ont été annotées par des lettres différentes (n=50 ; 3 réplicats ; tests de Kruskal-Wallis & Student-Newman-Keuls, p<0,05)

4.1.2.2 Approche par les anticorps

Aucun des anticorps dirigés contre les vitellines de crustacés et d'insectes n'a permis de détecter de façon spécifique la Vtg chez les copépodes femelles (résultats non présentés). En revanche, l'anticorps produit à façon chez le lapin après immunisation par un peptide synthétisé *in vitro* à partir de la séquence nucléique identifiée au laboratoire s'est révélé spécifique de la Vtg chez *E. affinis*, comme attesté par la variation des taux de la protéine selon la différenciation sexuelle des individus (**Figure 6**). En dépit de cette spécificité, le niveau de détection en ELISA chez les femelles était faible (A=0,08) et les résultats peu reproductibles; l'utilisation de ce test pour le dosage de la Vtg a donc été abandonnée lors des analyses ultérieures au profit du dosage des transcrits par RT-PCR quantitative.

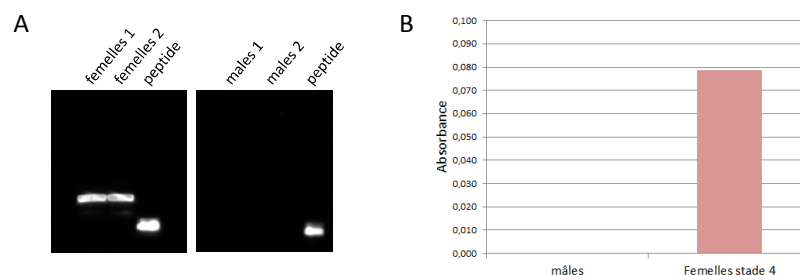


Figure 6 : Vérification en Western blot (A) de la spécificité de l'anticorps utilisé pour la détermination en ELISA (B) des niveaux de base de Vtg chez *E. affinis* selon la différenciation sexuelle. (A) L'anticorps produit à façon s'est révélé spécifique puisque la Vtg n'a été détectée que chez les femelles (stade 4). Le 'peptide' correspond au peptide utilisé pour l'immunisation des lapins. (B) Comme attendu, la Vtg a été détectée uniquement chez les femelles (stade 4).

4.1.2.3 Approche par LC/MS-MS

Une méthodologie LC/MS/MS a été proposée. La Vtg peut être dosée via un peptide de séquence EEFSPLR. Contrairement à *G. fossarum*, il a été difficile d'obtenir suffisamment d'organismes pour réaliser la validation analytique complète de la méthode. L'outil analytique est donc disponible mais non validé.

4.1.3. *Transférabilité des méthodes entre espèces*

4.1.3.1 Transfert des méthodes développées sur les deux espèces retenues.

Pour toutes les approches développées dans ce projet (anticorps par western Blot et ELISA, RT-PCR et LC/MS-MS), aucun transfert n'a été possible. Par exemple, les amorces développées et utilisées pour mesurer l'expression du gène codant la Vtg chez *G. fossarum*, n'amplifie strictement rien chez *E. affinis*. De la même façon, parmi les peptides rapporteurs identifiés chez *G. fossarum*, aucun n'a été retrouvé chez *E. affinis*. Enfin, les anticorps anti-Vtg, obtenus de la littérature, de fabricants ou produit à façon à partir d'un peptide de synthèse, ont été testés sur les deux espèces : aucun n'a permis de croiser de façon fiable avec la Vtg des deux espèces.

Ces travaux confirment, notamment pour une protéine comme la Vtg qui a beaucoup divergé au cours de l'évolution, que les méthodes disponibles et principalement développées chez les vertébrés ne peuvent pas être directement appliquées chez les invertébrés. L'adaptation et la re-validation de ces approches sont indispensables pour le développement d'outils spécifiques et fiables chez les invertébrés.

4.1.3.2 Transférabilité de l'approche LC/MS-MS.





Généralisation de la démarche analytique :

L'objectif ici était d'évaluer si la démarche développée chez *G. fossarum* était applicable chez d'autres espèces chez qui la séquence de la Vtg est connue. Pour ceci et en plus de *G. fossarum*, 5 espèces issues de différents groupes phylogénétiques d'invertébrés protostomiens ont été étudiées (**Tableau 3**). Dans le **Tableau 3** et pour chaque espèce, les peptides recherchés correspondent aux peptides obtenus *in silico* et donc potentiellement candidats comme peptides rapporteurs de la Vtg (ou protéine majoritaire de réserve de l'œuf). Les résultats montrent que dans tous les cas et à partir des peptides obtenus *in silico*, des peptides rapporteurs et spécifiques de la Vtg (peptides notés candidats dans le tableau) ont été identifiés. Ces peptides candidats respectent les règles de sélection que nous nous sommes imposées dans ce projet et qui sont au nombre de trois :

- 1 – au minimum 3 transitions par peptide doivent être retrouvées,
- 2 – les 3 transitions retrouvées dans les tissus positifs (femelle) doivent se trouver dans une fenêtre de rétention de 0,1 minute au sein du même échantillon. Les transitions correspondantes sont ensuite recherchées dans les tissus négatifs dans une fenêtre élargie de +/- 0,5 minute.
- 3 – ratio tissus positif vs négatif : les tissus positifs devant contenir 10 à 1000 fois plus de Vtg que les tissus négatifs (démonstré chez le gammare).

En accord avec les résultats obtenus chez *Gammarus fossarum*, cette partie de l'étude a montré qu'il est aisé et rapide de caractériser et identifier des peptides spécifiques de la Vtg chez les espèces dont la séquence codant la protéine est connue. L'identification de peptides a été possible chez les différents taxons couvrant les invertébrés, montrant le large potentiel d'application de cet outil. Les peptides candidats représentent entre 20 et 60% des peptides recherchés, ce qui est en adéquation avec ce qui a été démontré par Resing & Ahn 2005.

Tableau 3 : Peptides rapporteurs de la Vtg (ou protéine de réserve majoritaire de l'œuf) et identifiés chez les différentes espèces étudiées, pour lesquelles la séquence est connue.

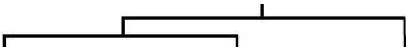


	Espèces		Peptides		
			Recherchés	Candidats	Proportion C/R (%)
Bivalvia	<i>Crassostrea gigas</i>		114	44	39
	<i>Mytilus edulis</i>		15	1	7
Crustacea	<i>Gammarus fossarum</i>		14	8	57
	<i>Daphnia magna</i>		170	59	35
	<i>Armadillidium vulgare</i>		15	8	53
Insecta	<i>Drosophila melanogaster</i>		72	16	22

Généralisation de l'outil entre espèces :

Cette deuxième partie a eu pour but d'évaluer le potentiel de transférabilité des peptides protéotypiques identifiés chez une espèce, à des espèces phylogénétiquement proches. Pour ceci, les peptides candidats précédemment identifiés chez les espèces dont la séquence de la Vtg est connue, ont été recherchés chez des espèces proches non séquencées. Ces travaux ont été réalisés à partir des peptides identifiés pour 3 « egg yolk proteins » chez *Drosophila melanogaster*, la vtg chez *Gammarus fossarum* et pour les 2 vtg chez *Daphnia magna*.

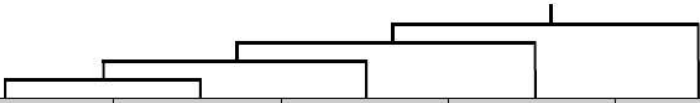
Sur les 16 peptides identifiés chez *D. melanogaster*, 6 ont été retrouvés chez *D. subobscura* et 2 chez *D. immigrans* (Tableau 4). Ces résultats montrent que des peptides candidats identifiés chez une espèce séquencée peuvent être utilisés pour caractériser et à terme quantifier la Vtg chez des espèces phylogénétiquement proches pour qui les séquences ne sont pas décrites. Il est intéressant de remarquer que le temps de divergence semble être le facteur déterminant le degré de conservation de ces peptides. Plus le temps de divergence est grand, plus le nombre de peptides perdus est important. Nous avons montré qu'une approche de « peptides dégénérés » (test de combinaisons de séquences probables au vu des conservation évolutive) peut permettre d'identifier des peptides perdus lors du passage vers une espèce non-séquencée.

Tableau 4 : Généralisation chez *Drosophila*

		
Espèces	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. subobscura</i> <i>D. immigrans</i>
Candidats (X/16)		 
Temps de divergence (Ma)		<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> 6 2 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> 25 40 </div>

Les résultats obtenus pour les deux autres groupes sont présentés dans le **Tableau 5** pour les gammarus et le **Tableau 6** pour les daphnies. De la même façon que pour les drosophiles, les résultats obtenus montrent que les peptides préalablement identifiés chez une espèce dont la séquence Vtg est disponible peuvent être utilisés pour identifier et quantifier la Vtg chez des espèces non séquencées. Les trois cas d'études montrent que le nombre de peptides retrouvés et l'éloignement phylogénétique sont en accord. Ces résultats soulignent par ailleurs que la transférabilité du dosage de la Vtg entre espèces peut se faire si l'on reste dans une phylogénie proche. Ces travaux ont été valorisés dans Jubeaux *et al.* (2012b)

Tableau 5 : Généralisation chez *Gammarus*












	<i>G. fossarum</i>	<i>G. wautierii</i>	<i>G. pulex</i>	<i>G. roeseli</i>	<i>D. villosus</i>
Espèces					
Candidats (X/8)	6	3	2	2	2

Tableau 6 : Généralisation chez *Daphnia*



	<i>D. magna</i>	<i>D. pulex</i>	<i>C. dubia</i>
Espèces			
Candidats (X/59)		15	10

La méthodologie LC-MS/MS a été développée chez 6 espèces séquencées couvrant différents grands groupes phylogénétiques (bivalves, crustacés, insectes) et a pu être transférée chez 8 espèces non séquencées. Ces résultats montrent que la mesure de la Vtg par LC-MS/MS:

- 1) peut-être rapidement développée chez une espèce lorsque la séquence de la Vtg est connue : ici, deux mollusques bivalves (*Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis*), trois familles de crustacé (amphipode, *Gammarus fossarum* ; branchiopode, *Daphnia magna* ; isopode, *Armidillidium vulgare*).
- 2) peut-être rapidement transférée chez une espèce lorsque la séquence de la Vtg n'est pas connue : ici chez les gammares (*G.pulex*, *G. wautieri*, *G. roeseli*, *Dikerogammarus villosus*), les daphnies (*D. pulex*, *Cerodaphnia dubia*), les drosophiles (*D. subobscura* et *D. immigrans*).

4.2. Etape 2 : induction chez les mâles

4.2.1 Chez *G. fossarum*

Des gammares mâles ont été exposés au laboratoire à plusieurs substances modèles (cf. section 2.2.2.1) à des concentrations allant de 10ng/L à 1000µg/L. Les résultats sont présentés dans la **Figure 7** et ont été valorisés dans Jubeaux *et al.* (2012a). Aucun effet sur la survie a été observé avec des taux de mortalité inférieur à 20 % dans tous les cas, excepté à la plus forte concentration de cyprotérone (1000 µg/L) ou 50% de mortalité ont été observés (données non présentées). A partir de la littérature, les effets de la 20-hydroxyecdysone et du méthylfarnésoate ont été exclusivement étudiés chez des crustacés femelles. La 20-hydroxyecdysone n'a conduit aucune induction de la Vtg chez les mâles, alors que le méthylfarnésoate a induit la production de cette protéine chez les organismes exposés.

En se basant sur les connaissances disponibles concernant l'endocrinologie des amphipodes, une des hypothèses est que ces molécules interfèrent avec l'hormone androgène qui régule négativement la synthèse de cette protéine. De nombreux pesticides sont conçus pour mimer le rôle de ces deux hormones dans le but de contrôler la croissance, le développement et la reproduction des arthropodes nuisibles de l'agriculture. Le méthoxyfénoside est un insecticide récent qui a une très grande affinité avec le récepteur à l'ecdysone chez les insectes lépidoptères (Carlson *et al.*, 2001). Il agit comme un agoniste de l'hormone de mue, la 20-hydroxyecdysone. Les données disponibles à ce jour montre que cet insecticide possède un très faible risque pour les espèces non-cibles comme les coléoptères (Trisyono *et al.*, 2000) et les acariens (Villanueva and Walgenbach, 2005). Cependant, la toxicité de ce composé à une plus large échelle phylogénétique n'est pas connue. Dans notre étude, une induction de Vtg a été observée chez les mâles exposés à la plus faible concentration, alors qu'aucune induction n'a été observée aux plus fortes concentrations. Peu de données sont disponibles

dans la littérature sur le potentiel perturbateur endocrinien de cette molécule, afin de les confronter à nos résultats. Le second pesticide testé est le propiconazole pour lequel une relation dose-réponse en cloche a été obtenue avec une induction significative de Vtg à la concentration de 0,1 µg/L. Contrairement à nos données, Soetaert et al. (2006) observent une inhibition de l'expression du gène codant pour la Vtg chez *Daphnia magna* exposée à 1 mg/L. Cependant, il est important de noter que cette étude a été conduite avec de très fortes concentrations et chez des femelles et qu'il n'existe pas de données disponibles chez des mâles, pouvant être directement comparées à nos résultats.

Les composés pharmaceutiques sont couramment détectés dans les rejets de stations d'épuration. La toxicité de certains d'entre eux a été évaluée à l'aide de tests aigus. Cependant leurs effets sub-létaux n'ont été que marginalement étudiés (Fent *et al.*, 2006). La cyprotérone est un anti-androgène, un dérivé synthétique de la progestérone, couramment utilisé dans le traitement du cancer de la prostate. Dans cette étude, nos résultats ont montré qu'une exposition à des concentrations réalistes au niveau environnemental conduit à une induction significative de la Vtg chez les mâles. Des observations similaires ont été faites par Xuereb *et al.*, (2011) sur l'expression du gène codant pour cette protéine. L'autre composé pharmaceutique testé, la carbamazépine est connu pour être un des composés les plus problématiques d'un point de vu risque environnemental (Ferrari *et al.*, 2003 ; Fent *et al.*, 2006). Dans notre projet, aucune induction de Vtg n'a été observée chez les mâles exposés à ce composé.

Pour finir, les effets perturbateurs endocriniens de la benzophénone chez *G. fossarum* ont été étudiés. Ce composé est utilisé comme écran aux UV. Chez les invertébrés, sa toxicité a été étudiée uniquement chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, avec une LC50 à 24h de 56,8 mg/L (Ura *et al.*, 2002). Aujourd'hui, aucune donnée sur le potentiel perturbateur endocrinien de cette molécule n'est disponible chez les invertébrés. Dans ce projet, aucune induction de Vtg n'a été observée chez les gammarus mâles exposés à des concentrations allant de 10 ng/L à 1000 µg/L.

Dans notre projet, toutes les inductions de Vtg observées ne suivent pas une relation dose-réponse classique avec une augmentation en fonction de la concentration d'exposition. En effet, les inductions sont observées aux faibles concentrations testées et non aux plus fortes. Ce type de profil peut être expliqué par l'apparition d'effets sub-létaux aux plus fortes concentrations. Sanders *et al.* (2005) ont obtenu des observations similaires avec le nonylphénol chez des larves de *P. elegans* ou les plus fortes inductions de Vtg ont été observées aux plus faibles concentrations testées. De nombreux perturbateurs endocriniens, en particulier les xénoestrogènes, présentent des effets biologiques suivant ce type de relations dose-réponses, appelés aussi des effets à faibles doses (Markey *et al.*, 2003), compliquant notamment leur utilisation comme biomarqueurs. Les résultats de ce projet montrent que la mesure de la Vtg chez les mâles révèle un stress chez les organismes exposés, avec des teneurs en Vtg qui peuvent atteindre celles observées chez des femelles hors cycle de reproduction. Cependant, il est difficile de conclure sur la possibilité d'utiliser la mesure de la Vtg comme biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne chez les mâles. En effet, la plus forte induction observée suite à ces expositions en laboratoire est de 10, ce qui est bien plus faible à ce qui peut être observé chez les poissons, ou des inductions de 10⁴ peuvent être facilement obtenues.

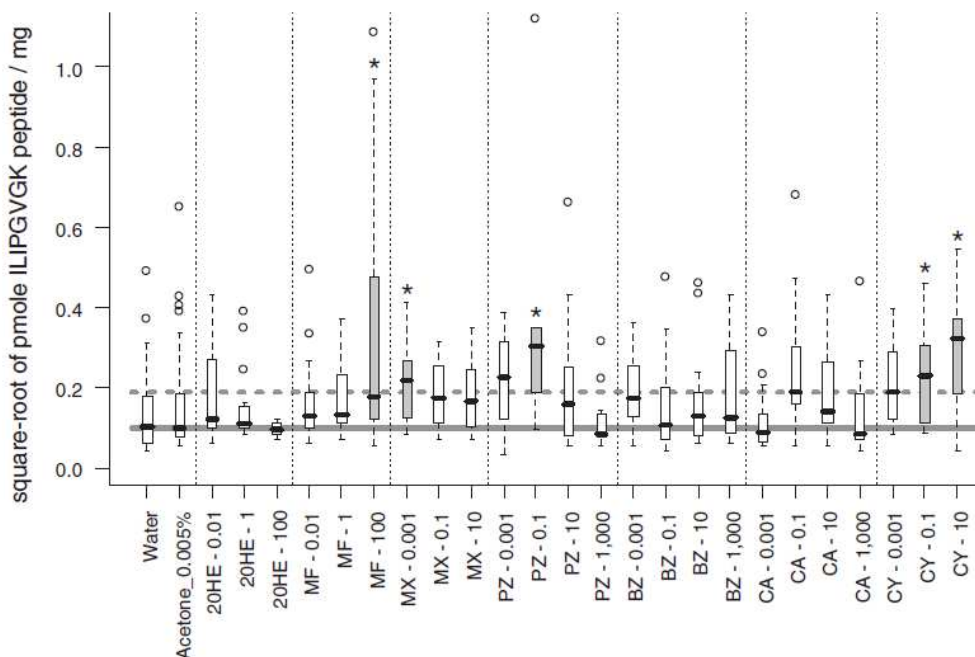


Figure 7 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmole du peptide ILIPGVGK par mg de poids frais, normalisées par racine carré) chez des mâles *G. fossarum* suite à leur exposition à diverses molécules modèles, 20HE : 20-hydroxyecdysone, MF : méthyl-farnésate, MX : méthoxyfénozide, PZ : propiconazole, BZ : benzophénone, CA : carbamazépine, CY : cyprotérone. Water : témoin, Acetone : témoin solvant à la concentration de 0.005%. La boîte à moustache représente le premier et troisième quartile avec la médiane. * = $p < 0,05$ par rapport aux contrôles.

4.2.2 Chez *E. affinis*

Les niveaux de transcrits ont été étudiés par RT-PCR quantitative chez les mâles après exposition à 2 composés modèles *i.e.* MF et 4-NP. Deux expérimentations distinctes ont été réalisées pendant 24 et 48h d'une part, et 96h d'autre part.

Après 24h d'exposition au MF (100 $\mu\text{g/L}$) et au 4-NP (1 et 5 $\mu\text{g/L}$), aucune induction de Vtg n'a été détectée chez les mâles (**Figure 8**) alors qu'après 48h, l'expression de la Vtg a été induite pour toutes les conditions testées y compris les témoins eau et acétone, à l'exception du 4-NP à 1 $\mu\text{g/L}$ (**Figure 8**). Après 96h, des quantités de transcrits similaires ont été détectées quelle que soit la dose de MF testée (0,01 $\mu\text{g/L}$, 1 $\mu\text{g/L}$ et 100 $\mu\text{g/L}$). Aucune différence significative n'a été mise en évidence entre individus exposés au MF et individus témoins exposés à l'acétone (Anova).

L'expression de la Vtg n'a pas été induite chez le mâle *E. affinis* par les 2 composés testés, aux doses utilisées. L'effet d'autres PE modèles devra être évalué afin de compléter ces premières observations.

Par ailleurs, l'induction détectée après 48h chez les organismes témoins suggère que l'expression de la Vtg pourrait être influencée par des facteurs biotiques ou abiotiques tels qu'une contamination bactérienne du milieu ou une augmentation des taux de nitrites.

Enfin, la variabilité observée entre échantillon était élevée, en partie du au faible nombre de réplicats ($n=3$). Le nombre limité de réplicats est lié à l'effort de tri sous binoculaire nécessaire à l'échantillonnage ainsi qu'à la mortalité observée au cours des expérimentations. L'augmentation du nombre de réplicats lors des expérimentations futures apparaît toutefois indispensable mais nécessitera au préalable la mise au point d'une miniaturisation des méthodes afin de permettre l'extraction des ARN sur quelques individus.

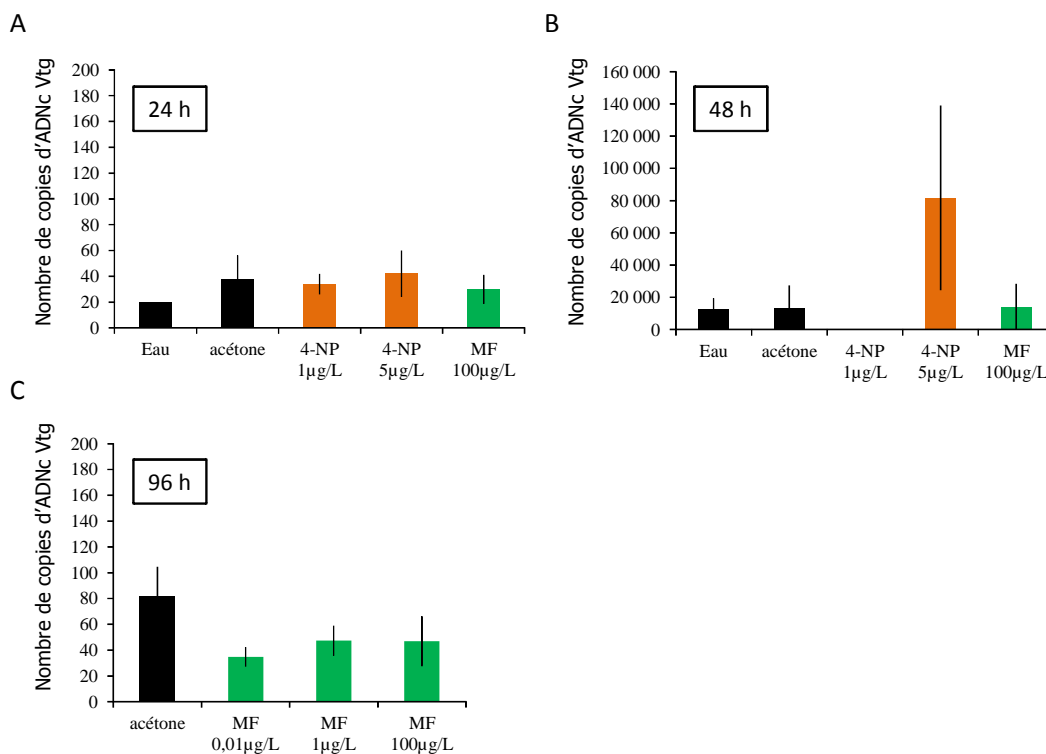


Figure 8 : Dosage de la Vtg chez des individus mâles *E. affinis* par RT-PCR quantitative après exposition à des composés modèles. Les organismes ont été exposés au méthylfarnésate (MF) et au 4-nonylphénol (4-NP) pendant 24, 48 ou 96h. Deux expérimentations distinctes (A et B d'une part et C, d'autre part) ont été réalisées.

4.3. Etape 3 : Application terrain

4.3.1 Chez *G. fossarum*

Cette partie du projet avait pour objectif d'évaluer la possibilité d'utiliser la mesure de la Vtg chez le mâle *G. fossarum* comme biomarqueur d'une perturbation endocrinienne et ceci dans le cadre de programmes de suivi de la qualité des milieux. Etant donné que le niveau d'un biomarqueur peut être influencé par de nombreux facteurs biotiques (e.g. sexe, âge, taille, statu reproducteur etc...) et environnementaux (e.g. température et dureté) (Handy *et al.*, 2000), l'impact de ces potentiels facteurs de confusion doit être caractérisé et pris en compte pour améliorer l'utilisation de la Vtg comme biomarqueurs chez les gammarus mâles. Plusieurs de nos travaux ont montré que l'utilisation d'organismes contrôlés engagés (test *in situ*) constitue une approche pertinente pour le diagnostic de la qualité des milieux et permet de réduire une partie de la variabilité des réponses étudiées en comparaison aux suivis se basant sur l'utilisation d'organismes autochtones (Coulaud *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011a). L'intérêt des approches d'engagement est qu'il est facile de contrôler les organismes utilisés et ainsi de limiter l'impact des facteurs d'origine biotiques sur la mesure du biomarqueur considéré.

La première phase de ce travail a consisté à évaluer la variabilité spatiale (milieux faiblement et fortement calcique) et temporelle (saisons) de la teneur en Vtg chez des organismes mâles contrôlés. L'évolution des teneurs en Vtg observée sur les deux bassins versants de référence est présentée dans la **Figure 9**. Etablir la variabilité naturelle d'une réponse est une étape indispensable dans le développement d'un biomarqueur fiable et la proposition d'un niveau de base comme valeur de référence. Ainsi, cette étape permet de comparer des stations dans le temps et l'espace sans avoir recours, comme c'est couramment le cas à l'heure actuelle, à des stations définies *a priori* comme référence (Coulaud *et al.*, 2011, Lacaze *et al.*, 2011b ; Xuereb *et al.*, 2009). Dans notre projet, de grandes différences de niveau de Vtg ont été observées chez les mâles engagés au cours des saisons et ceci aussi bien sur la Bourbre que sur l'Ardière. Les plus faibles teneurs ont été observées en hiver et automne, avec des valeurs similaires à celles observées en laboratoire sur des organismes contrôlés (voir partie ci-dessus), montrant que les caractéristiques de chaque bassin versant, comme la dureté, ont un effet négligeable sur la production de Vtg. A l'inverse, ces résultats montrent que les teneurs

en Vtg évoluent fortement en fonction des dates d'expérimentation, avec de fortes inductions en printemps et été. Cependant, la température ne semble pas être le seul facteur permettant d'expliquer ces observations. En effet, les teneurs observées chez les organismes exposés sur l'Ardière en Avril, à une température de 12°C, correspondant à celle utilisée en laboratoire (voir ci-dessus), sont beaucoup plus fortes que les teneurs obtenues chez nos témoins de laboratoire. Il n'existe pas, dans la littérature, de données sur l'impact de la température sur la production de la Vtg chez des crustacés mâles d'autres espèces. Ortiz-Zarragoitia and Cajaraville (2010) n'ont observé aucune corrélation entre les paramètres physico-chimiques des milieux et les teneurs en Vtg dans des moules au cours d'un suivi de quinze mois sur des organismes autochtones. A l'inverse, Ciocan *et al.* (2010) and Blaise *et al.* (1999) ont montré une variation saisonnière des teneurs en Vtg chez la moule *Mytilus edulis* et *Mya arenaria*. Toutefois, ces observations ont été réalisées sur des organismes femelles, par conséquent ces variations peuvent refléter le cycle reproducteur.

Les résultats de ces travaux, ainsi que ceux de la littérature, montrent que les facteurs responsables de la variabilité temporelle des teneurs en Vtg chez les gammarès mâles ne sont pas bien connus et que des études complémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser et comprendre cette variabilité et ainsi proposer un biomarqueur plus sensible et discriminant. Parmi les différentes hypothèses qui peuvent être faites pour expliquer cette variabilité, plusieurs auteurs ont évoqué la possibilité de fonctions pléiotropes de la Vtg, et non de rôle exclusif dans la reproduction et ceci aussi bien chez les vertébrés que les invertébrés (Zhang *et al.*, 2011). En effet, de récentes données sur les fonctions de la Vtg montrent qu'elle peut être impliquée dans la réponse au stress oxydant et immunitaire. Chez *D. magna* et *Artemia parthenogenetica*, le gène de la Vtg contient un domaine de la superoxyde dismutase, suggérant un rôle potentiel dans l'activité anti-oxydante, bien que ceci doit être confirmé (Chen *et al.*, 2011, Kato *et al.*, 2004 ; Tokishita *et al.*, 2006). De la même façon, Seehuus *et al.* (2006) et Nakamura *et al.* (1999) ont montré que la Vtg joue un rôle d'anti-oxydants chez l'insecte *Apis mellifera* et le nématode *Caenorhabditis elegans*. Concernant la réponse immunitaire, il a été montré que la Vtg joue aussi un rôle dans la coagulation et les activités anti-microbiennes chez de nombreuses espèces, incluant des insectes (Rono *et al.*, 2010), l'amphioxus (Zhang *et al.* 2005) et le poisson (Garcia *et al.*, 2010 ; Li *et al.*, 2008 ; Tong *et al.*, 2010). Ces multiples fonctions physiologiques de la Vtg peuvent partiellement expliquer cette forte variabilité inter-individuelle et peut compliquer fortement son utilisation comme biomarqueur spécifique d'une PE.

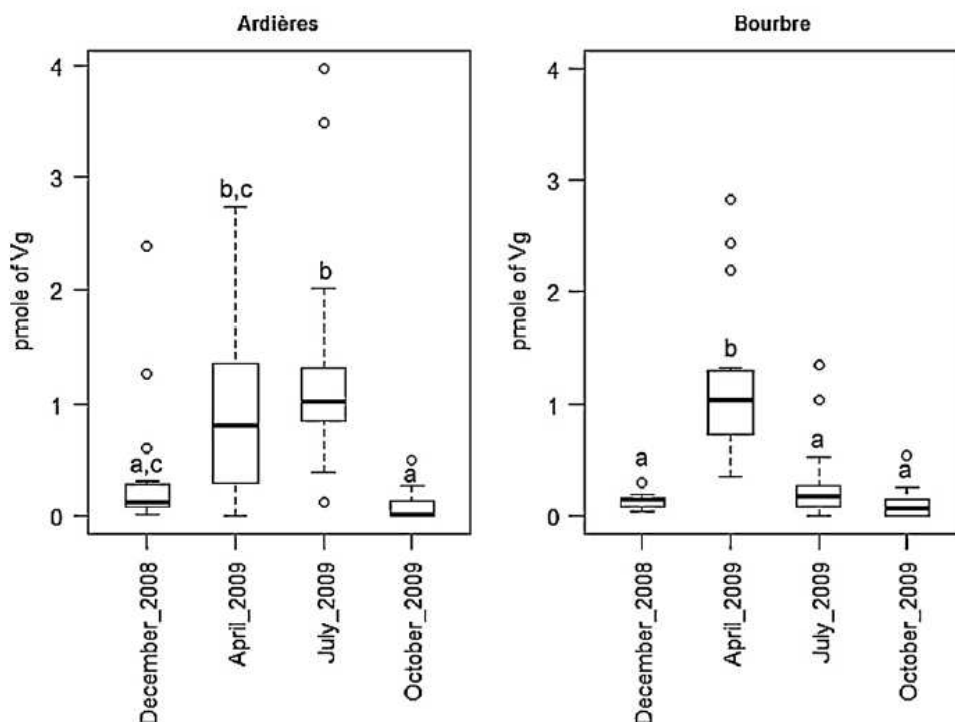


Figure 9 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmol/mg frais ; n = 10) obtenues chez les mâles *G. fossarum* au cours de quatre séries d'encagement sur des sites de référence de l'Ardière et de la Bourbre) en décembre 2008, Avril,

La seconde phase de ce travail de terrain consistait à évaluer la pouvoir discriminant et la sensibilité de la mesure de la Vtg en conditions naturelles. Une des fortes limites actuelles dans la validation de biomarqueurs spécifiques d'une perturbation endocrinienne chez les invertébrés mâles est le manque de connaissance et la disponibilité très limitée de composés agissant sur la régulation endocrine de ces espèces. Ceci complique fortement le choix de stations ayant une typologie de contamination bien connue permettant de valider la pertinence de la mesure de la Vtg comme un biomarqueur sensible pour les études de suivi. Par conséquent, nous nous sommes basés sur les travaux de Besse et al. (2013) à partir desquels nous avons sélectionné 5 stations de références et 16 stations contaminés et présentant des profils divers. Les stations P2 et P4 sont caractérisés par une contamination en métaux, P3, P8 et P11 par une contamination organique, P7 est contaminée par les pesticides et les autres stations présentent une multi-contamination. Enfin, pour les stations contaminées, nous avons précédemment montré, sur les stations P1, P5, P7-9, P11, P12, P15 et P16, des inhibitions significatives du taux d'alimentation chez des organismes exposés, confirmant une détérioration de la qualité chimique et une toxicité des systèmes étudiés (Coulaud *et al.*, 2011). Concernant les teneurs en Vtg observées chez les organismes mâles exposés, elles sont présentées dans la **Figure 10**. Aucune différence significative n'a été observée entre les sites de référence, avec des valeurs similaires à celles obtenues sur l'Ardières et la Bourbre (présentées ci-dessus), lors de l'étude sur la variabilité saisonnière, en considérant la saison à laquelle ces dernières expérimentations ont été réalisées. Comme précédemment, une très forte variabilité a été observée entre les sites de référence, donnant un pouvoir discriminant très faible à cette mesure. Des inductions de Vtg ont été observées uniquement sur deux (P10 et P11) des seize sites étudiés, en comparaison aux teneurs en Vtg observées pour les sites de référence.

Conformément aux observations faites au laboratoire, ces résultats montrent que les facteurs d'induction observés sur le terrain (environ 10) sont beaucoup plus faibles que ce qui peut être observé chez les vertébrés et notamment les poissons exposés à des xénoestrogènes (Sumpter and Jobling, 1995). Il y a très peu de données disponibles chez les invertébrés et en particulier chez les crustacés pour comparer avec nos résultats. Cependant, Xuereb et al. (2011) ont également montré des inductions significatives du gène codant pour la Vtg chez des mâles contaminés, mais également avec des facteurs d'induction très faibles. Chez *Carcinus maenas* et chez *Carcinus aestuarii*, Lye *et al.* (2005) et Ricciardi *et al.* (2010) ont montré de fortes différences dans les teneurs en Vtg des organismes en fonction de leur localisation, mais sans aucune corrélation avec les niveaux de contamination des systèmes étudiés. Enfin, Zapata-Perez *et al.* (2005) n'ont observé aucune différence des teneurs en Vtg chez des *Litopenaeus setiferus* mâles collectés respectivement en milieu propres et contaminés.

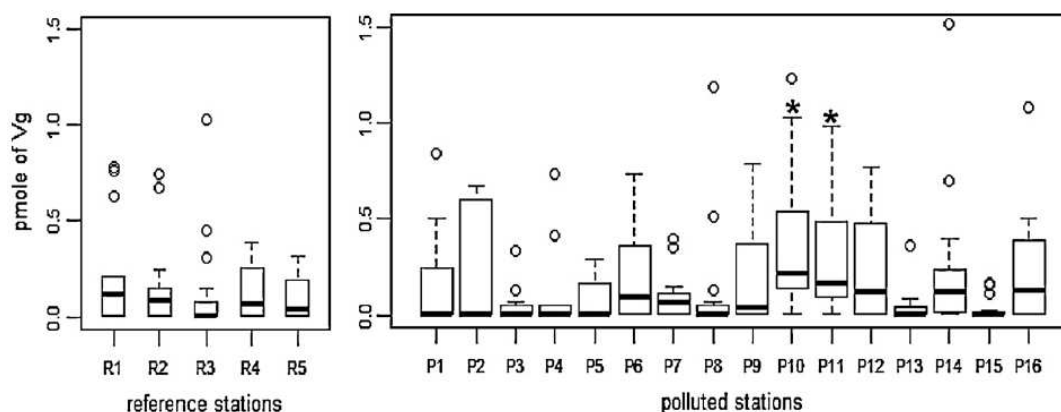


Figure 10 : Teneurs en Vtg (exprimées en pmol/mg de poids frais, n=15) chez des mâles *G. fossarum* exposés 21 jours sur 5 sites de référence (R1 – R5) et 16 sites plus ou moins contaminés (P1 – P16). La boîte à moustache représente le premier et troisième quartile avec la médiane. * = $p < 0,05$ par rapport à l'ensemble des sites de référence (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

4.3.2 Chez *E. affinis*

Du fait de la variabilité du nombre de copies de cDNA Vtg chez *E. affinis* au sein des réplicats, l'exposition des copépodes aux fractions organiques issues de sédiments prélevés en Seine dans le cadre du projet ToxSeine (Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval) disponibles au laboratoire n'a pas encore été réalisée. Il convient au préalable que la miniaturisation des méthodes soit optimisée, les volumes disponibles de ces fractions étant limités.

5 – Principaux acquis

Récemment et dans le cadre de ce projet, des méthodes spécifiques ont été développées et validées pour mesurer l'expression du gène et la production de la Vtg chez *G. fossarum* et *E. affinis* mâles (Xuereb *et al.*, 2011, Simon *et al.*, 2011 et Jubeaux *et al.*, 2012a et 2012b). Comme suspecté, ces travaux ont clairement mis en évidence une différence marquée entre mâle et femelle. Bien que pas totalement silencieux, le gène de la Vtg est 200 à 700 fois moins exprimé chez le mâle que chez la femelle selon son statut reproducteur (Xuereb *et al.*, 2011). De la même façon les teneurs en protéine sont de 20 à 1000 fois plus faibles chez les mâles. Les résultats de ce projet permettent de confirmer et valider le rôle fonctionnel de cette protéine dans la reproduction chez cette espèce. Des données similaires ont été obtenues chez *E. affinis*, ainsi que le développement d'un anticorps spécifique de la Vtg chez cette espèce. Dans la littérature associée aux travaux en écotoxicologie, très peu d'études se sont intéressées à la « re-validation » fonctionnelle de cette protéine, ceci malgré la difficulté d'obtenir une méthode spécifique et surtout la divergence, aussi bien dans la structure que dans la fonction de cette protéine dite « Vtg » au cours de l'évolution. C'est ainsi que l'on trouve des résultats très surprenant dans la littérature comme aucune différence intersexe de la teneur de cette protéine chez des organismes contrôles, e.g. les bivalves *Mytilus edulis* (Arab *et al.*, 2004 ; Ciocan *et al.*, 2010) et *Dreissena polymorpha* (Quinn *et al.*, 2006).

Dans un contexte de surveillance environnementale, il est essentiel de connaître la variabilité naturelle des biomarqueurs en relation avec les facteurs biotiques intrinsèques à l'organisme et les facteurs environnementaux. Les travaux de ce projet, menés aussi bien au laboratoire que sur le terrain à large échelle, ont permis de montrer que des facteurs environnementaux, non identifiés, influencent fortement les teneurs en Vtg des organismes mâles, conduisant à une faible robustesse et sensibilité de la mesure de cette protéine et limitant fortement son utilisation comme outil de surveillance des milieux. De plus, et en comparaison aux observations faites chez les vertébrés, les inductions obtenues chez *G. fossarum* sont extrêmement faibles, avec un facteur maximal de 15. Par conséquent et en accord avec les conclusions faites par Hannas *et al.* (2011) chez *D. magna*, nos résultats montrent qu'il est difficile de proposer la mesure de la Vtg chez le mâle *G. fossarum* comme un biomarqueur spécifique d'une perturbation endocrinienne. Ces conclusions sont corroborées par les observations faites dans des papiers très récents suspectant que la Vgt ne joue pas uniquement le rôle de réserve pour les embryons, mais serait également impliquée dans d'autres fonctions physiologiques comme la défense immunitaire (Zhang *et al.*, 2011). Comme récemment souligné par Ford (2012), il y a actuellement que très peu d'études qui ont réussi à faire le lien entre une exposition chimique et une induction de la Vtg dans un contexte de biosurveillance des milieux. De la même façon, Ford (2008) suggère qu'il est difficile de féminiser un crustacé mâle sans passer auparavant par différentes phases de dé-masculinisation. En se basant sur la particularité de la régulation endocrine de la reproduction des crustacés, qui ne fait intervenir qu'une hormone androgène, il fait l'hypothèse que les phénomènes d'intersexe couramment observés résultent plus d'une démasculinisation des organismes qu'une féminisation. Ainsi il suggère qu'il serait plus fructueux, chez les crustacés, de travailler et de développer des marqueurs de démasculinisation que des marqueurs de féminisation. Une des approches serait de caractériser l'hormone androgène chez *G. fossarum* et d'évaluer si son niveau de production peut être perturbé par la présence de contaminants dans les milieux, pour ensuite le proposer comme biomarqueur d'une perturbation endocrine.

6 – Valorisation scientifique

6.1. Publications :

- Simon R., Jubeaux G., Chaumot A., Lemoine J., Geffard O., Salvador A. 2010. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *Journal of Chromatography A*, 1217 (31): 5109-5115.
- Xuereb B., Bezin L., Chaumot A., Budzinski H., Augagneur S., Tutundjian R., Garric J., Geffard O. 2011. Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use of use as an endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicology*. 20(6): 1286-1299.
- Jubeaux G., Simon R., Salvador A., Quéau H., Chaumot A., Geffard O. 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) : Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology*. 112-113: 72-82
- Jubeaux, G., Audouard-Combe, F., Simon, R., Tutundjian, R., Salvador, A., Geffard, O., Chaumot, A. 2012. Vitellogenin-like protein among invertebrate species diversity : potentiel of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development. *Environmental Science & Technology*, 46 : 6315-6323.
- Jubeaux, G., Simon, R., Salvador, A., Lopes, C., Lacaze, E., Quéau, H., Chaumot, A., Geffard, O. 2012. Vitellogenin-like protein measurement in caged *Gammarus fossarum* males as a biomarker of endocrine disruptor exposure: inconclusive experience. *Aquatic Toxicology*, 122-123 : 9-18.

6.2. Colloques :

- Salvador, A., Simon, R., Jubeaux, G., Chaumot, A., Geffard, O., Lemoine, J. La LC-MS/MS : une alternative aux méthodes ELISA pour le dosage de biomarqueurs en écotoxicologie. Application au dosage de la vitellogénine chez *Gammarus fossarum*. *Journées Santé Environnement, Cluster Environnement, Séminaire P6, Lyon-France, 4-5 Mars 2010*. (Oral)
- Jubeaux, G., Simon, R., Audouard-Combe, F., Quéau, H., Salvador, A., Chaumot, A., Garric, J., Geffard, O. 2011. Quantification of vitellogenin by mass spectrometry (LC-MS/MS) in the freshwater amphipod, *Gammarus fossarum* : a potential endocrine disruption biomarker. 21th *Annual Meeting of SETAC-Europe, Milano, Italy, 15-19 May*. (oral)
- Jubeaux, G., Audouard-Combe, F., Simon, R., Tutundjian, R., Quéau, H., Salvador, A., Garric, J., Geffard, O., Chaumot, A. 2011. Measurement of vitellogenin protein in invertebrates : relevance and usefulness of mass spectrometry (LC-MS/MS) to propose a specific and transferable method across species. 21th *Annual Meeting of SETAC-Europe, Milano, Italy, 15-19 May*. (oral)
- Simon, R., Jubeaux, G., Geffard, O., Lemoine, J., Chaumot, A., Salvador, A. – 2009. La LC/MS/MS : une alternative aux méthodes ELISA pour le dosage de biomarqueurs en écotoxicologie. Application aux dosages de la VTG chez *G. fossarum*. *SMAP 2009, Dijon, FRA, 14 – 17 sept 2009*. (affiche)
- Jubeaux G., Simon R., Lemoine J., Salvador A., Garric J., Chaumot A., Geffard O. 2010. Development of vitellogenin measurement in *Gammarus fossarum* : first step to propose a relevant biomarker for reproductive impact assessment of endocrine disruptors. 20th *Annual Meeting of SETAC-Europe, Seville, Spain, 23-27 May* (Affiche).
- Jubeaux, G., Simon R., Chaumot A., Audouard-Combe, F., Salvador, A., Geffard, O. 2010. Developing a method for vitellogenin quantification to investigate the reproductive investment in gammarids. 14th *International Colloquium on Amphipoda, Sevilla, Spain, 13-18 September*. (Affiche).
- Boulangé-Lecomte C, Xuereb B and Forget-Leray J. Characterization of a vitellogenin-like gene in the copepod *Eurytemora affinis*. 16th *International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 16)*. Long Beach, USA, May 15-18, 2011 (communication affichée)

Boulangé-Lecomte C, Xuereb B et Forget-Leray J. Caractérisation d'un gène codant une vitellogénine-like chez le copépode *Eurytemora affinis*. 17ème Journée de l'Institut Fédératif de Recherches Multidisciplinaires sur les Peptides 23 (IFRMP23). Rouen, France, 17 juin 2011 (communication affichée)

Jubeaux, G., Audouard-Combe, F., Simon, R., Tutundjian, R., Quéau, H., Salvador, A., Geffard, O., Chaumot, A. 2011. Mesure de la vitellogénine chez les invertébrés : pertinence et application de la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) en vue de proposer une méthode spécifique et transférable entre espèces. Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Paris, France, 22 Juin. (Affiche).

Jubeaux, G., Simon, R., Audouard-Combe, F., Quéau, H., Salvador, A., Chaumot, A., Geffard, O. 2011. Mesure de la vitellogénine par spectrométrie de masse (LC-MS/MS) chez un amphipode dulçaquicole, *Gammarus fossarum* : un biomarqueur potentiel de la perturbation endocrinienne. Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Paris, France, 22 Juin. (Affiche).

6.3. Mémoires :

Audouard-Combe F. 2010 (M2R ; Master 2 Analyse et Contrôle Université Claude Bernard Lyon 1). Généralisation de la LC-MS/MS comme outil de mesure de la vitellogénine chez les invertébrés. 60pages.

Techer Romy. 2010. (M1 ; M1 Ingénierie de la santé option Environnement & Santé, université Montpellier 1). Utilisation de biomarqueurs chez le crustacé dulçaquicole *Gammarus fossarum* comme outil d'évaluation de la reprotoxicité au laboratoire et sur le terrain. 32 pages

Trémolet G. 2012 (M2R ; Master 2 Evolution, Patrimoine Naturel et Sociétés Spécialité : Unité et Diversité du Vivant - Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris). Développement du dosage de la vitellogénine chez une espèce de crustacé d'intérêt écotoxicologique et environnemental exposée à des perturbateurs endocriniens. 41 pages.

7 – Transferts des résultats auprès des praticiens

8 – Partenariats mis en place, ou envisagés

Au cours de cette première partie du projet et pour répondre à des questions concernant le séquençage *do novo* de protéines, nous avons pris des contacts avec J. Armengaud du CEA de Marcoule. Un sujet de thèse, impliquant deux partenaires de ce projet (Cemagref et université de Lyon), en collaboration avec le CEA de Marcoule a démarré en Octobre 2011 sur le couplage de diverses approches protéomiques pour le développement de biomarqueurs chez les invertébrés.

Par ailleurs, le développement d'un test ELISA compétitif, utilisant l'anticorps anti-Vtg produit à façon à partir d'un peptide de synthèse déduit de la séquence nucléique dans le cadre de ce projet, fait actuellement l'objet d'une étude de faisabilité (Millegen, Labège).

Références citées

- Aarab, N., Minier, C., Lemaire, S., Unruh, E., Hansen, P.D., Larsen, B.K., Andersen, O.K., Narbonne, J.F., 2004. Biochemical and histological responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to North Sea oil and to a mixture of North Sea oil and alkylphenols. *Mar. Environ. Res.* 58, 437-441.
- Besse, J.P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard O. 2013. Caged *Gammarus fossarum* (crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters. Toward the determination of threshold values. *Water Research*, 47: 650-660.
- Blaise, C., Gagné, F., Pellerin, J., Hansen, P.D., 1999. Determination of vitellogeninlike properties in *Mya arenaria* hemolymph (Saguenay Fjord Canada): a potential biomarker for endocrine disruption. *Environmental Toxicology* 14, 455–465.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., Forget-Leray, J., 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comp. Biochem. Physiol. A* 147, 841-849.
- Carlson, G. R., Dhadialla, T. S., Hunter, R., Jansson, R. K., Jany, C. S., Lidert, Z. and Slawewski, R. A. (2001). "The chemical and biological properties of methoxyfenozide, a new insecticidal ecdysteroid agonist." *Pest Management Science* 57(2): 115-119.
- Chen, S., Chen, D.F., Yang, F., Nagasawa, H., Yang, W.J., 2011. Characterization and processing of superoxide dismutase-fused vitellogenin in the diapause embryo formation: A special developmental pathway in the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*. *Biol. Reprod.* 85, 31-41
- Ciocan, C.M., Cubero-Leon, E., Puinean, A.M., Hill, E.M., Minier, C., Osada, M., Fenlon, K., Rotchell, J.M., 2010. Effects of estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*, at different stages of gametogenesis. *Environmental Pollution* 158, 2977–2984.
- Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéau H., Garric J., Charles S., Chaumot A. 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research*. 45(19):6417-6429.
- Fent, K., Weston, A. A. and Caminada, D. 2006. "Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76(2): 122-159.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéus, N., Lo Giudice, R., Pollio, A. and Garric, J. 2004. "Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment?" *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(5): 1344-1354.
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2003. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 55, 359–370.
- Ford, A.T., 2008. Can you feminise a crustacean? *Aquat. Toxicol.* 88, 316-321
- Ford, A.T., 2012. Intersexuality in Crustacea: An environmental issue? *Aquat. Toxicol.* 108, 125-129.
- Garcia, J., Munro, E.S., Monte, M.M., Fourier, M.C.S., Whitelaw, J., Smail, D.A., Ellis, A.E., 2010. Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) serum vitellogenin neutralises infectivity of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish Shellfish Immun.* 29, 293-297.
- Geffard A, Quéau H, Dedourge O, Biagianni-Risboug S, Geffard O. 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 145 :632-640.

- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G. and Charmantier-Daures, M. (2010). "Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment." *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(10): 2249-2259.
- Hannas, B. R., Wang, Y. H., Thomson, S., Kwon, G., Li, H. and LeBlanc, G. A. (2011). "Regulation and dysregulation of vitellogenin mRNA accumulation in daphnids (*Daphnia magna*)." *Aquatic Toxicology* 101(2): 351-357.
- Handy, R. D. and Depledge, M. H. (2000). "Physiological responses : Their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology." *Ecotoxicology* 8: 329-349.
- Jayasankar, V., Tsutsui, N., Jasmani, S., Saido-Sakanaka, H., Yang, W. J., Okuno, A., Hien, T. T. T., Aida, K. and Wilder, M. N. (2002). "Dynamics of vitellogenin mRNA expression and changes in hemolymph vitellogenin levels during ovarian maturation in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*." *Journal of Experimental Zoology* 293(7): 675-682.
- Jubeaux G., Simon R., Salvador A., Quéau H., Chaumot A., Geffard O. 2012a. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) : Functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. *Aquatic Toxicology*. 112-113: 72-82
- Jubeaux, G., Audouard-Combe, F., Simon, R., Tutundjian, R., Salvador, A., Geffard, O., Chaumot, A. 2012b. Vitellogenin-like protein among invertebrate species diversity : potentiel of proteomic mass spectrometry (LC-MS/MS) for biomarker development. *Environmental Science & Technology*, 46 : 6315-6323.
- Kato, Y., Tokishita, S., Ohta, T., Yamagata, H., 2004. A vitellogenin chain containing a superoxide dismutase-like domain is the major component of yolk proteins in cladoceran crustacean *Daphnia magna*. *Gene* 334, 157-165.
- Lacaze E. Devaux A., Jubeaux G., Mons R., Gardette M., Bony S., Garric J., Geffard O. 2011b. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure : intrinsic variability and reference level. *Science of the Total Environment*, 409 (17): 3230-3236.
- Laufer, H. and Biccferst, W. J. (2001). "Unifying concepts learned from methyl farnesoate for invertebrate reproduction and post-embryonic development1." *American Zoologist* 41(3): 442-457.
- Langston WJ, Burt GR, Chesman BS, Vane CH. 2005. Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-oestrogens in aquatic environment. *J Mar Biol Ass U.K.* 85:1-31.
- Li, Z., Zhang, S., Liu, Q., 2008. Vitellogenin functions as a multivalent pattern recognition receptor with an opsonic activity. *PLoS ONE* 3.
- Lye, C.M., Bentley, M.G., Clare, A.S., Sefton, E.M., 2005. Endocrine disruption in the shore crab *Carcinus maenas* - A biomarker for benthic marine invertebrates? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 288, 221-232.
- Mak, A. S. C., Choi, C. L., Tiu, S. H. K., Hui, J. H. L., He, J. G., Tobe, S. S. and Chan, S. M. (2005). Vitellogenesis in the red crab *Charybdis feriatus*: Hepatopancreas-specific expression and farnesoic acid stimulation of vitellogenin gene expression. *Molecular Reproduction and Development* 70(3): 288-300.
- Matthiessen P. 2003. Endocrine disruption in marine fish. *Pure Appl Chem* 75, 2249-2261.
- Mu X, LeBlanc, GA. 2004. Synergistic interaction of endocrine disruption chemicals: model development using an ecdysone receptor antagonist and a hormone synthesis inhibitor. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:1085-1091.

- Nagaraju, G. P. C., Suraj, N. J. and Reddy, P. S. (2003). Methyl farnesoate stimulates gonad development in *Macrobrachium malcolmsonii* (H. Milne Edwards) (Decapoda, Palaemonidae). *Crustaceana* 76(10): 1171-1178.
- Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N., Goto, S., 1999. Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 264, 580-583.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2010. Intersex and oocyte atresia in a mussel population from the Biosphere's Reserve of Urdaibai (Bay of Biscay). *Ecotoxicology and Environment Safety* 73, 693-701.
- Quinn, B., Gagné, F., Blaise, C., Costello, M.J., Wilson, J.G., Mothersill, C., 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 142, 118-127.
- Resing K., Ahn N. (2005). Proteomics strategies for protein identification. *Fed. of Eur. Biochem. Soc.* ; vol. 279 : 885 - 889.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., Binelli, A., Marin, M.G., 2010. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. *Water Res.* 44, 1725-1736.
- Rono, M.K., Whitten, M.M.A., Oulad-Abdelghani, M., Levashina, E.A., Marois, E., 2010. The major yolk protein vitellogenin interferes with the anti-plasmodium response in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Biology* 8.
- Sanders, M.B., Billinghamurst, Z., Depledge, M.H., Clare, A.S., 2005. Larval development and vitellin-like protein expression in *Palaemon elegans* larvae following xeno-oestrogen exposure. *Integr. Comp. Biol.* 45, 51-60.
- Seehuus, S.C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., Amdam, G.V., 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 962-967.
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.* 103, 173-178.
- Simon R., Jubeaux G., Chaumot A., Lemoine J., Geffard O., Salvador A. 2010. Mass spectrometry assay as an alternative to the enzyme-linked immunosorbent assay test for biomarker quantitation in ecotoxicology: Application to vitellogenin in Crustacea (*Gammarus fossarum*). *Journal of Chromatography A*, 1217 (31): 5109-5115.
- Suzuki, S., Yamasaki, K., Fujita, T., Mamiya, Y. and Sonobe, H. (1996). Ovarian and hemolymph ecdysteroids in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* (malacostracan crustacea). *General and Comparative Endocrinology* 104(2): 129-138.
- Soetaert, A., Moens, L. N., Van Der Ven, K., Van Leemput, K., Naudts, B., Blust, R. and De Coen, W. M. (2006). Molecular impact of propiconazole on *Daphnia magna* using a reproduction-related cDNA array. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 142(1-2): 66-76.
- Tokishita, S., Kato, Y., Kobayashi, T., Nakamura, S., Ohta, T., Yamagata, H., 2006. Organization and repression by juvenile hormone of a vitellogenin gene cluster in the crustacean, *Daphnia magna*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 345, 362-370.
- Tong, Z., Li, L., Pawar, R., Zhang, S., 2010. Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities. *Immunobiology* 215, 898-902.

- Trisyono, A., Puttler, B. and Chippendale, G. M. (2000). Effect of the ecdysone agonists, methoxyfenozide and tebufenozide, on the lady beetle, *Coleomegilla maculata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 94(1): 103-105.
- Verslycke T, Ghekiere A, Raimondo S and Janssen. 2007 Mysid crustaceans as standard models for screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology*. 16:205-219.
- Wang HY, Olmstead AW, Li H, LeBlanc GA. 2005. The screening of chemicals for juvenoid-related endocrine activity using the water flea *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 74:193-204.
- Xuereb, B., Bezin, L., Chaumot, A., Budzinski, H., Augagneur, S., Tutundjian, R., Garric, J. and Geffard, O. 2011. Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): Functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicology* 20(6): 1286-1299.
- Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology*, 93: 225-233.
- Zapata-Perez, O., Del-Rio, M., Dominguez, J., Chan, R., Ceja, V., Gold-Bouchot, G., 2005. Preliminary studies of biochemical changes (ethoxycoumarin O-deethylase activities and vitellogenin induction) in two species of shrimp (*Farfantepenaeus duorarum* and *Litopenaeus setiferus*) from the Gulf of Mexico. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 98-104.
- Zhang, S., Sun, Y., Pang, Q., Shi, X., 2005. Hemagglutinating and antibacterial activities of vitellogenin. *Fish Shellfish Immun.* 19, 93-95.
- Zhang, S., Wang, S., Li, H., Li, L., 2011. Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 303-305.

