Anguilles américaines et européennes en voie de maturation sexuelle :

Les contaminants perturbent-ils le potentiel de reproduction des anguilles en déclin ?

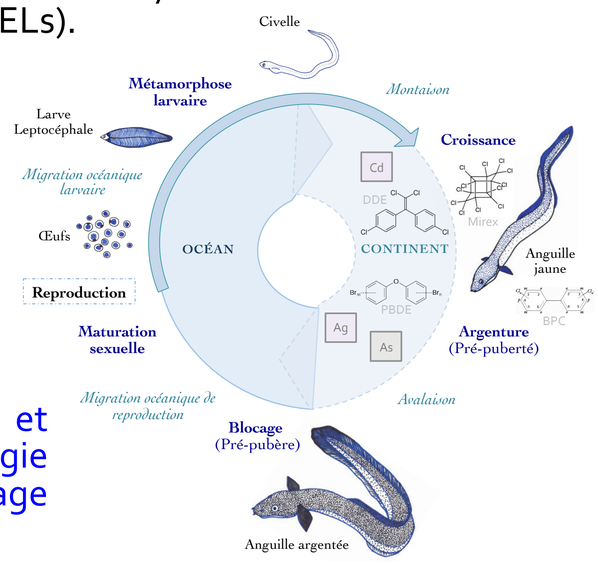
Audrey Moffett[1,2], Magalie Baudrimont[3], Sylvie Dufour[2] et Patrice Couture[1]

[1] Institut national de la recherche scientifique – Centre Eau Terre Environnement, 490 rue de la Couronne, G1K 9A9, Québec, Qc, Canada
[2] UMR BOREA, Biologie des ORganismes et Ecosystèmes Aquatiques, Muséum National d'Histoire Naturelle, CNRS-7208, IRD-207, UPMC, 7 rue Cuvier, CP 32, 75231, Paris, France
[3] UMR EPOC, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux, Équipe Ecotox. Aquatique, Station Marine, CNRS-5805, Université de Bordeaux, Place du Dr Peyneau, 33120, Arcachon, France

Mise en contexte

L'état des anguilles américaines (*Anguilla rostrata*) et européennes (*Anguilla anguilla*), en particulier celui des géniteurs, pourrait faire partie des raisons possibles du déclin de leurs populations. Entre autres, l'évaluation à long terme de l'impact des contaminants sur la capacité de migration et de reproduction des migrants devrait être mise de l'avant afin d'améliorer les connaissances sur l'état des géniteurs potentiels, la prémisse de fondement de cette étude doctorale. Elle correspond au dernier volet encadré par le projet IMMORTEEL (IMpacts of Metallic and ORganic contaminations of the Gironde and St Laurent systems on two Threatened species, the European and American EELs).

Les anguilles jaunes (juvéniles) grandissent pendant une très longue période en eaux continentales où elles sont exposées à de multiples contaminants. Une fois argentées (pré-pubères), elles retournent vers leur lieu de naissance en mer des Sargasses pour se reproduire.



Les futurs géniteurs sont à jeûn et reposent sur leurs réserves pour l'énergie et les constituants nécessaires à la nage et au développement des gonades.

Les contaminants bioaccumulés pourraient être la cause d'une perturbation dans l'allocation de ces réserves et dans la communication neuro-endocrinienne assurant leur plein développement sexuel (gonades).

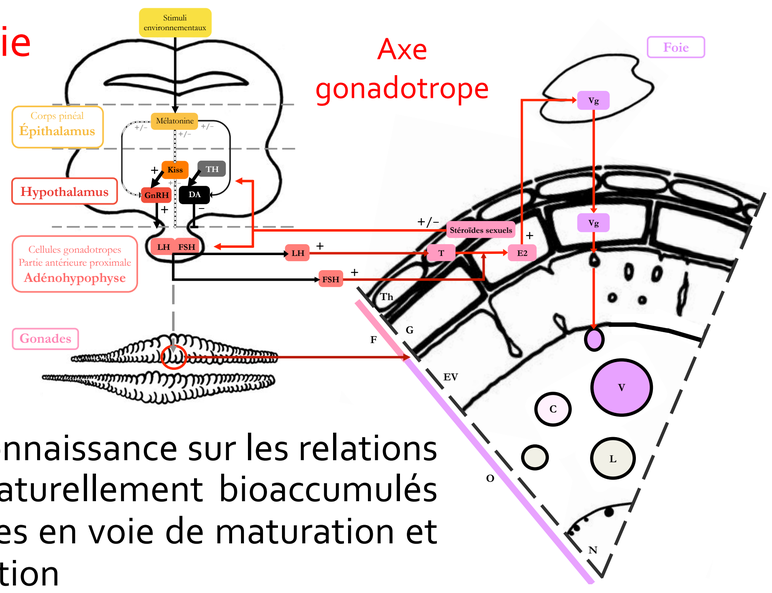
Objectifs

1) Améliorer l'état de la connaissance sur la biologie de reproduction d'anguilles argentées migrantes en voie de maturation sexuelle

- Neuro-endocrinologie
- Réserves
- Développement ovarien

↓

- Potentiel de reproduction



2) Améliorer l'état de la connaissance sur les relations entre les contaminants naturellement bioaccumulés dans les tissus des anguilles en voie de maturation et leur potentiel de reproduction

- Distribution des [contaminants] → VS Potentiel de reproduction

Contaminants organiques

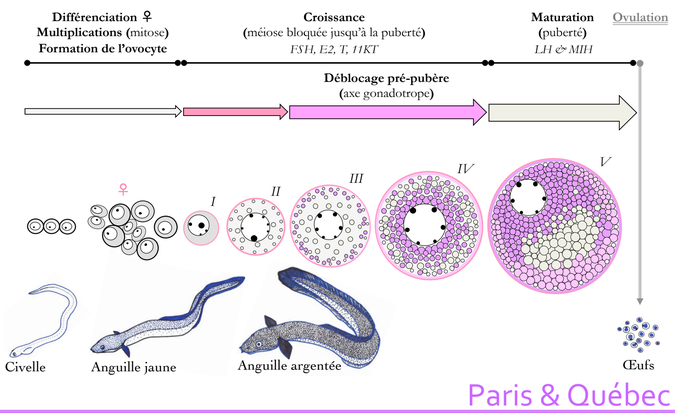
Concentrations tissulaires
(Muscle – ovaires) GPC-ECD
UMR EPOC-LPTC (données communes)

No.	PESTICIDES ORGANOCHLORÉS	Abbréviation	Synonyme	Formule chimique
1	2,4'-Dichloro diphényldichloro éthylène	O,P'-DDE	2,4'-DDE	$C_{14}H_8Cl_4$
2	4,4'-Dichloro diphényldichloro éthylène	P,P'-DDE	4,4'-DDE	$C_{14}H_8Cl_4$
3	2,4'- Dichloro diphényl dichloroéthane	O,P'-DDD	2,4'-DDD	$C_{14}H_{10}Cl_4$
4	4,4'- Dichloro diphényl dichloroéthane	P,P'-DDD	4,4'-DDD	$C_{14}H_{10}Cl_4$
5	2,4'-Dichloro diphényl trichloroéthane	O,P'-DDT	2,4'-DDT	$C_{14}H_9Cl_5$
6	4,4'-Dichloro diphényl trichloroéthane	P,P'-DDT	4,4'-DDT	$C_{14}H_9Cl_5$
7	Hexachlorobenzène	HCB	Perchloro-benzène	C_6Cl_6
8	Lindane	γ-HCH	Hexachloro-cyclohexane gamma (γ)	$C_6H_6Cl_6$
9	Heptachlore		Heptachlor-enzypyrene	$C_{10}H_5Cl_7$
10	Époxyheptachlore		Heptachlor epoxide	$C_{10}H_5Cl_7O$
11	Cis-chlordane	CC	α-[cis] chlordane	$C_{10}H_6Cl_8$
12	Trans-nonachlore	TN	T-nonachlor	$C_{10}H_5Cl_9$
13	Dodécachloropentacyclo [5.3.0.0^{2,6}.0^{3,9}.0^{4,8}]- décane		Mirex	$C_{10}Cl_{12}$
14	Somme des 13 pesticides organochlorés	OCP sum		

No.	COMPOSÉS INDUSTRIELS	Abbréviation	Synonyme	Formule chimique
1	BPCs 28+50		Tri-BPC + Tétra-BPC	$C_{12}H_7Cl_3$ + $C_{12}H_6Cl_4$
2	BPC 52		Tétra-BPC	$C_{12}H_6Cl_4$
3	BPC 101		Penta-BPC	$C_{12}H_5Cl_5$
4	BPC 118		Penta-BPC	$C_{12}H_5Cl_5$
5	BPC 138		Hexa-BPC	$C_{12}H_4Cl_6$
6	BPC 153		Hexa-BPC	$C_{12}H_4Cl_6$
7	BPC 180		Hepta-BPC	$C_{12}H_3Cl_7$
8	Somme des 7 biphényles polychlorés	PCB sum		
1	PBDE 28		Tri-PBDE	$C_{12}H_7Br_3O$
2	PBDE 47		Tétra-PBDE	$C_{12}H_6Br_4O$
3	PBDE 49		Tétra-PBDE	$C_{12}H_6Br_4O$
4	PBDE 99		Penta-PBDE	$C_{12}H_5Br_5O$
5	PBDE 100		Penta-PBDE	$C_{12}H_5Br_5O$
6	PBDE 153		Hexa-PBDE	$C_{12}H_4Br_6O$
7	PBDE 154		Hexa-PBDE	$C_{12}H_4Br_6O$
8	PBDE 183		Hepta-PBDE	$C_{12}H_3Br_7O$
9	PBDE 209		Deca-PBDE	$C_{12}Br_{10}O$
10	Somme des 9 polybromodiphényléthers	PBDE sum		

Développement ovarien

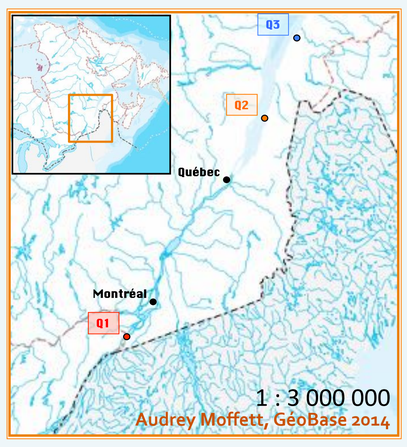
Quantification du stade de maturité
Coloration des ovaires sur lame à l'hématoxyline et à l'éosine
Microscope + photo → Analyse d'images



Paris & Québec

Sites de capture

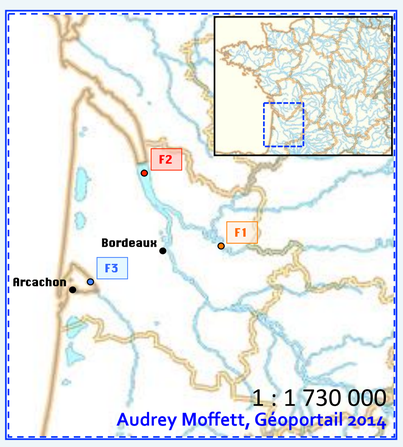
Fleuve St-Laurent, Québec



Q1 Lac St-François (Tronçon fluvial)
Q2 Rivière Ouelle (Estuaire moyen)
Q3 Rivière du Sud-Ouest (Rivière en aval, près de l'estuaire moyen)

LARSA 2012 (Audrey Moffett)
Québec

Adour-Garonne, France



F1 Rivière Dordogne (Estuaire Gironde fluvial)
F2 Estuaire Gironde Amont
F3 Domaine de Certes (Bassin d'Arcachon Amont, en aval du bassin versant de la Leyre)

IRSTEA 2013 (Sarah Bureau Du Colombier)
Saint-Seurin-sur-l'Isle

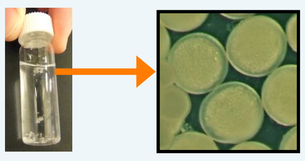
Maturation artificielle

Injection d'extrait hypophysaire de saumon
SPE

Site	Témoins Semaine -10 Dissections Initiales	Maturation artificielle Semaine 1 Injections Saline	Semaine 1 Injections SPE	Semaine 8 Dissections SPE	Semaine 12 Dissections Saline	Semaine 12 Dissections SPE	n
Q1	8	4	12	6	4	6	24
Q2	7	4	12	6	4	6	23
Q3	1	1	2	1	1	1	4
	16	9	26	13	9	13	51

15 °C	0,14 m·s^{-1}	12 km·jr^{-1}

Suivi de la maturation : Biopsie des ovaires
Semaines 10-11



Injection d'extrait hypophysaire de carpe
CPE

Site	Témoins Semaine 1 Dissections Initiales	Maturation artificielle Semaine 1 Injections Saline	Semaine 1 Injections CPE	Semaine 11 Dissections Saline	Semaine 12 Dissections CPE	Semaine 12 Dissections CPE	n
F1	NA	NA	3	NA	3	NA	3
F2	5	NA	10	NA	5	5	15
F3	8	6	8	6	5	3	22
	13	6	21	6	13	8	40

15 °C	0,16 m·s^{-1}	14 km·jr^{-1}

Suivi de la maturation : Échographie par ultrasons
Bureau du Colombier *et al.* Soumis

Diamètre de 0,72 mm après 10 injections reçues (SPE, n=2)

Paramètres

Contaminants – Réserves – Neuro-endocrinologie – Développement ovarien

Contaminants inorganiques

Concentrations tissulaires
(Muscle – foie – rein – ovaires)
ICP-MS & ICP-AES
INRS-ETE (données communes)

Cr 24, Ni 28, Cu 29, Zn 30, As 33, Se 34, Ag 47, Cd 48, Hg 80, Pb 82

Réserves (Muscle – foie – ovaires)

Protéines
Méthode colorimétrique à l'acide bicinchoninique, Smith *et al.* 1985

Glucides
Méthode colorimétrique à l'acide trichloroacétique, De Coen & Janssen 2003

Lipides
Muscle & ovaires : Méthode gravimétrique, Tapie *et al.* 2011 (données communes)
Foie : Méthode colorimétrique à l'acide sulfurique De Coen & Janssen 2003

Québec

Neuro-endocrinologie

Expression de gènes de l'axe gonadotrope
(Cerveau – hypophyse – foie – ovaires)

PCR quantitative en temps réel (qPCR)
Thermocycleur avec carrousel couplé à un spectrofluoromètre
Mesure de l'émission de fluorescence de l'ADNc amplifié (kit *Roche*)

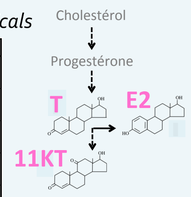
Extraction d'ARN$_{total}$ (tissus) → Transcription inverse en ADNc → qPCR

Conditions d'opération de la qPCR
- 10 min à 95 °C : pré-incubation d'activation de l'ADN polymérase *Taq*
- 41 à 51 cycles d'amplification :
  - 15 sec à 95 °C : Doubles brins d'ADN → Simples brins (dénaturation)
  - 5 sec à 60 °C : Appariement des amorces
  - 10 sec à 72 °C : Synthèse du brin complémentaire (élongation)
  - 5 sec à 83 °C : Désappariement des amorces
- 0,1 °C·sec^{-1} : Abaissement graduel de température (courbe de fusion)

Courbe standard pour chaque gène et espèce (Ct (y) **vs** log [gène] (x))
Efficacité de la qPCR = [(10^{-pente}) -1] x 100

Concentration en stéroïdes sexuels
(Plasma)
Dosages immuno-enzymatiques colorimétriques de type compétitif
Testostérone (T)
11-cétotestostérone (11KT)
Estradiol (E2)
Kits *Eurobio* & *Cayman chemicals*

Gène	Amorces	Efficacité de la qPCR
GnRH1	Sébert *et al.* 2008	*A. anguilla* 95,8 % *A. rostrata* 93,8 %
GnRH2	Cette étude	*A. anguilla* 106,4 % *A. rostrata* 101,7 %
FSHβ	Aroua *et al.* 2007	*A. anguilla* 99,2 % *A. rostrata* 103,4 %
LHβ	Aoura *et al.* 2007	*A. anguilla* 97,9 % *A. rostrata* 95,1 %
Vg	Pierron *et al.* 2008	*A. anguilla* 102,3 % *A. rostrata* 99,4 %
esr1 (récepteur à estrogène ERα)	Lafont *et al.* En prep.	*A. anguilla* 103,4 % *A. rostrata* 103,8 %
βActine (référence)	Aoura *et al.* 2007	*A. anguilla* 90,5 % *A. rostrata* 95,9 %
ARNr S18 (référence)	Cette étude	*A. anguilla* 102,0 % *A. rostrata* 98,8 %



Paris

Aroua *et al.* 2007. Gen. Comp. Endocrinol., Bureau du Colombier *et al. Soumis*. Fisheries Research, De Coen & Janssen 2003. Environ. Toxicol. Chem., Pierron *et al.* 2008. Environ. Sci. Technol., Sébert *et al.* 2008. J. Neuroendocrinol., Smith *et al.* 1985. Anal. Biochem., Tapie *et al.* 2011. Chemosphere

14 -16 mai 2014 – Toulouse, France
Colloque gagilau
Ga Garonne Gi Gironde Lau St-Laurent