



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ DE METZ – UFR Sci F.A.

LABORATOIRE D'ÉCOTOXICITE, SANTE ENVIRONNEMENTALE

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de Metz

Présentée en vue de l'obtention du grade de

Docteur ès Sciences

mention « Toxicologie de l'Environnement »

**Toxicité et effets sur le développement d'*Hydra attenuata*
des polluants hydriques et du nonylphénol (NP).**

PACHURA-BOUCHET Sophie

12 décembre 2005

Membres du jury :

Docteur H. FENET, Université de Montpellier – Rapporteur

Professeur M. GUERBET, Université de Rouen – Rapporteur

Professeur C. CASELLAS, Université de Montpellier - Examineur

Professeur J.F. FÉRARD, Université de Metz – Examineur

Professeur P. VASSEUR, Université de Metz – Directeur de thèse

A mon plus beau résultat de thèse...

Baptiste

Comme le veut la tradition, je vais tenter de satisfaire au difficile exercice de la page des remerciements (qui en fera deux), peut-être la plus ardue de ces années de thèse. Je me rend déjà bien compte qu'une simple page est bien courte pour remercier les nombreuses personnes en qui j'ai trouvé un soutien.

Pour les non initiés il faut savoir que le thésard est un peu comme un yo-yo : il connaît beaucoup de bas, très peu de hauts. Mais comme le yo-yo il y a toujours une main pour le soutenir dans la réalisation de son travail, et pour moi cette main a été Paule VASSEUR. Elle m'a accueilli au sein du laboratoire ESE et sans elle ce travail n'existerait pas. Elle a su me laisser la liberté nécessaire à l'accomplissement de mes travaux, mais avec une disponibilité sans égale qui m'a permis de me sentir continuellement soutenu. Merci de m'avoir guidé tout au long de ma thèse et prodigué de précieux conseils, qui m'ont fait « grandir ».

Je remercie, et demande également pardon, aux rapporteurs qui ont accepté de lire 1 kg de thèse et d'en faire état d'en le court laps de temps qui leur était impartit. Merci au professeur Michel GUERBET et au docteur Hélène FENET. Je remercie également le professeur Claude CASELLAS et le professeur Jean-François FERARD pour leur participation au jury de cette thèse et pour leurs critiques.

Je remercie toute la grande famille de l'ESE pour son soutien, son aide et son amitié, et en particulier la bande des « méchantes femmes ».

Un grand merci à Anne-Marie. Sa « vieille » expérience lui ayant enseigné que « l'on a toujours besoin de quelqu'un », elle a su persévéré et me prendre par le bon bout. Merci pour son accueil dans l'ancre de la R4, pour toute son aide technique et ses remarques constructives. Mais aussi un grand merci pour les nombreuses discussions (chuttt !), en particulier artistiques, pas très constructives il est vrai pour la thèse, mais en béton armé pour le moral. Je lui promets de ne pas l'oublier si notre projet voit le jour...

Merci également à notre WWM (Wonder Woman Marilyne), ouvert 24/24h : bureau des pleurs, photographe à temps perdu, gardiennage d'enfant et de temps en temps secrétaire, elle m'a été d'un grand secours dans les moments difficiles. Je lui dois également en partie ce travail....

Merci à Claudine, Carole, Rosy, pour leurs aides et leurs discussions, sérieuses ou non. Vous m'avez également souvent rendu le moral...

Merci à tous les ex-étudiants de l'ESE avec qui j'ai passé d'agréables moments au labo comme à « l'extérieur ». En particulier, merci à Stéphanie qui m'a fait voir la vie du bon côté et appris à relativiser ; Marie-Aline pour son aide précieuse, son amitié et sa participation active au mémoire (Figure 12) ; Merci à Sylvie et Anne-Marie.

Merci également aux autres doctorants et étudiants du labo : Christophe, Stéphanie, Périne, Marc, Eric, Renaud, Pascal, Yann, Ig-Chun.

Un grand merci à toutes les secondes mamans hydres, qui m'ont remplacé au biberon d'artémies durant mes absences.

Merci à tous les correcteurs(-trices) de ce mémoire qui ont eu le courage de relire ces quelques pages et en particulier à Christelle (1979) qui a bien pensé utiliser ce papier comme combustible.

Un merci à toute ma famille et ma belle-famille.

Merci à Alex pour tout...

Liste des figures	4
Liste des tables	6
Table des abréviations	8
Liste des publications et communication	10

INTRODUCTION	12
---------------------------	----

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
---------------------------------------	----

<i>Chap. I - ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA BIOLOGIE DE L'HYDRE</i>	15
I.1. - ÉCOLOGIE DE L'HYDRE D'EAU DOUCE	15
I.2. - MORPHOLOGIE	16
I.3. - HISTOLOGIE	16
I.4. - DÉVELOPPEMENT ET REPRODUCTION	18
I.5. - RENOUVELLEMENT CELLULAIRE ET CYCLE CELLULAIRE	18
I.6. - ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LA RÉGÉNÉRATION DE L'HYDRE	20
I.6.1. - Les différentes étapes des processus de régénération	20
I.6.2. - Aspect cellulaire de la régénération et notion de substances morphogènes...21	
I.6.3. - Aspects moléculaires de la régénération	22
I.6.4. - Aspects génétiques de la régénération	24

<i>Chap. II - UTILISATION DES HYDRES ADULTES ET EMBRYONS ARTIFICIELS DANS DES TESTS DE TOXICITÉ</i>	25
II.1. - RATIO A/D	26
II.2. - COMPOSÉS ŒSTROGÉNIQUES	26
II.3. - MOLÉCULES PHARMACEUTIQUES	27
II.4. - ETHERS DE GLYCOLS	30
II.5. - EFFETS DES SOLVANTS	32
II.6. - MÉTAUX	32
II.7. - PESTICIDES	33

<i>Chap. III - LE NONYLPHÉNOL (NP) ET LA PROBLÉMATIQUE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS</i>	34
III.1. - PRODUCTION DU NONYLPHÉNOL	34
III.2. - POTENTIEL ŒSTROGÉNIQUE DU NONYLPHÉNOL	36
III.3. - TOXICITÉ AIGUË	36
III.4. - TOXICITÉ CHRONIQUE	37

<i>Chap. IV - APOPTOSE CHEZ L'HYDRE, INDUCTION PAR LE NONYLPHÉNOL</i>	39
IV.1. - MÉCANISMES APOPTOTIQUES	39
IV.2. - APOPTOSE CHEZ L'HYDRE	40
IV.2.1. - Rôle dans la gamétogenèse (oogenèse, spermatogenèse)	41
IV.2.2. - Système immunitaire	42
IV.2.3. - Apoptose et état physiologique	42
IV.3. - INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LE NONYLPHÉNOL	43

MATÉRIELS ET MÉTHODES	45
I. - PROTOCOLE D'ÉLEVAGE DES HYDRES	45
I.1. - Milieu de culture	45
I.2. - Protocole d'alimentation et de nettoyage de la culture	45
II. - PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX DES TESTS HYDRE SUR ADULTE ET EMBRYON	47
II.1. - Toxicité sur la survie de l'adulte	47
II.2. - Toxicité sur le développement des hydres	48
III. - SUBSTANCES CHIMIQUES ÉTUDIÉES	50
III.1. - Partie I : Criblage de toxicité	50
III.2. - Partie II : Application du modèle hydre à l'étude spécifique du nonylphénol	50
III.2.1. - Préparation de la solution de nonylphénol	50
III.2.2. - Quantification du nonylphénol par HPLC	51
III.2.2.1. - Préparation de la solution de nonylphénol avant analyse	51
III.2.2.2. - Mesures par HPLC	52
III.2.3. - Les essais nonylphénol	52
III.2.3.1. - Essais court terme	52
III.2.3.2. - Essais long terme	52
IV. - ANALYSES STATISTIQUES	53
V. - PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX POUR L'APOPTOSE ET EXPRESSION DES CASPASES-3	54
V.1. - Analyse de la fragmentation apoptotique de l'ADN par "DNA ladder"	54
V.1.1. - Dosage de l'ADN	55
V.1.2. - Traitements des hydres pour l'analyse de la fragmentation de l'ADN	55
V.1.2.1. - Analyse du niveau basal d'apoptose : apoptose et jeûne	55
V.1.2.2. - Intoxication par le nonylphénol et induction de l'apoptose	56
V.2. - Étude de l'expression des gènes caspase-3A et caspase-3B en RT-PCR	56
V.2.1. - Traitement des hydres pour l'analyse de l'expression des caspases	56
V.2.2. - Isolation de l'ARN pour l'analyse par RT-PCR	57
V.2.3. - Dosage de l'ARN	57
V.2.4. - La transcription inverse (RT)	57
V.2.5. - La PCR (Polymerase Chain Reaction)	58
VI. - SÉQUENÇAGE DES GÈNES CODANT POUR LES CASPASES-3A ET -3B	60

RÉSULTATS	61
<u>PARTIE I</u> - Criblage de la toxicité de diverses substances chimiques.....	62
<i>I.1. - Criblage de la toxicité et des effets sur le développement de 37 substances chimiques à l'aide du modèle hydre</i>	<i>63</i>
<i>II.2. - Toxicité de substances médicamenteuses sur le modèle hydre</i>	<i>65</i>
<u>PARTIE II</u> - Étude des effets toxiques du nonylphénol (NP).....	68
<i>II.1. - Étude de la toxicité du nonylphénol chez l'hydre adulte (article 1)</i> 4-Nonylphénol induit la toxicité et l'apoptose chez <i>Hydra attenuata</i>	<i>69</i>
<i>II.2. - Étude de la toxicité du nonylphénol chez l'embryon (article 2)</i> Toxicité du nonylphénol chez le cnidaire <i>Hydra attenuata</i> et évaluation de risque pour l'environnement.....	<i>71</i>
<i>II.3. - Le nonylphénol induit des malformations sur le développement des cnidaires Hydra attenuata</i>	<i>73</i>
<u>PARTIE III</u> - Étude de l'apoptose chez l'hydre	77
<i>III.1. - Niveau basal d'apoptose chez l'hydre et influence du jeûne</i>	<i>77</i>
<i>III.2. - Expression des caspases-3 chez l'hydre.....</i>	<i>80</i>
DISCUSSION	82
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	93
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	95
ANNEXES	114

Liste des figures

Figure 1. Anatomie d'une hydre	14
Figure 2. Morphologie d'une hydre d'eau douce	14
Figure 3. Les différentes lignées cellulaires chez l'hydre et leur devenir	15
Figure 4. Capacités de régénération chez <i>Hydra attenuata</i>	18
Figure 5. Gradients de concentrations des peptides AC (activateur céphalique) et AP (activateur du pied) chez l'hydre	21
Figure 6. Position et diversification du phylum des cnidaires	22
Figure 7. Devenir des substances pharmaceutiques dans l'environnement.....	25
Figure 8. Schéma général représentant les deux voies d'activation principales de la mort cellulaire.	37
Figure 9. Représentation schématisée des changements morphologiques des voies apoptotique et nécrotique	38
Figure 10. Morphologies du polype <i>Hydra</i> à partir de son apparence normale (score 10) jusqu'à la désintégration totale (score 0), en passant par des étapes intermédiaires de tentacules bulbées (score 8), tentacules raccourcies (score 6) et phase « tulipe » (score 5).	46
Figure 11. Développement d'une hydre adulte complète à partir d'une section gastrique. Cette dernière est isolée après élimination des zones apicale et basale (Berking, 1997)	47
Figure 12. Profil électrophorétique des fragments d'ADN apoptotiques (DNA ladder).....	52
Figure 13. Toxicité de divers polluants environnementaux obtenus avec le modèle hydre.....	61
Figure 14. Toxicité de 10 substances médicamenteuses sur la survie et le développement de <i>Hydra attenuata</i> , exprimée par la CL ₅₀ -96h (concentration létale induisant 50% de mortalité après 96h d'exposition).	64
Figure 15. Profil électrophorétique de l'ADN démontrant de l'apoptose chez l'hydre adulte dans deux expérimentations indépendantes (a, b). Exposition au nonylphénol (NP) durant 1 et 5h. Ligne 0: témoin; lignes 1 et 2: concentrations correspondant aux concentrations létales induisant 50% (CL ₅₀) et 100% (CL ₁₀₀) de mortalité, respectivement	67
Figure 16. Morphologie de l'embryon durant la régénération normale à partir d'une section gastrique (a ; score 3) à une hydre normale comprenant une bouche, 4 à 6 tentacules et un pied (e ; score 10). Différentes des étapes intermédiaires avec formation des bourgeons de tentacules (c ; score 6) puis une bouche , 4 tentacules ou moins, et un disque basal (d ; score 8).....	69

Figure 17. Toxicité du NP sur le court terme sur les vertébrés et invertébrés d'eau douce pour la mortalité (□), reproduction (○), production de vitellogénine (v) et développement (◇). Les symboles vides ou pleins représentent les résultats chez les adultes et les juvéniles, respectivement. Les valeurs sont exprimées en concentrations mesurées (italique pour le nominal) 70bis

Figure 18. Toxicité du NP sur le long terme chez les vertébrés et invertébrés d'eau douce pour la mortalité (□), reproduction (○), production de vitellogénine (v) et développement (◇). Les symboles vides ou pleins représentent les résultats chez les adultes et les juvéniles respectivement. Les valeurs sont exprimées en concentrations mesurées (italique pour le nominal) 70ter

Figure 19. Échantillon représentatif de tronçons gastriques en développement exhibant des tentacules anormales (tentacules bifides; flèches) observés après 96h (a) et 8j (b) d'expositions à 1% (nominale) de solution saturée en de 4-nonylphénol 71

Figure 20. Effets toxiques du nonylphénol (NP) sur les hydres adultes et les tronçons gastriques. Relation entre scores, concentrations et temps d'exposition au NP. Résultats obtenus à partir de 2 expérimentations ($n = 6$) utilisées pour établir un score moyen. 72

Figure 21. Dénombrement des hydrantes chez des hydres adultes et embryons après 10j d'exposition au NP 73

Figure 22. Évolution de la fragmentation d'ADN au cours du temps, en fonction du nombre de jour de jeûne 75

Figure 23. Évolution de l'apoptose en fonction du nombre de jour de jeûne. Fragmentation de l'ADN chez des hydres à jeun 1j et absence d'apoptose après 5j de jeûne..... 76

Figure 24. Analyse de l'expression des caspases-3 chez des hydres adultes et embryons témoins à 1, 2, 3, et 4j de jeûne. CA = Caspase-3A ; CB = Caspase-3B..... 78

Figure 25. Récapitulatif des différentes valeurs obtenues pour l'évaluation de risque du nonylphénol et des résultats obtenus chez *H. attenuata* adulte et embryon..... 87

Liste des tables

Table 1. Toxicité de divers produits chimiques évaluée avec le test hydre.....	23
Table 2. Concentrations environnementales (µg/L) de différentes molécules médicamenteuses dans les effluents, les eaux de surface ou les eaux de source.....	26
Table 3. Potentiel toxique des éthers de glycol chez l'hydre (<i>H. attenuata</i>) adulte et chez l'embryon sous forme d'amas cellulaire (Johnson et al., 1984) ou de tronçon gastrique (Bowden et al., 1995).....	29
Table 4. Structures, noms et abréviations de la plupart des métabolites importants des polyéthoxylates d'alkylphénols (APnEOs), composés principalement par les polyéthoxyltes de nonylphénol (NPnEOs) et d'octylphénol (OPnEOs)	33
Table 5. Toxicité aiguë du nonylphénol sur les vertébrés et invertébrés d'eau douce.	35bis
Table 6. Toxicité chronique de nonylphenol sur les vertébrés et invertébrés d'eau douce	35ter
Table 7. Caractéristiques générales des substances entrant dans la composition du milieu hydre	43
Table 8. Clé de détermination de la morphologie de l'hydre lors d'une exposition à un agent toxique (Wilby, 1988)	46
Table 9. Clé de détermination de la morphologie de la section gastrique en développement (Wilby, 1988)	47
Table 10. Caractéristiques générales des 39 substances testées sur le modèle hydre	48
Table 11. Caractéristiques générales des 10 substances médicamenteuses testées dans le cadre du programme PNETOX.....	49
Table 12. Séquences des différentes étapes du protocole d'extraction et de précipitation de l'ADN à partir des hydres entières ; Utilisation du kit « Suicide-Track™ DNA Ladder Isolation Kit ».....	52
Table 13. Séquences des différentes étapes du protocole d'extraction de l'ARN total à partir d'hydres entières ; Utilisation d'une solution d'Extract-All.	55
Table 14. Préparation de la transcriptase inverse (RT).	56
Table 15. Préparation pour la PCR.....	57
Table 16. Caractéristiques des amorces utilisées pour les étapes de PCR	57
Table 17. Toxicité et ratio A/D obtenus avec le modèle hydre, vis à vis de divers polluants environnementaux.	62
Table 18. Résultats de la toxicité de 10 substances médicamenteuses sur la survie de l'hydre adulte (A) et la régénération des tronçons gastriques (D).	64

Table 19. Comparaison de la toxicité de 10 molécules médicamenteuses sur différentes espèces 65

Table 20. Toxicité aiguë du nonylphénol (NP) sur l'hydre adulte exprimée par les concentrations létales ($\mu\text{g/L}$) induisant 50% (LC50) et 10% (LC10) de mortalité après 96h d'exposition à différentes dilutions de solution saturée..... 68

Table 21. Valeurs de LOEC (lowest effective concentrations) réduisant significativement la survie des animaux exposés comparé au témoin après 96h d'exposition. Ratios A/D des valeurs de LOEC à partir de la létalité des adultes (A) et du développement des embryons (D) pour chaque série d'expérimentation. Les LOEC sont exprimées en pourcentage de solution saturée en NP dans le milieu test..... 70

Table 22 . Séquences des caspases-3A et -3B chez *H. attenuata*..... 77

Table 23. Comparaison des ratios A/D obtenus chez *Hydra* et chez les mammifères 82

Table des abréviations

2,4-D 2,4 dichlorophénoxy acétique acide

A

A	Adulte
A/D	Ratio des valeurs de toxicité chez l'adulte (A) sur l'embryon (D)
AC	Activateur céphalique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
A-MEC	Adult-minimal effective concentration
AMPc	Adénosine mono-phosphate cyclique
AP1EC	Alkylphenol mono-ethoxy carboxylic acid
AP1EO	Alkylphenol monoethoxylate
AP2EC	Alkylphenol di-ethoxy carboxylic acid
AP2EO	Alkylphenol diethoxylate
APEs	Alkylphenols polyethoxylates
APmECs	Alkylphenol polyethoxy carboxylic acids
APnEOs	Alkylphenol polyethoxylates
APs	Alkylphenols
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager

B

BAPN	Beta-aminopropionitrile
BET	Bromure d'éthidium
BPA	Bisphénol A

C

CaCl ₂	Chlorure de calcium
Cat	Catalogue
CL ₁₀	Concentration létale pour 10% des individus
CL ₁₀₀	Concentration létale pour 100% des individus
CL ₅₀	Concentration létale pour 50% des individus
CTV	Valeur de toxicité critique

D

D	Développement
dATP	désoxy-adénosine triphosphate
dCTP	désoxy-cytosine triphosphate
DEHP	Di(2-ethylhexyl) phthalate
DEPC	Diéthyl-pyrocabamate
DGEE	Diéthylène glycol monoethyl éther
dGTP	désoxy-guanosine triphosphate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
dNTP	désoxy-Nucléotides triphosphate
DO	Densité optique
DP	Dibutyl phthalate
dTTP	désoxy-thymine triphosphate

E

EC ₁₀	Concentration effective pour 10% des individus
EC ₅₀	Concentration effective pour 50% des individus
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EE2	17alpha-ethinylestradiol
EGBE	Ethylène glycol monobutyl éther
EGEE	Ethylène glycol monoéthyl éther
EGEEA	Ethylène glycol monoéthyl éther acétate
EGME	Ethylène glycol monométhyl éther
EGS	Ethylène glycol monosalicylate
EGTA	Ethylène glycol tetra-acetic acide
ENEV	Valeur sans effet pour l'environnement
ENIMED	Effet Non Intentionnels des MEDicaments
EtOH	Éthanol
EU RAR	European Union - Risk Assessment Report

F

FACR	Ratio final aigu sur chronique
FAV	Valeur aiguë finale
FETAX	Frog Embryo Teratogenesis Assay
FCV	Valeur chronique finale

G

GMAV	Valeur aiguë moyenne pour les genres
------	--------------------------------------

H

H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HL-60	Lignée lymphocytaire humaine

I

IC	Inhibiteur céphalique
IC ₁₀	Concentration inhibant 10% des effets
IC ₅₀	Concentration inhibant 50% des effets
ICp	Inhibition concentration approach
IDEA	Identification of endocrine disrupting effects in aquatic organisms

K

KMnO ₄	Permanganate de potassium
Koc	Coefficient d'adsorption sur le carbone organique
Kow	Coefficient de partage octanol/eau

L

LOAEC	Low observed adverse effect concentration
LOAEL	Low observed adverse effect level
LOEC	Low observed effect concentration

LOEL Low observed effect level

M

M Mitose
MgCl₂ Chlorure de magnésium

N

NaOH Soude (Hydroxyde de sodium)
N° CAS Chemical Abstract Substance Registry Number
NOAEL No observed adverse effect level
NOEC No observed effect concentration
NOEL No observed effect level
NP Nonylphénol
NP1EC Nonylphenol mono-ethoxy carboxylic acid
NP1EO Nonylphenol monoethoxylate
NP2EC Nonylphenol di-ethoxy carboxylic acid
NP2EO Nonylphenol diethoxylate
NPmECs Nonylphenol polyethoxy carboxylic acids
NPnEOs Nonylphenol polyethoxylates
NPs Nonylphenols

O

OCDE Organisation for economic co-operation and development
OP1EC Octylphenol mono-ethoxy carboxylic acids
OP1EO Octylphenol monoethoxylate
OP2EC Octylphenol di-ethoxy carboxylic acid
OP2EO Octylphenol diethoxylate
OPmECs Octylphenol polyethoxy carboxylic acids
OPnEOs Octylphenol polyethoxylates
OPs Octylphenols
OSPAR

P

pb Paire de bases
PC12 Phéochromocytome de rat
PCR Polymerase chain reaction
PE Perturbateur endocrinien

PEC Predictive environmental concentration
PKC Protéine kinase C
PNEC Predictive no effect concentration
PNETOX Programme national d'Ecotoxicologie
ppb Partie par milliard
ppm Partie par million

R

RT-PCR Reverse transcription & polymerase chain reaction
RXR Récepteurs X rétinoïdes

S

S Duplication de l'ADN (Mitose)
SCC 1483 Lignée cellulaire humaine de carcinome buccal
SDS Dodécyl sulfate de sodium
SMAV Valeur aiguë moyenne pour les espèces

T

T₅₀ Concentration induisant 50% de toxicité chez l'adulte
TAE Tampon Tris-acétate-EDTA
TBT Tributylétain
TBTO Oxyde de tributylétain
TES N-Tris (hydroxyméthyl) méthyl 1-2-aminoethanesulfonic acid
TG Tronçon gastrique
TGDME Triéthylène glycol diméthyl éther
TNF Tumor necrosis factor
TPA 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate
TUNNEL TdT-mediated X-dTUTP Nick End Labelling

U

U.S.EPA United states Environmental Protection Agency
UV Ultra-violet

V

V Volume
v/v Volume/Volume

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles acceptés ou soumis :

Toxicity of 4-nonylphenol and apoptosis in *Hydra*.

PACHURA S, CAMBON JC, BLAISE C, VASSEUR P.

Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, volume 24, Issue 12, p 3085-3091

Toxicity of nonylphenol on the cnidarian *Hydra attenuata* and environmental risk assessment.

PACHURA S, BLAISE C, VASSEUR P.

Environmental Toxicology, 2006, volume 21

Le modèle Hydre pour l'évaluation de l'impact sur le développement

VASSEUR P, PACHURA S.

Environnement, Risques et Santé, 2006, volume 5. Issue 4

Communications orales :

Les bases cellulaires et moléculaires de la régénération chez *Hydra attenuata* - Etude du phénomène et mise à profit dans des tests de toxicité.

Séminaire de l'École doctorale RP2E, 23 janvier 2003

Toxicity of nonylphenol on the cnidarian *Hydra attenuata* and environmental risk assessment.

12th International symposium on toxicity assessment, Skiathos, Grèce, 12-17 juin 2005

Communications affichées :

Les bases cellulaires et moléculaires de la régénération chez *Hydra attenuata* - Etude du phénomène et mise à profit dans des tests de toxicité.

PACHURA S, VASSEUR P.

Séminaire de l'École doctorale RP2E, Nancy, 23 janvier 2003

Pharmaceuticals in sewage treatment plant effluents and potential effects assessment on non-target organisms.

CASELLAS C, GARRIC J, LAVILLE N, AIT-AISSA S, PORCHER JM, PILLON A, BALAGUER P, ADAM C, ELBAZ-POULICHET F, SEIDEL JL, VASSEUR P, PACHURA S, GOMEZ E, FENET H.

Abstract Book of 13th SETAC Europe Annual Meeting, Hambourg, Allemagne, 27 avril – 1 mai 2003, p 169

Regeneration of *Hydra attenuata* and developmental toxicity.

PACHURA S, VASSEUR P.

Cellular and molecular basis of regeneration – Euroconference on stem cells involved in tissue repair and regeneration processes, Castelvechio Pascoli, Italie, 31 août – 5 septembre 2002

Tests de toxicité utilisant l'hydre d'eau douce *Hydra attenuata*.

PACHURA S, VASSEUR P.

Formation continue « Les essais d'écotoxicité et de cancérogénicité des produits chimiques » - Université de Metz, mars 2001.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'environnement est le réceptacle de polluants d'origines diverses dont les effets sont en général connus à court terme, mais rarement sur le long terme comme les effets sur la reproduction et le développement. Les tests *in vivo* existant pour la toxicité sur le développement sont longs, laborieux, chers et incompatibles avec le besoin rapide de détection du potentiel toxique des substances. Les essais sur la reproduction ne sont requis que pour les substances chimiques nouvelles produites à haut tonnage. Il n'y a encore aucune exigence réglementaire de cet ordre pour les substances existantes avant 1981, ni d'essai exigé pour identifier un impact sur le développement, les mammifères exceptés.

Des effets délétères induits par les perturbateurs endocriniens (PE)¹, ont été observés sur le développement, la croissance, la reproduction et le comportement sexuel de différentes espèces animales (Ankley et al., 1998) et ont conduit à une intensification des recherches dans ce domaine. Les PE peuvent être de différentes natures : hormones de synthèse, pesticides, additifs pour plastiques, etc.... et se retrouver dans différents produits d'utilisation courante comme les cosmétiques (Gomez et al., 2005). Les alkylphénols, reconnus comme PE (White et al., 1994), sont avec leurs dérivés, les alkylphénols polyéthoxylates (APEs), utilisés en grande quantité comme surfactants dans l'industrie. On les trouve dans la composition de détergents ménagers, de peintures ou de pesticides... (Sonnenschein & Soto, 1998). Le nonylphénol (NP) est l'un des produits de dégradation des alkylphénols ; il pose des problèmes du fait de sa faible biodégradation, son caractère bioaccumulable et sa toxicité (Arukwe et al. 1999; Tyler et al., 1998). Les concentrations environnementales sont actuellement de l'ordre du µg/L, mais en milieux pollués, ces niveaux peuvent atteindre plusieurs centaines de µg/L. Bien que ses propriétés de perturbateur endocrinien soient aujourd'hui reconnues, ses mécanismes d'action restent à définir. L'un des problèmes actuels est que l'on ne dispose pas de protocoles permettant d'identifier des PE et de quantifier leurs effets.

Dans cette perspective, des organismes aquatiques primitifs (comme les invertébrés) semblent être des modèles d'études intéressants. S'ils s'avéraient porter les mêmes récepteurs hormonaux que les vertébrés et les mammifères, ils pourraient constituer des organismes « sentinelles » des milieux naturels, capables de signaler les contaminations, ou encore des outils simples pour en tester l'activité. En réalité, les tests sont nombreux, mais peu portent sur les

¹ Agent exogène capable d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles, qui sont responsables du maintien de l'homeostasie, et interviennent dans la reproduction et/ou le comportement (Crisp et al., 1998).

invertébrés et le développement. L'interprétation de leurs résultats est parfois controversée (Marathe & Thomas, 1990) car insuffisamment sensibles (Henschel et al. 1997).

Hydra attenuata est un modèle intéressant de par son pouvoir de régénération. Cette recherche sur l'hydre s'inscrit dans la logique de cette approche écotoxicologique. L'hydre fait partie de l'embranchement des cnidaires, qui sont parmi les premiers individus à organiser leurs cellules en tissus et dont dériveront au cours de l'évolution les invertébrés plus évolués et les vertébrés (Galliot, 2000). Il est ainsi logique de transposer les mécanismes cellulaires à l'origine d'un dysfonctionnement de son développement à d'autres organismes apparus plus tard au cours de l'évolution. L'hydre possède au niveau de la colonne gastrique des cellules souches mitotiquement actives (Bosch & David, 1984). Sa structure diblastique favorise les échanges inter-cellulaires (Schmid et al., 1999), ce qui augmente le potentiel de détection de l'hydre. L'hydre, ubiquitaire en milieu dulçaquicole, est facile à maintenir en laboratoire grâce à une reproduction asexuée rapide, conduisant à un élevage d'individus génétiquement identiques. Elle permet la mise en place d'essais simples et peu chers.

Son utilisation n'est pas récente et l'hydre a déjà été employée avec succès dans la détection du potentiel tératogène de nombreuses substances chimiques (Johnson et al., 1982; Johnson & Gabel, 1983). Son utilisation a été élargie à l'environnement et sa sensibilité prouvée dans l'étude de la toxicité de divers polluants incluant des pesticides (Kalafatic et al., 1991; Kalafatic, 1997), des composés œstrogéniques (Pascoe et al., 2002), des métaux (Beach & Pascoe, 1998), des substances organiques et inorganiques diverses (Arkhipchuk et al., 2000a, b; Mitchell & Holdway, 2000), mais aussi dans la détection de pollutions mixtes des eaux naturelles et des effluents (Fu et al., 1991; Blaise & Kusui, 1997). Toutefois, la plupart des recherches restent axées sur la survie de l'adulte, peu concernent le développement, même si Johnson et al. (1982) ont très tôt jeté les bases d'un essai sur la régénération de l'hydre à partir d'amas cellulaire.

Dans ce travail nous avons opté pour un « système embryonnaire » plus simple, constitué des sections indifférenciées des hydres à partir desquelles l'organisme entier peut se reconstituer. Ce modèle a été utilisé pour l'étude de la toxicité du nonylphénol (NP) et de son/ses mécanisme(s) d'action.

Cette recherche comprend trois grandes parties :

- (I) criblage de la toxicité de diverses molécules afin d'évaluer le degré de sensibilité de l'hydre et celle des tronçons gastriques (TG). Cette étape a permis d'établir une liste prioritaire de substances pouvant poser des problèmes sur le développement et d'identifier la toxicité du nonylphénol dans cette catégorie.
- (II) étude des effets toxiques du nonylphénol sur le développement (effets sur le long terme, anomalies du développement) et de ses mécanismes d'action (induction d'apoptose).
- (III) étude de l'apoptose chez l'hydre. Influence de l'état physiologique (jeûne) sur le niveau basal d'apoptose chez l'hydre et implication des caspases-3.

Ce manuscrit comporte:

- (i) une analyse bibliographique fractionnée en 4 chapitres :
 - généralité sur la biologie de l'hydre, la régénération/développement.
 - utilisation de l'hydre dans les tests de toxicité.
 - nonylphénol et la problématique des perturbateurs endocriniens.
 - apoptose chez l'hydre et induction par le nonylphénol.
- (ii) les matériels et méthodes mis en œuvre pour cette recherche.
- (iii) les résultats regroupés dans trois parties consacrées pour l'une, au criblage des substances chimiques sur l'hydre et sur le développement (partie I), la deuxième axée sur une application du test hydre adulte et embryon impliquant le nonylphénol et l'étude de son/ses mécanisme(s) d'action (partie II), la dernière partie axée sur le mécanisme apoptotique chez l'hydre (partie III).

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAP. I – ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA BIOLOGIE DE L'HYDRE.

Les hydres font partie de l'embranchement des cnidaires ou coelentérés (environ 9400 espèces), de la classe des hydrozoaires et de l'ordre des hydroïdes. Ces métazoaires diblastiques², porteurs de nématocystes³, sont pour la plupart des organismes marins (Galliot & Schmid, 2002).

Ils possèdent une symétrie radiaire et se présentent sous deux formes possibles, le polype (phase fixée) et la méduse (phase libre). Les deux feuillets superposés, l'ectoderme et l'endoderme, sont séparés par une matrice extra-cellulaire appelée la mésoglée (Fig.1).

I.1. - ECOLOGIE DE L'HYDRE D'EAU DOUCE.

L'hydre d'eau douce est un animal solitaire, peuplant des eaux lenticules peu ou pas polluées, et peu profondes (Beach & Pascoe, 1998). Les espèces du genre *Hydra* se rencontrent dans le monde entier, à l'exception des régions froides (Shostak, 2002). Si les conditions du milieu deviennent défavorables, l'hydre peut se décrocher de son substrat et se laisser dériver pour aller se fixer là où les conditions sont meilleures.

L'hydre est un animal carnivore qui se nourrit de petits métazoaires (comme les daphnies) qu'elle paralyse partiellement à l'aide de ses nématocystes³. Après ingestion par l'orifice buccal et digestion à l'intérieur du tronçon gastrique, les produits de la digestion sont absorbés par les cellules endodermiques qui sécrètent des enzymes protéolytiques, transformant la nourriture soit en produits solubles immédiatement absorbables, soit en petites particules qui peuvent être phagocytées par les cellules de l'endoderme. Les résidus du repas sont finalement expulsés par la bouche grâce à des contractions du corps qui les font remonter et expulser.

² Les cellules sont disposées en deux feuillets superposés.

³ Dispositifs venimeux comprenant une vésicule urticante présente chez les coelentérés et contenant un filament enroulé en forme de harpon ; encore appelés cnidocystes.

I.2. - MORPHOLOGIE.

Le corps de l'hydre a la forme d'une colonne creuse très souple et déformable, mesurant environ 5 à 10 mm de long pour 0,3 à 1 mm de large. La cavité gastrique est simple et sans cloison.

Ce sac allongé peut adhérer à tout support immergé grâce à une sole pédieuse glandulaire composé de cellules ectodermiques sécrétant du mucus et permettant les déplacements de l'animal. La bouche est située au sommet d'un cône creux (l'hypostome) entouré d'une couronne de 5 à 8 tentacules (Shostak, 1978). La bouche, l'hypostome et les tentacules forment la tête de l'animal ou hydrante (Fig.2).

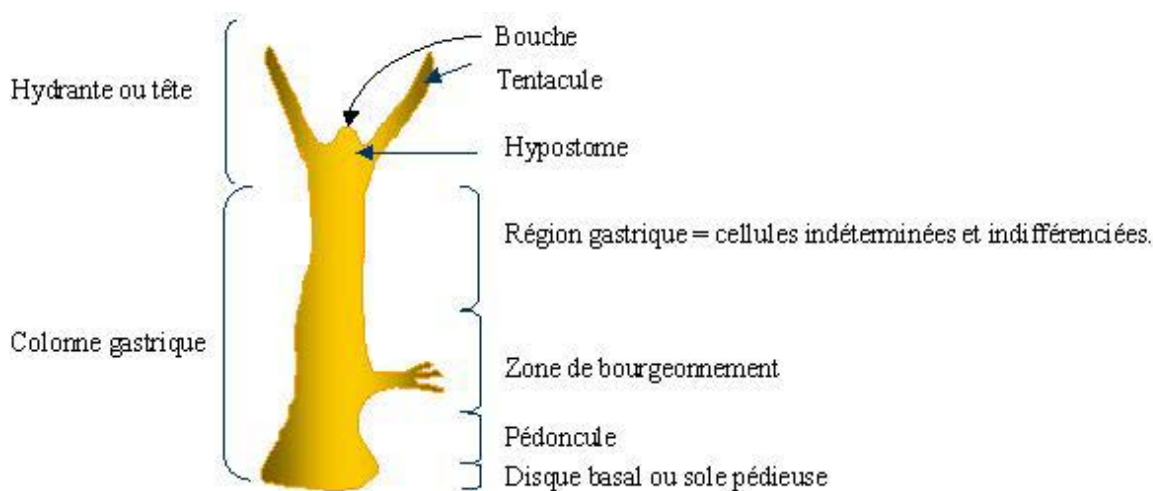


Figure 2. Morphologie d'une hydre d'eau douce.

I.3. - HISTOLOGIE.

Les deux feuillets, l'ectoderme et l'endoderme (Fig.1E), comportent chacun une couche unicellulaire (Bode, 1996). Ces deux feuillets sécrètent la mésoglée, substance contenant entre autres 95% d'eau, du collagène (Zhang et al, 1994a, b), de la fibronectine (Zhang et al, 1994a, b), de la laminine (Sarras et al, 1994) et des protéoglycanes (Zhang et al., 1994a, b).

D'un point de vue quantitatif, les feuillets sont composés d'environ 100 000 cellules distribuées en une vingtaine de types cellulaires environ (Martinez, 1998; Müller, 1995b) se

différenciant par la taille (Annexe 1). L'hydre est composée de trois lignées de cellules qui ont des représentants dans chacun des tissus (Bosch & Fujisawa, 2001).

Les deux premières lignées épithéliales sont formées par les cellules les plus abondantes (David & Campbell, 1972). Ces lignées sont divisées en deux sous-lignées distinctes, l'une endodermale, l'autre ectodermale (Fig.3).

La troisième lignée est interstitielle et fonctionne comme la moelle épinière chez les vertébrés, à partir de laquelle va se différencier les cellules sécrétrices et nerveuses, les nématocystes et les gamètes (Hager & David, 1997; Steele, 2002). Les nématocystes, de quatre types différents (Annexe 2), sont des cellules sensorielles et sécrétrices placées au niveau de l'ectoderme des tentacules (Shimizu & Bode, 1995; Stidwill & Christen, 1998).

Les déformations du corps et les déplacements éventuels de l'hydre sont assurés grâce aux fibres musculaires lisses situées entre la mésoglée et l'ectoderme/endoderme et coordonnés par le système nerveux. Ce dernier est un simple réseau diffus infiltré au travers des tissus de l'animal, se densifiant au niveau de la tête et du pied (Teragawa & Bode, 1995; Technau & Holstein, 1996; Hager & David, 1997; Bosch & Fujisawa, 2001). Les cellules du réseau neuronal combinent des fonctions sensorielles et motrices (Shimizu, 2002).

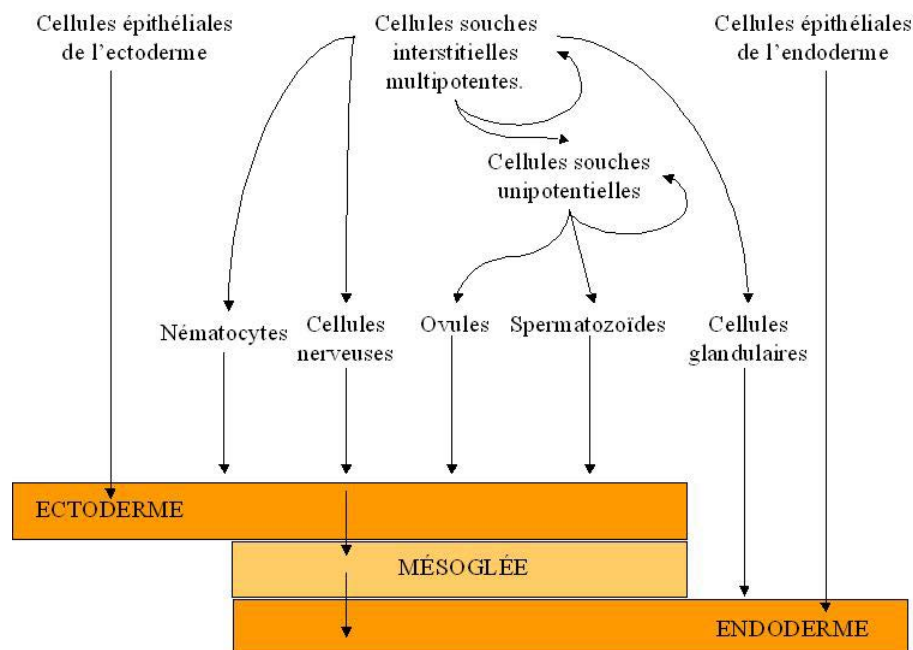


Figure 3. Les différentes lignées cellulaires chez l'hydre et leur devenir.

I.4. – DEVELOPPEMENT ET REPRODUCTION.

Le développement des cnidaires comporte généralement deux phases successives: polype⁴ et méduse⁵. Chez l'hydre d'eau douce la phase méduse est absente.

La reproduction sexuée se déroule en automne et en hiver quand les conditions environnantes sont défavorables (faible température) ou en période de jeûne (Kuznetsov et al., 2001). Les hydres sont souvent gonochoriques, c'est à dire que les gamètes mâles (testicules situés sous la couronne de tentacules) et femelles (ovaires sous la zone de bourgeonnement) sont produits par des individus distincts (Fig.2). La fécondation donne naissance à un œuf, qui va se détacher du pied femelle le moment venu. La larve planula ainsi libérée se fixe au substrat où elle va croître en attendant de meilleures conditions pour bourgeonner.

Les cnidaires manifestent une très grande aptitude à la multiplication asexuée par bourgeonnement (Fig.2), produisant ainsi tous les 3 jours environ, d'autres polypes qui se détachent et deviennent autonomes. Cette capacité conduit à la production d'individus avec une variation génétique faible (clones) et minimise les variations morphologiques. La nourriture est le stimulus le plus important pour le bourgeonnement, plus l'individu se nourrit, plus le taux de bourgeonnement augmente. Quel que soit le régime alimentaire, la taille du corps de l'hydre reste constante, suggérant qu'elle règle son taux de bourgeonnement plutôt que d'ajuster sa taille (Shostak, 1993).

I.5. – RENOUVELLEMENT CELLULAIRE ET CYCLE CELLULAIRE.

L'hydre a une capacité infinie à la prolifération cellulaire à partir de cellules souches placées dans sa colonne gastrique (Galliot, 1997).

Toutes les cellules épithéliales de la colonne sont actives (mitose) (Holstein et al., 1991) avec un cycle cellulaire de 72h en moyenne (David & Campbell, 1972). Les cellules épithéliales ont une période pré-mitotique (G2) longue et variable, tandis que les phases M et S sont constantes (1-1,5 et 10-12h respectivement; Scheurlen et al., 1996). Une des particularités est l'absence de phase G1. Les cellules souches des lignées interstitielles ont un cycle cellulaire de 4

⁴ Phase fixée.

⁵ Phase libre.

à 30h, tandis que les cellules souches des lignées épithéliales ont un cycle de 2 à 5 jours (David & Campbell, 1972; Campbell & David, 1974; Scheurlen et al., 1996). Les cellules dans les tentacules et le pied sont arrêtées en phase G2 (Steele, 2002).

Otto & Campbell (1977) ont montré que chez des hydres nourries à raison de 4 à 25 artémies par jour, toutes les cellules épithéliales ont un cycle cellulaire de même durée (environ 4 jours). Des hydres nourries avec 4 à 12 artémies par jour sont dans un état d'équilibre où la perte de tissus est contrebalancée par leur croissance. Pour une alimentation plus faible (0 à 1 artémie par jour), la durée du cycle des cellules épithéliales est augmentée à environ 16 jours. La perte de tissu n'est pas complètement contrebalancée par la croissance. En conséquence, l'animal cesse de bourgeonner et sa taille diminue.

Ainsi, pour maintenir un nombre de cellules plus ou moins constant, l'hydre met en place un système équilibré de perte et production cellulaire. La dynamique de croissance des deux feuillets de l'hydre, d'une part, engendre un mouvement tissulaire vers la région buccale et les tentacules et d'autre part vers le pied en sens opposé. La colonne gastrique, composée de cellules souches, peut être assimilée à un blastema (Galliot, 1997; Hager & David, 1997; Alvarado, 2000; Takahashi et al., 2000). Ces cellules indifférenciées se distribuent uniformément le long de la colonne gastrique, mais sont absentes au niveau de la tête et du pied (Sugiyama, 1994; Teragawa & Bode, 1995). Elles migrent vers les extrémités grâce aux mouvements cellulaires où elles se différencient (cellules nerveuses, sécrétrices et nématocystes, gamètes (Steele, 2002)). Bien que la prolifération cellulaire soit continue (Steele, 2002), le nombre de cellules total reste constant, l'hydre éliminant le surplus au niveau de la tête (extrémité des tentacules) et du pied par phagocytose (Bosch & David, 1984) et détourne également ce surplus au profit du bourgeonnement (Berking, 2003).

La durée moyenne du renouvellement complet d'une hydre est évaluée à un mois, avec un temps de doublement des cellules épithéliales d'environ 2,2 à 3,5 jours, mais ceci dépend des conditions de culture (Sugiyama, 1994; Bosch & Fujisawa, 2001).

I.6. – ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LA RÉGÉNÉRATION DE L'HYDRE.

La plupart des espèces animales étudiées en laboratoire sont peu représentatives du pouvoir régénérateur du règne animal. En fait, il existe un très grand nombre d'animaux, même évolués, capables de provoquer ce type de processus (Alvarado, 2000; Löwenheim, 2003).

L'hydre reste l'animal le plus étonnant du point de vue de la régénération car elle possède une architecture corporelle relativement simple (un seul axe) et une structure dynamique qui assure un renouvellement constant des cellules (Müller, 1996a). C'est pourquoi le développement et la régénération ont été intensivement étudiés chez ce métazoaire (Lohmann et al., 1999). L'ensemble des résultats expérimentaux acquis depuis le 18^{ème} siècle suggère que le comportement des cellules dépend d'échanges permanents de signaux intercellulaires. Ces échanges contribuent au maintien et à la reconstitution du schéma d'organisation de l'hydre, malgré le renouvellement constant de la totalité des cellules. Les recherches ont ainsi conduit les scientifiques à identifier les molécules impliquées dans la morphogenèse régénératrice, à élaborer des modèles de développement et à étudier différents gènes mis en jeu.

I.6.1. – Les différentes étapes des processus de régénération.

La régénération chez l'hydre peut être initiée soit à partir d'une pièce excisée d'un individu (Fig.4a,b; Berking, 1997), soit à partir de cellules dissociées et ré-agrégées en amas (Fig.4c; Gierer et al., 1972). Dans la nature, il existe différents cas pour lesquels un processus de régénération est indispensable comme après une amputation ou pour le bourgeonnement.

Une pièce de tissu correspondant approximativement à 1% du polype normal, soit environ 150 à 300 cellules épithéliales, peut se régénérer (Bode & Bode, 1980; Bode & Bode, 1984a; Bode et al., 1988; Shimizu et al., 1993). Après amputation de la tête et du pied, l'animal pourra reformer les tissus manquants en 4 à 7 jours, temps variable en fonction de la taille initiale (Bode & Bode, 1984b; Shimizu et al., 1993). En dessous de cette quantité de cellules, la régénération n'a pas lieu (Bode & Bode, 1980). Le bourgeonnement est également représentatif de la régénération. Celui-ci commence par l'apparition d'une protusion sur la colonne gastrique du pied mère. Le bourgeon croît en recrutant les cellules excédentaires du pied mère et par multiplication cellulaire dans ce tissu. Les jeunes et petits animaux ne peuvent bourgeonner (Berking, 2003). Il faut environ 2,5 jours pour qu'un bourgeon se détache du pied mère (Shostak, 1979).

On appelle ré-agrégation la régénération d'une hydre complète à partir d'un amas de cellules agglomérées, dans lequel un nouvel ordre est rapidement établi par des processus d'activation de tri cellulaire et de reconnaissance (interactions homotypiques entre cellules ectodermiques, entre cellules endodermiques, puis interactions hétérotypiques), suivi de réarrangement et d'adhésions cellulaires (Kishimoto et al., 1996; Takaku et al, 1999; 2000; 2005; Hobmayer et al., 2001). Il en résulte la formation d'une petite sphère bicouche avec au centre une cavité remplie de liquide. En un jour l'amas cellulaire a acquis la structure basique de l'hydre (Chun et al., 1983a). Il s'en suivra la régénération des différentes structures, la tête commençant à apparaître après 3 jours (Fujisawa, 2003) et le pied un jour plus tard (Kishimoto et al., 1996; Grens et al., 1999). Selon les auteurs, l'adulte se reformera dans sa totalité en 3 à 7 jours (Zhang et al., 1994a; Fu et al., 1994). Enfin les différents polypes se séparent. Un développement est considéré anormal si l'amas cellulaire n'a pas formé de tête et de tentacules après 96h de formation (Zhang et al., 1994b). Des jonctions se développent entre les cellules épithéliales après 24h de formation et empêchent l'introduction de macromolécules du milieu environnant dans la mésoglée (Zhang et al., 1994b).

I.6.2. – Aspect cellulaire de la régénération et notion de substances morphogènes.

Durant les premières heures de la régénération basale et apicale, la différenciation et la détermination des cellules nerveuses sont le premier événement cellulaire détectable (Galliot, 1997). Chaque régénération est précédée par une cicatrisation des tissus lésés. La cicatrisation est achevée à la 6^{ième} heure. L'organogenèse débute dès la 48^{ième} heure, sans qu'il y ait formation du blastème (morphallaxie⁶).

Il y a 30 ans, Lewis Wolpert introduisait le concept d'information sur la position selon lequel les cellules à l'intérieur d'un système de développement sont informées de leur position (Weinziger et al., 1994). Une des étapes durant le développement est l'établissement de l'axe du corps. Chez certains organismes cet axe est établi durant l'oogenèse. Chez l'hydre, un nouvel axe apico-basal est établi chaque fois que le pied mère bourgeonne (Schiliro et al., 1999).

Différents modèles basés sur la diffusion de substances ont été proposés pour établir et maintenir la polarité de l'axe (Gierer & Meinhardt, 1972). Des expériences de greffes (Müller,

⁶ Régénération par remodelage de composants corporels pré-existants (Alvarado, 2000).

1996b; Javois & Bessette, 1996; Berking, 1997; 2003; Broun & Bode, 2002) suggèrent l'existence d'une (ou plusieurs) substance(s) présente(s) dans le greffon, capable(s) d'activer la formation d'une tête. Les différentes pièces de tissus provenant de diverses parties du corps, montrent des capacités variables à régénérer une tête ou un pied quand ils sont greffés sur un hôte. La variation d'induction selon l'origine topographique du greffon conduit à l'hypothèse d'une variation quantitative, selon l'axe apico-basal, d'une substance activatrice. Ce qui est observé pour l'induction de têtes l'est symétriquement sur l'axe apico-basal pour l'induction de pieds. D'autres résultats suggèrent l'existence d'un processus d'inhibition de l'induction de la tête ou du pied (Schiliro et al, 1999; Zeretzke & Berking, 2001).

Ainsi, il existe des gradients de substances d'activation et d'inhibition de processus de différenciation, distribués le long de l'axe apico-basal (Endl et al., 1999). Il en résulte que la régénération de la tête et du pied vont être deux phénomènes indépendants (Cardenas et al, 2000). Le bourgeonnement se situe entre ces deux systèmes d'organisation, approximativement au 2/3 du corps à partir de la tête. La tête et le pied influencent le bourgeonnement, activé après décapitation et inhibé après greffe d'une tête près de la zone de bourgeonnement. En résumé, la présence de la tête va inhiber le bourgeon tandis que le pied permet la formation de celui-ci. (Schiliro et al., 1999).

I.6.3. – Aspects moléculaires de la régénération.

On connaît peu de chose sur la signification biologique et les mécanismes moléculaires de la régénération chez l'hydre, mais quelques aspects principaux ont pu être définis (Endl et al., 1999). La majorité des molécules impliquées dans le modèle de formation des cnidaires apparaissent être des peptides (Harafuji et al., 2001) qui induisent la régénération, la différenciation, comme la reproduction asexuée (Hoffmeister, 1996; Alvarado, 2000; Bosch & Fujisawa, 2001). Les peptides (environ 1000) comportent quelques neuropeptides (Yum et al., 1998; Hansen et al., 2000; Takahashi et al., 2000), les autres proviennent de cellules épithéliales (Takahashi et al., 1997; Bosch & Fujisawa, 2001; Harafuji et al., 2001; Fujisawa, 2003). Ces molécules contrôlent des processus biologiques divers comme les contractions musculaires, la différenciation des neurones et la mise en place du gradient de concentrations, indiquant la position des cellules (Bosch & Fujisawa, 2001).

Au niveau biochimique, trois peptides ont été identifiés (Galliot, 1997), dont un activateur céphalique (AC). L'AC accélère la régénération apicale en stimulant la division des

cellules épithéliales (Hoffmeister, 1996; Hobmayer et al., 1997) et augmente le taux de bourgeonnement et la formation des tentacules (Hobmayer et al., 1997; Grens et al., 1999). L'AC est maintenu dans des granules de stockage formant un gradient de la tête vers le pied de l'animal (Galliot et al., 1995 ; Fig.5). Il a été montré qu'une faible concentration de AC agit comme un facteur de croissance en forçant les cellules indifférenciées à entrer en phase G2 et à se diviser. Une forte concentration de AC est un signal pour la détermination et la différenciation des cellules nerveuses et des cellules épithéliales spécifiques de la tête. Ce facteur inhibe la formation d'une tête dans le voisinage immédiat de la région céphalique, cette action diminuant avec la distance et définissant un gradient. Cet activateur céphalique active la voie de signalisation de l'AMP cyclique (Fenger et al., 1994; Galliot et al., 1995; Galliot, 1997) en augmentant l'AMPc intracellulaire, ce qui active la protéine kinase A. Mais l'activateur céphalique est contrebalancé par un inhibiteur céphalique (IC). Une décapitation provoque une baisse de l'IC et une augmentation simultanée de l'AC (Shimizu & Sugiyama, 1993).

Deux peptides, appelés pédine et pédibine (Hoffmeister, 1996) ou activateurs du pied (AP), accélèrent la régénération basale (Hoffmeister, 1996; Galliot, 1997; Grens et al., 1999; Kumpfmüller et al., 1999; Hoffmeister-Ullerich, 2001). Pédine augmente également le taux de prolifération des cellules interstitielles et la différenciation neuronale (Hoffmeister, 1996). Ces peptides forment également un gradient de concentration au niveau du corps de l'hydre qui diminue du pied vers la tête (Fig.5).

Les concentrations en AC et AP contenues dans les cellules sont indicatrices de leur position dans le corps de l'hydre. Cette valeur de concentration indiquant la position peut être faussée en présence de certaines substances. La valeur est « augmentée » par un traitement des tissus avec des activateurs de la protéine kinase C (PKC) comme le diacylglycerol (Müller, 1989; Müller, 1995a, b; Müller et al., 1998), le 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) et la verrucosin B (Galliot, 1997)) qui ont la même action que l'AC. Ces substances provoquent la formation de têtes surnuméraires le long de la colonne gastrique et inhibent la formation de bourgeon. Le lithium (1mM) cause l'apparition de pieds surnuméraires le long de la colonne en bloquant certaines enzymes du système phosphatidyl inositol-PKC (Weinziger et al., 1994; Galliot et al., 1995; Berking, 1997), tout en supprimant la régénération de la tête et le bourgeonnement. Dans tous les cas, une modification dans le métabolisme des inositol phosphates peut être responsable d'altérations de la formation de l'hydre.

I.6.4. – Aspects génétiques de la régénération.

Malgré leur position dans l'arbre phylogénique (Fig.6), les cnidaires expriment durant la morphogenèse un grand nombre de gènes qui sont apparentés à ceux du développement chez les bilatéraux (Galliot, 2000).

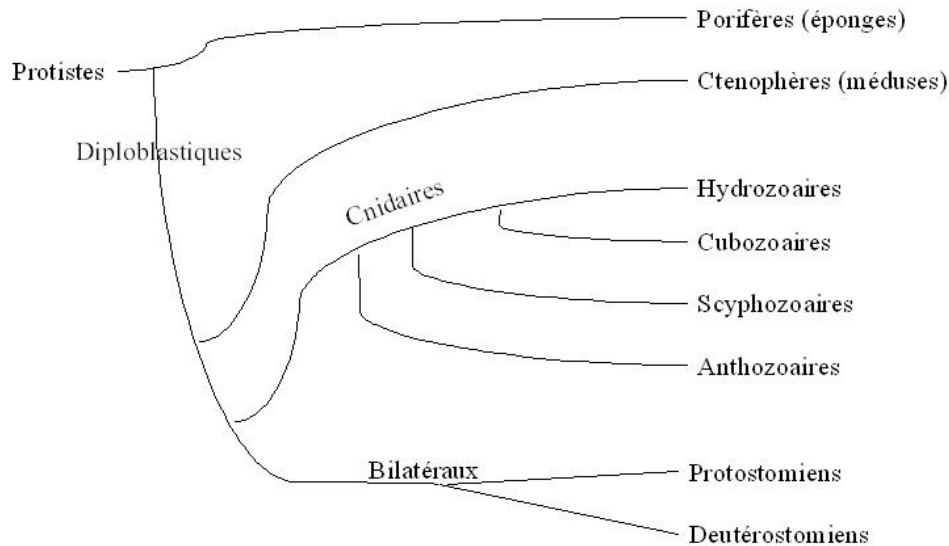


Figure 6. Position et diversification du phylum des cnidaires.

Parmi eux, citons les gènes impliqués dans les processus physiologiques ou dans le développement des tissus suivants:

- l'axe antéro-postérieur (*cnox-2* (Shenk et al., 1993a,b), *cnox-3* (Bode, 2001), *CnOtx* (Smith et al., 1999), *HyBra1* (Technau & Bode, 1999), *Frizzled* (Minobe et al., 2000));
- la tête (*Ks1* (Weinziger et al., 1994), *ras2* (Bosch et al., 1995), *Cngsc* (Broun et al., 1999), *Budhead* (Martinez et al., 1997), *prdl-a* et *prdl-b* (Gauchat et al., 1998), *HyAlx* (Smith et al., 2000), *CREB* (Galliot et al., 1995);
- le pied (*CnNK-2* (Grens et al., 1996);
- l'apoptose (*Casp3A, B* (Cikala et al., 1999)).

Bien que ces gènes soient hautement conservés chez la plupart des métazoaires, les fonctions sont parfois différentes. D'autres gènes isolés chez *Hydra* ont montré une expression contrôlée précisément durant le développement, mais ne sont pas reliés à des gènes connus chez les métazoaires évolués (Lohmann et al., 1999).

CHAP. II – UTILISATION DES HYDRES ADULTES ET EMBRYONS ARTIFICIELS DANS DES TESTS DE TOXICITÉ.

Johnson E.M. a été l'un des précurseurs de l'utilisation de l'hydre, à l'état adulte et embryonnaire, dans des tests de toxicité et de tératogénicité. Il a ainsi testé une centaine de substances de diverses catégories et comparé les résultats à ceux obtenus chez les mammifères (Johnson et al., 1988 ; Table 1).

Certains auteurs considèrent que l'hydre n'est pas un modèle représentatif des effets métaboliques chez les mammifères, du fait des variations de toxicité liées aux différences dans les schémas métaboliques. Cependant, comme l'hydre se régénère par morphallaxis, sa régénération et la régulation du processus sont caractéristiques de tous les embryons à certaines étapes de leur développement, et les mécanismes de contrôle impliqués persistent probablement dans la période d'organogenèse et au-delà (Wilby, 1988).

D'autres auteurs ont prouvé que l'hydre est sensible à divers polluants (Blaise & Kusui, 1997; Kalafatic, 1997; Beach & Pascoe, 1998; Pardos et al., 1999; Fu et al., 1991; 1994; Arkhipchuk et al., 2000a; Mitchell & Holdway, 2000; Pascoe et al., 2002; Holdway, 2005). Cependant, les avis sont partagés quant à cette sensibilité. Selon Vaal et al. (1997), l'hydre est sensible principalement aux composés organiques, moins aux métaux, voire pas du tout sensible au zinc (Arkhipchuk et al., 2000b). D'autres estiment que l'hydre est particulièrement sensible aux métaux et que le test hydre possède une bonne reproductibilité (Castillo et al., 2000a, b; Castillo & Schäfer, 2000; Diaz-Baez & Perez, 2000; Pica-Granados et al., 2000) : l'hydre arriverait en troisième position des espèces sensibles (toxicité aiguë) après *Oncorhynchus mykiss* et *Daphnia magna*, mais avec une sensibilité très proche de cette dernière espèce (Castillo et al., 2000a).

Enfin, une troisième catégorie de travaux montre l'hydre comme l'une des espèces d'invertébrés les plus sensibles après *D. magna* pour des substances organiques et inorganiques confondues. Beauregard & Ridal (2000) vont même jusqu'à trouver les tests hydre et daphnie redondants, le choix d'un seul suffirait dans la création d'une batterie de tests, contrairement à Ronco et al. (2000) qui considèrent ces deux tests complémentaires. Pardos et al. (1999) a

démontré la sensibilité plus élevée du test hydre comparé au test Microtox®⁷, dans l'étude de la toxicité aiguë d'eaux usées.

II.1. – RATIO A/D.

Les relations quantitatives entre les niveaux toxiques d'exposition chez l'embryon et les niveaux toxiques d'exposition chez les adultes ont été utilisées comme index de risque pour le développement. L'index le plus fréquemment utilisé est le ratio A/D (Setzer & Rogers, 1991).

Le ratio A/D est le quotient calculé à partir de la valeur de toxicité obtenue chez l'adulte (i.e. NOAEL, LOAEL, CL50), sur la même valeur de toxicité obtenue chez l'embryon (D pour développement).

Johnson (1998) préconise, pour établir le ratio A/D, d'utiliser la valeur de NOEL (« no-observed-effect level ») plutôt que la valeur de LOEL (« lowest-observed-effect level »).

Le ratio est un indicateur intéressant et facilement calculable. Quand le ratio A/D=1, la substance présente une toxicité à des concentrations équivalentes chez l'adulte et l'embryon. Un ratio A/D <1 suggère que la substance testée est plus toxique pour l'adulte. A l'inverse, un ratio A/D >1 suggère que la substance perturbe le développement de l'embryon sans exercer de toxicité chez l'adulte pour la même concentration (effet sélectif sur le développement). Johnson et al. (1987) recommandent que les composés avec un ratio A/D ≥ 3 chez l'hydre en pre-screening, doivent être étudiés en seconde étape sur un vertébré, voire un mammifère dans la perspective d'identifier des effets tératogènes chez l'homme.

II.2. - COMPOSÉS ŒSTROGÉNIQUES.

Bien que ces composés figurent parmi nos préoccupations majeures, peu ont encore été testés chez l'hydre. Le projet européen (IDEA) a eu pour objectif d'évaluer les effets des perturbateurs endocriniens chez les invertébrés aquatiques (Segner et al., 2003). Les invertébrés étudiés dans ce projet incluent *Hydra vulgaris* (cnidaire), *Gammarus pulex* (crustacé), *Chironomus riparius* (chironomidé), *Hyalella azteca* (crustacé) et *Lymnaea stagnalis* (mollusque). Les animaux sont exposés à des perturbateurs endocriniens types : 17α-éthynylestradiol (EE2), bisphenol A (BPA) et octylphénol. L'approche générale mise en œuvre

⁷ Méthode de détermination de l'inhibition de la bioluminescence émise par *V. fischeria*. Les substances toxiques susceptibles d'être présentes dans un milieu induisent une diminution de l'intensité lumineuse des bactéries.

repose sur des critères de réponse physiologiques comme le comportement, le développement, la reproduction et les caractéristiques du cycle de vie. L'approche moléculaire n'est pas abordée. Les paramètres examinés chez l'hydre sont la régénération de sections gastriques et le développement sexué (Pascoe et al., 2002).

Le BPA et le EE2 sont connus pour avoir un effet œstrogène chez le poisson. La mortalité chez l'hydre est apparue pour de fortes concentrations et les valeurs de LC50-96h sont de 3,8 et 6,9 mg/L pour le EE2 et le BPA, respectivement. La structure et la physiologie du polype sont affectées pour des concentrations de 58 µg/L (EE2) et 42 µg/L (BPA). Des concentrations de 150 µg/L de EE2 et 460 µg/L de BPA inhibent la régénération, tandis que la reproduction sexuée est affectée pour 500 µg/L (EE2) et 0,5-4 mg/l (BPA) (Pascoe et al., 2002; Fukuhori et al., 2005). Ces résultats suggèrent que les processus de signalisation impliqués dans le contrôle et la régulation des mouvements cellulaires et de la différenciation durant le développement, la régénération et la reproduction sexuée, ne seraient pas perturbés par des polluants œstrogéniques aux concentrations environnementales. Cependant il est possible que d'autres processus physiologiques, non évalués dans cette étude, soient sensibles à ces molécules.

Le nonylphenol a également été testé chez l'hydre pour sa cytotoxicité. Arkhipchuk et al. (2000a) ont déterminé d'un point de vue qualitatif que cette substance n'avait pratiquement pas d'effet sur différents paramètres nucléaires. L'hydre semble être dans cette étude l'espèce la moins sensible pour ce produit, mais les auteurs comparent leurs résultats à des essais sur plantes (*Lactuca sativa* 5j-germination, *Allium cepa* 72h -élongation des racines).

II.3.- MOLÉCULES PHARMACEUTIQUES.

Les produits pharmaceutiques diffèrent des autres polluants des milieux aquatiques par deux points : (i) ils sont actuellement conçus pour avoir des effets bénéfiques sur des systèmes biologiques, chez l'homme et les mammifères, en modifiant les fonctions physiologiques/biochimiques, et (ii) contrairement à beaucoup d'autres polluants, les produits pharmaceutiques sont continuellement introduits dans les milieux aquatiques du fait de leur utilisation en médecine humaine et/ou vétérinaire ; leurs origines, les voies d'administration, leurs modes d'action et leurs devenir dans l'environnement sont très divers (Fig.7). Bien que certaines de ces molécules soient utilisées spécifiquement pour l'homme, elles peuvent amener des changements chez d'autres espèces avec lesquelles elles pourraient entrer en contact.

Plusieurs études récentes ont montré la présence de substances médicamenteuses et/ou de leurs métabolites dans les effluents municipaux et dans les eaux de surfaces (Halling-Sorensen et al., 1998; Ternes, 1998; Kolpin et al., 2002; Carballa et al., 2004; Servos et al., 2005). Les hôpitaux sont également reconnus pour être une source de relargage de ces polluants dans les milieux aquatiques, certains effluents hospitaliers manifestant même des propriétés génotoxiques (Jolibois et al., 2003; Jolibois & Guerbet, 2005).

Bien que certains médicaments n'aient été détectés dans l'environnement qu'à des concentrations pouvant aller du ng/L au µg/L (Table 2), leur rejet en continu confère un caractère persistant à l'exposition de ces substances qui posent de réels problèmes environnementaux. Hors programmes de recherche, il n'existe pas encore de surveillance systématique pour évaluer le devenir de telles substances dans l'environnement. Bien que la liste de ces substances ne cesse d'augmenter, tous leurs effets potentiels sur la vie aquatique n'ont pas encore été mis en évidence (Oetken et al., 2005). La question se pose donc de leurs effets adverses sur la survie des invertébrés d'eau douce et sur la structure des populations, surtout sur leurs effets sublétaux plutôt que létaux à long terme.

Table 2. Concentrations environnementales (µg/L) dans les eaux douces de différentes molécules médicamenteuses.

Composé actif	Concentrations (µg/L)	Références
Acebutolol	<0,01-0,13	Andreozzi et al., 2003
Amoxicillin	0,024	pour revue dans Laville et al., 2004
Carbamazépine	0,3-6,3	Andreozzi et al., 2003; Tixier et al., 2003; pour revue dans Laville et al., 2004
Clofibrate	0,46-7,3	pour revue dans Laville et al., 2004
Diclofénac	0,0062-5,45	Weigel et al., 2002; Andreozzi et al., 2003; Koutsouba et al., 2003; Tixier et al. 2003; pour revue dans Laville et al., 2004
Fénofibrate	0,02-0,16	Andreozzi et al., 2003; Tixier et al., 2003; pour revue dans Laville et al., 2004
Fluoxétine	0,012-0,540	Kolpin et al., 2002
Ibuprofène	0,02-7,11	Andreozzi et al., 2003; Boyd et al., 2004
Propranolol	0,01-0,59	Andreozzi et al., 2003; pour revue dans Laville et al., 2004
Sulfaméthoxazole	0,01-6	Hirsch et al., 1999; Andreozzi et al., 2003; pour revue dans Laville et al., 2004
Triclosan	0,001-16,6	McAvoy et al., 2002; Boyd et al., 2003, 2004

L'hydre est utilisée depuis plus de 10 ans dans l'étude de ces composés médicamenteux (Trottier, 1996). Deux substances modèles, la colchicine et la colcémide, connues comme poisons du fuseau mitotique, sont fréquemment employées dans des études chez *Hydra* où leur aptitude à bloquer la mitose a été démontrée (Corff & Burnett, 1969). Elles permettent la régénération de pied et causent un inversement de la polarité durant la régénération (1h à 0,01%). La colchicine inhibe la régénération de la tête (Sturtevant et al., 1951; Ham & Eakin, 1958; Shostak & Adams, 1975). Shostak & Adams (1975) ont testé les effets de la colchicine et de la colcémide sur des animaux greffés. Une ou plusieurs sections des animaux (*Hydra viridis*) ont été exposées à ces molécules avant d'être greffées. Un traitement avec la colcémide empêche la formation du pied mais également le détachement du bourgeon. Il en résulte une « hydre à deux têtes » : la tête du pied mère plus la tête du bourgeon.

Tammariello (1969) a montré que d'autres inhibiteurs de la division cellulaire (colchicine, phleomycin, actinomycin D) empêchent l'incorporation de thymidine tritiée dans des homogénats d'hydre, et causent ainsi la formation de double tête due à la rétention des bourgeons.

La vinblastine, autre poison du fuseau mitotique et substance tératogène connue (A/D ratio = 45 ; Johnson & Gabel, 1983), est un alcaloïde antimitotique dont la plupart des activités biologiques sont généralement attribuées à son aptitude à se lier spécifiquement avec la tubuline. Chun et al. (1983b) ont étudié les effets de la vinblastine (3 mg/L) sur des embryons artificiels de cellules d'hydres ré-agrégées, à différents stades de développement. Ils ont montré que le développement était normal durant les tout premiers stades. Après 1 jour de développement, l'embryon commence à enfler et former un épithélium d'épaisseur irrégulière et élimine la masse centrale de cellules résiduelles. Finalement l'épithélium perd les cellules interstitielles et commence à se vacuoler comme si la dissolution de l'embryon commençait. Il n'y a pas d'études publiées sur la vinblastine ou ses effets sur les microtubules chez l'hydre.

Cependant Burns (1973), montre que la liaison de la colchicine aux tubulines est faible chez les organismes primitifs. Ceci corrobore le fait que les concentrations de vinblastine utilisées par Chun et al. (1983b) pour perturber le développement normal de l'embryon d'hydre sont plus importantes que celles nécessaires pour causer un développement anormal chez le hamster ou le rat. De plus, l'observation d'un retard de formation de la mésoglée chez les hydres traitées indique que la vinblastine affecte la membrane et l'adhésion cellulaire, secondairement à l'inhibition des activités de synthèse.

Selon Wilby (1988) les acides rétinoïques semblent particulièrement toxiques pour l'hydre ($I_{50-96h}^8 = 0,4 \mu\text{g/mL}$; $T_{50-96h}^8 = 0,5 \mu\text{g/mL}$). Les inhibiteurs de mitose comme la vinblastine ($I_{50-96h} = 18 \mu\text{g/mL}$; $T_{50-96h} = 120 \mu\text{g/mL}$), colchicine ($I_{50-96h} = 400 \mu\text{g/mL}$; $T_{50-96h} = 2000 \mu\text{g/mL}$) et l'hydroxyurée ($I_{50-96h} > 1000 \mu\text{g/mL}$; $T_{50-96h} > 1000 \mu\text{g/mL}$) sont significativement moins toxiques pour l'adulte et le développement chez l'hydre que chez les mammifères.

Enfin, Pascoe et al. (2003) ont testé dix substances médicamenteuses (ibuprofène, paracétamol, acide acétylsalicylique, amoxicilline, bendrofluméthiazide, furosémide, atenolol, diazepam, digoxin, amlodipine) sur des hydres adultes, le bourgeonnement et la régénération de tronçons gastriques. Les expositions aiguës et chroniques indiquent que ces substances ne présentent pas de risque létal ou d'effet affectant la prise alimentaire ou la formation des bourgeons à des concentrations de 1 mg/L. Cependant ils ont montré que le diazepam, la digoxin et l'amlodipine peuvent inhiber la régénération des polypes à 10 $\mu\text{g/L}$.

II.4.- ETHERS DE GLYCOL.

Les principaux organes cibles des éthers de glycol sont le système nerveux central et le système hématopoïétique. Les perturbations de ces deux systèmes ont été rapportées pour l'éthylène glycol monométhyl éther (EGME). La toxicité et les effets sur le développement de plusieurs éthers de glycol ont été largement étudiés *in vivo* chez différentes espèces de mammifères (Multigner et al., 2005). Différentes voies d'expositions (orale, dermique, par inhalation) ont été testées, chacune étant une voie d'absorption fréquente en milieu professionnel en particulier, mais aussi au niveau domestique (Johanson, 1999; Multigner et al., 2005).

Une toxicité sur le développement a été rapportée pour l'EGME, l'éthylène glycol monoéthyl éther (EGEE), et l'éthylène glycol monobutyl éther (EGBE) chez les rongeurs et les lapins, tandis que le diéthylène glycol monoéthyl éther (DEGEE) n'a aucun effet sur la reproduction des souris (Johanson, 1999).

Bowden et al. (1995) ont testé quatre éthers de glycol (EGME, EGEE, EGBE, DGEE) et deux dérivés (acide éthylène glycol tetra-acétique (EGTA), éthylène glycol monosalicylate (EGS))

⁸ I_{50} : concentration induisant 50 % d'inhibition pour le tronçon gastrique (score 5). T_{50} : concentration induisant 50% de toxicité chez l'adulte (score 5).

sur l'hydre adulte et la régénération d'un TG (Table 3), ainsi que sur la culture d'embryon de rat. Ils ont montré que la toxicité sur la survie des hydres adultes et la régénération des TG de ces substances suivaient l'ordre décroissant suivant :

- pour la survie de l'hydre adulte : EGTA > EGS > EGBE > EGEE > DGEE > EGME
- pour la régénération des TG : EGTA > EGS > EGBE > EGEE > DGEE = EGME
- pour la viabilité des cellules embryonnaires de rat : EGS > EGBE > EGTA > EGEE = EGME > DGEE

Ceci montre que l'embryotoxicité augmente avec le nombre de carbone de la chaîne alkyl. La voie métabolique principale des éthers de glycol est l'oxydation par la voie du système alcool et aldéhyde déhydrogénase. L'auteur conclut peut-être hâtivement que cette voie métabolique peut être présente chez l'hydre, et ne tient pas compte de la toxicité de la substance initiale. Cette étude a permis de montrer que l'hydre peut prédire à la fois la toxicité chez l'adulte et chez l'embryon d'un même composé.

Johnson et al. (1984) avaient déjà évalué les effets tératogènes potentiels des éthers de glycol (Table 3). Dans leur cas, l'embryon utilisé était un agrégat cellulaire et ils ont montré que la toxicité sur la survie des adultes et le développement des embryons suivait l'ordre décroissant suivant :

- pour la survie de l'hydre adulte : EGEEA > EGMEA > DEGBE > DEGEE > DEGME = EGEE > EGME
- pour le développement des amas cellulaires : EGPhE > DEGBE > EGEEA > EGMEA > EGBE > EGEE > DEGEE > DEGME > EGME.

Quatre substances étudiées en commun (EGME, EGEE, EGBE et DEGEE) permettent de faire une comparaison des deux systèmes embryonnaires. Pour les deux types d'embryons, la toxicité est décroissante pour : EGBE > EGEE > DGEE > EGME. Cependant, une comparaison des ratios A/D mets en évidence une sensibilité plus importante de l'amas cellulaire pour l'EGEE, l'EGBE et le EGBE. Bien que l'EGEE présente un ratio A/D de 5 (déterminé à partir des MEC : minimal effective concentration ; Johnson et al., 1984), la plupart des 14 composés testés ne causent pas d'effets spécifiquement embryotoxiques. L'EGEEA est plus toxique que

l'EGEE, mais ne montre pas d'effet sélectif sur l'embryon. Wang et al. (1991) expliquent que l'hydre est incapable de convertir l'EGEEA en EGEE car l'activité carboxyl-estérase est absente, mais convertit l'EGEE en acide éthoxyacétique (EA) via l'activité alcool déshydrogénase. Ceci indiquerait que la toxicité de l'EGEEA ne s'explique pas uniquement par la formation de l'EGEE.

II.5. - EFFETS DES SOLVANTS.

L'utilisation du DMSO à faible dose (50 μ L/mL durant 30 min) est une méthode de perméabilisation permettant d'introduire des macromolécules (ex. un anticorps) entre les cellules épithéliales de l'hydre (Zhang et al., 1994a).

Bolzer et al. (1994) ont cherché à connaître les effets du DMSO sur l'intégrité et la morphologie des cellules. Ils ont noté qu'une brève exposition (1h) d'un polype *Hydra magnipapillata* à 2-5% de DMSO (dans du milieu hydre à 4°C), cause des changements drastiques de la morphologie des cellules épithéliales avec production de cellules rondes et de nombreuses protubérances, bien que ce traitement n'ait aucune incidence sur la survie. La membrane cellulaire cependant apparaît ne pas être perturbée et les sites de pénétration des macromolécules ne sont pas détectés. Un lavage des hydres traitées dans du milieu hydre permet de revenir à une morphologie normale des cellules. Ces effets sont réversibles mais l'explication de la sensibilité au DMSO reste à apporter.

Johnson & Gabel (1983) déterminent un ratio A/D de 2 chez l'hydre pour le DMSO.

Pour l'utilisation de tiers solvant dans les tests de toxicité, différentes recommandations ont été faites. L'U.S EPA (1975) indique une limite maximale acceptable de 0,05% (500 ppm) dans les tests de toxicité aiguë et 0,01% (100 ppm) dans les tests de toxicité chronique. Le guide OCDE (1981) recommande que la concentration de solvant n'excède pas 100 mg/L (100 ppm) dans les essais *in vitro* (Okumura et al., 2001). Certains auteurs (Johnson et al., 1988; Davies & Freeman, 1995) déterminent cette limite spécifiquement pour le test hydre à 1% (v/v) pour l'éthanol et 0,5% (v/v) pour le DMSO.

II.6. – MÉTAUX.

Beach & Pascoe (1998) ont montré que l'hydre (survie) était particulièrement sensible au cadmium et au cuivre et qu'elle répond pour des concentrations similaires à celles induisant un

effet chez *G. pulex* et *D. magna*. L'hydre est encore plus sensible si l'on considère comme critère sa capacité à se nourrir. Pollino & Holdway (1999) ont testé la toxicité du sulfate de cuivre (II) pentahydraté sur deux populations d'hydres (*H. vulgaris*, *H. viridissima* qui vit en symbiose avec une algue) dans des tests de toxicité aiguë (96h) et sub-chronique (7j). Ils ont montré que le cuivre était hautement toxique pour les deux espèces, bien que *H. viridissima* (CL50-96h = 8.5 µg/L) soit plus sensible à une exposition aiguë que *H. vulgaris* (CL50-96h = 26 µg/L). Cette sensibilité plus élevée peut être le résultat d'une atteinte des algues par le cuivre qui est un algicide. L'étude de toxicité sub-chronique évalue pour les deux espèces une LOEC-6j de 8 µg/L, basée sur la reproduction asexuée de la population. Ils montrent que les valeurs obtenues sont comparables à celles observées dans la littérature pour la plupart des invertébrés et concluent que l'hydre est un organisme approprié à l'étude de la toxicité des substances inorganiques, plus que pour des composés organiques.

Karntanut & Pascoe (2000; 2002) ont testé le cuivre, le cadmium et le zinc sur *H. vulgaris*, afin de comparer les mesures conventionnelles de toxicité aiguë à celles obtenues en mesurant les changements progressifs de la morphologie de l'animal décrits par Wilby (1988). Ils démontrent que le calcul de la toxicité par les changements morphologiques donne plus d'informations sur la toxicité en fonction des niveaux d'exposition que la simple mesure de viabilité. C'est également un indicateur plus sensible de toxicité puisque les changements morphologiques peuvent être détectés pour de faibles concentrations. La méthode permet également d'étudier la réversibilité des effets, après un stade avancé de toxicité, ce qui représenterait un cas de pollution épisodique.

II.7. - PESTICIDES.

Les études divergent quant à la sensibilité de l'hydre vis-à-vis des pesticides. Diaz-Baez & Perez (2000) ont montré la faible sensibilité de l'hydre vis-à-vis des insecticides organochlorés (Aldrin, DDT), contrairement à Lum et al. (2003) qui démontrent sa sensibilité à divers insecticides organophosphorés (isopropyl *p*-nitrophenyl methylphosphonate, pinacolyl *p*-nitrophenyl methylphosphonate, diisopropyl S-(2-diisopropylaminoethyl)phosphorothioate, diethyl S-(2-diisopropylaminoethyl)phosphorothioate, diethyl S-(2-trimethylaminoethyl)phosphorothioate), dont les plus toxiques induisent une MEC-92h (concentration minimale effective correspondant à une LOEC) de l'ordre de 3×10^{-6} mg/L.

CHAP. III – LE NONYLPHENOL (NP) ET LA PROBLEMATIQUE DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS.

Tous les phyla du règne animal utilisent des systèmes de signalisation chimique pour réguler leurs fonctions biologiques. Comme le contrôle hormonal des processus de développement (croissance, différenciation sexuelle, reproduction) est très répandu, il n'est pas étonnant que les invertébrés utilisent également les mêmes mécanismes. Généralement le système endocrine des invertébrés régule des processus de développement identiques à ceux des vertébrés (Oetken et al., 2004). Les invertébrés se caractérisent par une diversité considérable de mode de vie, une succession de stades de développement et des événements caractéristiques comme la formation de larve, la métamorphose, la diapause qui sont gouvernés par les systèmes endocriniens et qui n'existent pas chez les vertébrés. Il est ainsi évident que les systèmes endocrines des invertébrés sont considérablement plus diversifiés que ceux des vertébrés (deFur, 2004). Les invertébrés représentent 30 phyla du règne animal contre un seul phylum pour les chordés dont font partie les vertébrés (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003). Le registre des systèmes hormonaux chez les invertébrés est peu documenté comparé à celui des vertébrés (LaFont, 2000; Oetken et al., 2004).

L'étude des perturbateurs endocriniens chez les invertébrés a été d'un intérêt croissant au cours de ces dernières années. Celle-ci a été clairement dominée par le tributylétain (TBT), qui produit diverses malformations chez les invertébrés, dont les mollusques qui semblent être le groupe le plus sensible (Oehlmann & Schulte-Oehlmann, 2003). Les effets sur le développement, la fécondité et la reproduction peuvent être imputés aux substances agissant sur le système endocrine.

III.1. - PRODUCTION DU NONYLPHÉNOL.

Le nonylphénol (NP) est un produit chimique utilisé dans la synthèse des éthoxylates de nonylphénol et la production de plastiques et de stabilisants. Les polyéthoxylates d'alkylphénol (APnEOs), sont des surfactants non-ioniques utilisés largement en industrie dans la production de papier, dans l'industrie textile, celle des détergents, des peintures, des émulsifiants et des agents dispersants des pesticides.

L'utilisation de NP est estimée approximativement à 75000 t/an en Europe (Muller & Schlatter, 1998), environ 20000 t/an au Canada (Servos et al, 2003) et 100000 t/an au Etats-Unis (Harvilicz, 1999) durant les années 1995-2000.

Cependant, suite à une prise de conscience initiée ces dernières années par les pouvoirs publics et grâce à une volonté des industries à réduire l'utilisation du nonylphénol éthoxylates dans les détergents industriels et domestiques pour limiter les contaminations environnementales, le niveau moyen de NPs dans les eaux de surfaces est tombé à des taux inférieurs au micro-gramme par litre dans la plupart des milieux récepteurs (Kolpin et al., 2002; Ying et al., 2002; Fenet et al., 2003). L'installation de stations de traitement municipales et industrielles ont aidé à baisser le niveau des concentrations environnementales de NP. Toutefois, il est à noter que des sites de pollution où les usines de traitements sont inefficaces ou absentes existent encore, et plusieurs centaines de micro-grammes par litre de NP peuvent y être enregistrés (Berryman et al., 2004; Helcom, 2002).

La dégradation des polyéthoxylates de nonylphénol (NPnEOs) dans l'environnement produit une quantité significative de NP et un nombre de sous-produits d'un poids moléculaire plus faible après la perte progressive des groupements éthoxylés (Table 4). Ainsi, près de 60% des APnEOs sont libérés dans les systèmes aquatiques (Ying et al., 2002).

Les concentrations extractibles et dissoutes du NP sont inférieures à 0,2 µg/L dans les rivières de Grande-Bretagne, mais atteignent 53 et 180 µg/L dans certains sites surveillés de 1993 à 1996. L'Aire, l'une des rivières les plus polluées, recevait un apport de surfactants industriels provenant d'une industrie textile contenant des concentrations de NP extractibles de 330 µg/L (Blackburn & Waldock, 1995; Blackburn et al., 1999). Bennie et al. (1997) ont mesuré des concentrations allant de 0,01 à 0,92 µg/L dans 24% des sites échantillonnés dans les Grands Lacs durant une période s'écoulant de 1994 à 1995. La concentration moyenne de NP était de 0,8 µg/L dans 139 rivières américaines échantillonnées de 1999-2000, avec un maximum de 40 µg/L (Kolpin et al., 2002). Dans d'autres pays européens, les niveaux moyens de NP dans les eaux de surfaces sont inférieurs à 1µg/L. Fenet et al. (2003) ont mesuré des concentrations de NP dans les eaux de la Seine de 0,06 à 0,55 µg/L pour 0,022 à 2,87 µg/g dans les sédiments. Ces concentrations sont comparables à celles retrouvées dans les rivières allemandes, de 0,458 (Bolz et al., 2001) et 0,044 µg/L dans l'eau de mer du « German Bight » de la Mer du Nord (Bester et al., 2001). Enfin, Fries & Püttmann (2004) ont cherché des traces de nonylphenol dans les précipitations en milieu rural ou urbain (Allemagne et Belgique). Ils ont ainsi montré que le NP

était ubiquitaire dans la pluie et la neige avec des concentrations de 0,253 (0,030-0,950) $\mu\text{g}/\text{dm}^3$ et 0,242 (0,028-0,280) $\mu\text{g}/\text{dm}^3$, respectivement.

Le nonylphénol est l'un des métabolites les plus critiques des NPnEOs à cause de sa lipophilie reflétée par son coefficient de partage octanol/eau élevé ($\log K_{ow} = 4,48$), sa forte capacité d'adsorption sur le carbone organique ($\log K_{oc} = 5,4$), sa persistance à la biodégradation et ses propriétés de bio-accumulation dans les organismes aquatiques (Staples et al., 1998).

III.2. - LE POTENTIEL ŒSTROGENIQUE DU NONYLPHENOL.

Les effets du NP ont été documentés dans de nombreuses études *in vitro* et *in vivo* (Jobling et al, 1996; Arukwe et al, 1997; Celius & Walther, 1998; Tollefsen et al, 2002). Le potentiel œstrogénique a été montré chez les vertébrés, comme les poissons, les oiseaux et les cellules de mammifères, où le NP mime les effets du 17β -œstradiol en se liant au récepteur œstrogénique (White et al., 1994). Le nonylphénol est largement étudié pour son potentiel œstrogène chez les vertébrés, mais ses effets envers les invertébrés, en particulier sur le développement, sont mal connus.

Chez les invertébrés, le NP s'est révélé perturber la reproduction et le développement. Chez *Daphnia*, le 4-nonylphénol (4-NP) réduit la fécondité chez des daphnies exposées durant 21j à 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Baldwin et al., 1997), avec des anomalies de développement à 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ (exposition 30j) chez 11% des jeunes daphnies (NOEC à 24 $\mu\text{g}/\text{L}$; Shurin & Dodson, 1997). Des concentrations de 99 et 196 $\mu\text{g}/\text{L}$ (21j) induisent des malformations de l'épine postérieure et des antennes, respectivement (LeBlanc et al., 2000), tandis que Zhang et al. (2003) observent une malformation dans 10% des petits à 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ (35j d'exposition). Le 4-NP retarde le développement de *Crassostrea gigas* pour 0,1 $\mu\text{g}/\text{L}$ (72h) et cause des malformations après 4h d'exposition à 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Nice et al., 2000). Hill et al. (2002) déterminent une croissance anormale, chez *Heteromyenia* sp. pour de fortes concentrations (22 et 11 mg/L pour 9j d'exposition) et à 2,2 mg/L (9j) pour *Eunapius fragilis*. Une forte sensibilité est obtenue par Ward & Boeri (1991) sur l'invertébré marin *Americamysis bahia*, avec une valeur de NOEC-28j de 3,9 $\mu\text{g}/\text{L}$.

III.3. - TOXICITÉ AIGÜE.

Une analyse des différentes valeurs de toxicité aiguë relevées dans la bibliographie fait ressortir qu'en règle générale, la toxicité exprimée par les valeurs de CL50 ou EC50 chez des

vertébrés et invertébrés d'eau douce est comprise dans une gamme de 100 à 1000 µg/L (Table 5).

La toxicité aiguë du NP exprimée par la valeur de CL50 n'excède pas généralement 100 µg/L chez le poisson. Plusieurs espèces semblent être sensibles à la toxicité du NP comme *Lepomis macrochirus* (survie chez les juvéniles).

Brooke (1993a) détermine pour *Lepomis macrochirus* une NOEC-96h (survie des juvéniles) de 87 µg/L et une CL50-96h (survie des adultes) de 135 µg/L. Pour *Pimephales promelas* ces mêmes auteurs décrivent une NOEC-96h de 83 µg/L (survie des juvéniles) et une CL50-96h de 138 µg/L (survie des adultes). Ainsi, les valeurs de CL50-96h pour différentes espèces de poissons sont comprises entre 120 et 220 µg/L (Brooke, 1993a, b; Kwak et al., 2001). La LOEC-72h pour l'expression de vitéllogénine chez les poissons mâles, *Xiphophorus helleri*, est de 4 µg/L selon Kwak et al. (2001).

La gamme de valeurs de CL50s chez les invertébrés, se situe entre 20 et 1200 µg/L. Une CL50-96h de 20,7 µg/L est estimée pour *Hyalella azteca* (Brooke, 1993a). Forget-Leray et al. (2005) rapportent une CL50-96h de 38 µg/L pour la létalité chez le nauplii *Eurythemora affinis*. De nombreuses données existent pour les crustacés *Daphnia* sp. Les valeurs de CE50-48h sont comprises entre 85 et 190 µg/L pour *D. magna* (Comber et al., 1993; Brooke, 1993a; Hirano et al., 2004). Pour *D. galeata* la valeur de CL50-96h est de 60,8 µg/L (Tanaka & Nakanishi, 2002). La CE50-48h pour le développement de l'embryon de *D. magna* est de 281 µg/L (Zhang et al., 2003).

Peu de données sur la toxicité du NP chez les algues et les macrophytes aquatiques sont disponibles, cependant il est à noter que la toxicité sur les organismes photosynthétiques n'est visible que pour des concentrations en NP supérieures au milligramme par litre (*Lemna minor* LOEC-96h = 2,08 mg/L, *Selenastrum capricornutum* LOEC-96h = 1,5 mg/L).

III.4. - TOXICITÉ CHRONIQUE.

Les critères utilisés dans les études de la toxicité chronique incluent la mortalité, la croissance, et les effets sur la reproduction notamment la production de vitéllogénine chez les mâles comme bio-marqueurs d'exposition à des œstrogénomimétiques (Table 6).

Plusieurs espèces de poissons apparaissent être sensibles à la toxicité du 4-NP comme *O. mykiss* (survie des adultes) avec une NOEC-90j de 6 µg/L (Brooke, 1993a). Pour l'induction de vitéllogénine, la LOEC-21j est égale à 20 µg/L et 100 µg/L chez *O. mykiss* mâles adultes (Jobling et al., 1996) et les juvéniles mâles (Van den Belt et al, 2003) respectivement, tandis que la LOEC-14j est de 16 µg/L pour les femelles de cette même espèce (Thorpe et al., 2000). Yokota et al. (2001) reportent une NOEC-60j de 8 µg/L pour la mortalité chez *Oryzias latipes* à la génération F0.

L'espèce la plus sensible est *O. mykiss* dont le 4-NP affecte la reproduction en diminuant la quantité de la semence chez les mâles à la concentration de 130 ng/L (Lahnsteiner et al., 2005; temps d'exposition n'est pas précisé).

Peu d'informations existent pour la toxicité chronique du NP chez les invertébrés (Kahl et al., 1997). Une des espèces d'eau douce les plus sensible est le rotifère *Brachionus calyciflorus*. Preston et al. (2000) ont trouvé une NOEC-96h de 5 µg/L et une LOEC-96h de 50 µg/L (pour la fertilisation) et Radix et al. (2002) mentionnent une perturbation de la reproduction avec une diminution du nombre total de femelles pour 3j d'exposition à 370 µg/L de 4-NP. Le ratio de femelles ovigères/non-ovigères est augmenté à 127 µg/L (Radix et al. 2002). En ce qui concerne la mortalité des nauplii *Eurythemora affinis*, une NOEC-10j et une LOEC-10j de 7 et 15 µg/L respectivement, ont été estimés par Forget-Leray et al. (2005). Chez *Daphnia*, les valeurs de NOEC pour la reproduction sont de 76 µg/L après 7j (O'Halloran et al., 1999), 24 µg/L après 21j (Comber et al., 1993; avec acétone) et 77 µg/L après 21j chez des daphnies (Brooke, 1993a; sans solvant).

CHAP. IV – APOPTOSE CHEZ L'HYDRE, INDUCTION PAR LE NONYLPHÉNOL.

L'apoptose est un processus normal utilisé chez de nombreuses espèces du règne animal, reconnu indispensable à la vie elle-même. Ce phénomène, très répandu chez les organismes pluricellulaires, induit la mort des cellules et leur élimination du tissu par phagocytose. Le processus peut se dérouler à la fois durant le développement de l'animal, la métamorphose, la régénération ou durant la période de vie adulte.

L'apoptose est largement exploitée pour sculpter les tissus et les organes ; les structures larvaires sont également éliminées par apoptose durant la métamorphose des amphibiens. Ce mécanisme est utilisé aussi par le système immunitaire et permet d'éliminer les cellules dangereuses et/ou infectées. La mort cellulaire est une mesure d'éradication des cellules anormales, mal placées, non fonctionnelles ou potentiellement dangereuses pour l'organisme (Jacobson et al., 1997). La dérégulation de l'apoptose, une activation anormale ou un blocage, peuvent expliquer les altérations du développement et une toxicité à court et long terme, voire l'infertilité lorsque les cellules impliquées dans la fonction de reproduction sont concernées (Willie, 1992). De nombreux facteurs peuvent induire ce processus, mais tous passent par l'activation en cascade des caspases pour la dégradation de l'ADN (Fig.8).

L'apoptose est présentée par certains auteurs comme un indicateur précoce de toxicité, les dommages cellulaires pouvant commencer par de l'apoptose pour des concentrations en toxiques faibles, ou donner de la nécrose pour des concentrations importantes (Robertson et al., 2000).

IV.1. - LES MÉCANISMES APOPTOTIQUES.

Les principaux mécanismes mettant en route le mécanisme de mort cellulaire programmée sont : le stress, le traitement par des substances cytotoxiques, l'atteinte à l'ADN, la transmission d'un signal de mort cellulaire, la privation de facteurs de croissance.

Selon Kerr et al. (1972) les changements structurels de l'apoptose se déroulent en deux étapes : la première comprend la formation de corps apoptotiques, la seconde leur phagocytose et

leur dégradation par d'autres cellules. La formation de corps apoptotiques implique la condensation marquée à la fois du noyau et du cytoplasme, et la fragmentation (Fig.9).

L'induction de l'apoptose se produit via une activation séquentielle d'initiateurs (Pro-caspases-8, -9, -10) et d'effecteurs (caspases-3, -6, -7) (Chinnaiyan & Dixit, 1996; Thornberry, 1998). Les caspases sont présentes dans les cellules comme zymogènes⁹ catalytiquement inactifs (Thornberry, 1998). Les caspases ou cystéine aspartases sont des protéases à cystéine avec une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu acide aspartique. Une définition de l'apoptose est la mort cellulaire avec activation de caspases (Blagosklonny, 2000). La caspase-3 va jouer un rôle important dans l'apoptose puisque son expression provoque la mort cellulaire et que c'est par elle que passe la voie apoptotique (Porter & Jänicke, 1999). Les caspases entraînent la plupart des changements morphologiques typiques des cellules apoptotiques. Elles activent une DNase en clivant leur inhibiteur, qui va couper l'ADN entre les nucléosomes, pour générer des fragments d'ADN dont la taille correspond à des multiples de 180-200 paires de bases (Willie, 1992).

IV.2. – L'APOPTOSE CHEZ L'HYDRE.

Comme chez la plupart des autres métazoaires, les cnidaires possèdent une machinerie pour le programme de mort cellulaire et l'apoptose va jouer un rôle prépondérant dans la régulation du nombre de cellules (Bosch & David, 1984), la reproduction asexuée (Mire & Venable, 1999) et sexuée (Miller et al., 2000; Kuznetsov et al., 2001). Wiens et al. (2000) ont découvert que les voies apoptotiques qui impliquent les membres de la superfamille Bcl-2 et les récepteurs de mort cellulaires sont présents chez les éponges.

Deux caspases, les régulateurs clés de l'apoptose, ont été identifiés récemment chez *Hydra vulgaris* (Cikala et al., 1999). L'analyse de leur séquence révèle qu'elles sont proches des caspases-3 des vertébrés ou des caspases *ced-3* du nématode *C. elegans*. L'activité caspase chez *Hydra* peut être bloquée par un inhibiteur spécifique de caspase-3 et dans un moindre degré par un inhibiteur spécifique de caspase-1. Un traitement à la colchicine (0,04%, 8h) induit l'apoptose (Cikala et al., 1999). D'autres caractéristiques des cellules subissant le programme de mort

⁹ Enzyme inactive qui requiert un changement biochimique pour devenir active.

cellulaire comme la condensation de chromatine, la fragmentation du noyau et l'ADN en échelle ont été démontrées (Cikala et al., 1999).

Les cyclines (de types A et B) ont été également trouvées chez l'hydre, la cycline B présente une variation de son expression durant le cycle cellulaire et la régénération (Scheurlen et al., 1996). Rentzsh et al. (2005) ont isolé le gène HyGSK3 impliqué dans le développement de l'hydre. C'est tout d'abord un régulateur dans la voie de transduction du signal Wnt jouant un rôle dans l'apoptose et la gamétogenèse, où il a conservé une fonction pro-apoptotique dans la différenciation des cellules nourricières. Un récepteur de la famille TNF (tumor necrosis factor) spécialisé dans la régulation de la mort ou de la survie cellulaire, a également été identifié chez un cnidaire (*Hydractinia echinata*). Mali & Frank (2004) proposent que cette voie de signalisation soit conservée au cours de l'évolution dans tout le règne animal.

Chez l'hydre la mort des cellules s'oppose à la prolifération cellulaire. Tandis que la plupart des cellules prolifèrent dans la région gastrique et se déplacent aux extrémités du corps, elles meurent par apoptose dans l'hypostome, les tentacules et dans le pied (Lyon et al., 1982; Cikala et al., 1999; Berking, 2003). Les cellules épithéliales ectodermiques jouent un rôle important dans la reconnaissance et la phagocytose en enlevant les cellules mortes ou cellules apoptotiques (Campbell, 1976; Lyon et al., 1982; Bosch & David, 1984; Kuznetsov et al., 2001). L'activité de phagocytose des cellules épithéliales est essentielle pour l'hydre qui réutilise ainsi le matériel mort comme cela se passe en condition de famine (Bosch & David, 1984). Des études préliminaires ont montré que l'apoptose est peut être impliquée dans l'oogenèse (Miller et al., 2000) et la spermatogenèse (Kuznetsov et al., 2001), comme dans l'élimination des cellules en « excès » en réponse à cette famine (Bosch & David, 1984; Cikala et al., 1999).

IV.2.1. - Rôle dans la gamétogenèse (oogenèse, spermatogenèse).

Il a été démontré que l'apoptose chez l'hydre joue un rôle prépondérant dans la reproduction sexuée (Honegger et al., 1989).

Chez l'hydre, l'apoptose est impliquée dans l'oogenèse (Miller et al., 2000) et la spermatogenèse (Kuznetsov et al., 2001). Durant l'oogenèse qui comprend 7 étapes de transformations morphologiques (Miller et al., 2000), les mécanismes apoptotiques sont mis à contribution durant la troisième étape. Dans la centaine de cellules souches agrégées pour former l'oocyte, certaines de ces cellules sont compétentes pour former l'oocyte et seule une cellule est

sélectionnée au milieu de l'agrégat pour former l'œuf. Les autres cellules non sélectionnées se différencient en cellules nourricières. Ces dernières entreront en apoptose et seront phagocytées afin de faciliter la croissance de l'oocyte, car les fragments cytoplasmiques des cellules apoptotiques seront incorporés dans l'oocyte (Miller et al., 2000; Technau et al., 2003; Alexandrova et al., 2005). L'activation de la caspase-3 augmente durant l'oogenèse mais diminue dans l'oocyte mature et l'embryon. Ainsi, un traitement avec des inhibiteurs de caspase peut bloquer le développement de l'oocyte durant les phases précoces de l'oogenèse (Technau et al., 2003).

L'apoptose est également sollicitée dans la spermatogenèse pour le contrôle de la qualité et l'élimination de spermatozoïdes défectueux, ainsi que pour maintenir un ratio constant entre les spermatogonies en différenciation et les cellules épithélio-musculaires. Ces dernières ont un rôle similaire aux cellules de Sertoli qui est de contrôler l'environnement des cellules initiatrices des spermatozoïdes en développement et de séquestrer les populations de ces cellules dans des compartiments distincts (Kuznetsov et al., 2001).

IV.2.2. - Système immunitaire.

Une des hypothèses proposée est que l'hydre utilise l'apoptose comme moyen de défense de l'organisme dans son système immunitaire (Kuznetsov et al., 2002). Ces auteurs démontrent avec des expériences de greffes inter-espèces que l'hydre élimine les tissus voisins après apoptose et phagocytose. D'autres études ont également visualisé ce phénomène chez les éponges (phylum Porifera), où des allogreffes sont éliminées par apoptose (Tepsuporn et al., 2003). Mais il ne semble pas évident que les cellules épithéliales de l'hydre reconnaissent spécifiquement le soi du non-soi (Kuznetsov & Bosch, 2003), l'apoptose étant induite par un détachement des cellules épithéliales de la matrice extracellulaire et la détérioration des contacts cellulaires, et non pas d'un système de reconnaissance discriminatoire (Kuznetsov et al., 2002). Toutefois, le tissu contient une activité anti-microbienne contre les bactéries Gram-négatif et Gram-positif, activité positivement corrélée à la présence de cellules nerveuses (Kasahara & Bosch, 2003).

IV.2.3. - Apoptose et état physiologique.

Chez l'hydre, il a été clairement établi un lien entre état métabolique et survie cellulaire (Otto & Campbell, 1977; Pauly et al., 2003). Chez des hydres bien nourries, le nombre de

cellules double tous les 2 ou 3 jours. Après que l'animal ait atteint sa taille adulte, l'excès de cellules est utilisé pour le bourgeonnement (Berking, 2003). Dans des conditions de jeûne, il n'y a plus d'augmentation du nombre de cellules. Le taux de prolifération cellulaire, cependant, indique que la division cellulaire continue sur le même rythme que pendant la période d'alimentation, créant une production de cellules excédentaires. Ces cellules vont entrer en apoptose et être phagocytées par les cellules voisines (Otto & Campbell, 1977; Bosch & David, 1984; Cikala et al., 1999). Les facteurs régulant la survie cellulaire dans différentes conditions d'alimentation chez l'hydre ne sont pas connus.

V.3. – INDUCTION DE L'APOPTOSE PAR LE NONYLPHENOL.

Quelques études *in vivo* et *in vitro* ont rapporté des propriétés apoptotiques du nonylphenol.

Wang et al (2003) ont démontré les perturbations du nonylphenol sur le système de reproduction par une augmentation dramatique de l'apoptose dans les cellules de Sertoli de rats (3000 ppb durant 72h). Weber et al., 2002 ont montré avec la méthode TUNEL de détection de la fragmentation de l'ADN, une augmentation de l'apoptose dans les cellules spécialisées au niveau des testicules (« leydig-homologue », Sertoli, spermatocytes) en plus d'une régression testiculaire et d'une fibrose chez les poissons mâles (*Oryzias latipes*) exposés à 100 ppb de 4-NP pendant 6 semaines avec renouvellement du milieu tous les 48h.

Yao & Hou (2004) ont montré l'effet du NP sur le thymus de rat. Une dose orale de 375 mg/kg/j (durant 6 semaines) induit une atrophie du thymus ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules en apoptose (21% d'augmentation) dans les thymocystes immatures, pouvant interférer avec la sélection positive ou négative des lymphocytes T. NP augmente le niveau d'ARNm de FasL et diminue l'expression de l'ARNm du récepteur Fas. Il apparaît que NP induit l'apoptose en mimant E2 (17 β -oestradiol; White et al., 1994).

Sakazaki et al. (2002) avaient montré l'inhibition de la mitogenèse des lymphocytes de souris pour une concentration en NP $> 10^{-7}$ M après 4j de culture. Bevan et al (2003) ont étudié les mélanocytes de *Xenopus laevis*, marqueurs pour l'étude du développement et de la différenciation des crêtes neuronales. Les xénopes sont traités au stade embryonnaire 11h avec des concentrations de 4-NP (10, 100, 500 nM, et 1, 5, 10 μ M; 48h) dont certaines sont connues pour induire des effets sur la morphologie et la mortalité (5 et 10 μ M induisant 100% de mortalité). Les concentrations comprises entre 100 nM et 5 μ M augmentent l'apoptose durant le développement (crâne, queue, tronc et région entérique). Ces cellules apoptotiques sont

observées dans des régions qui peuvent correspondre à des voies de migration pour les cellules des crêtes neuronales.

D'autres études ne corroborent pas ces résultats (Talorete et al., 2001; Negishi et al., 2003). Ainsi Talorete et al. (2001) ont déterminé les effets possibles des alkylphenols sur l'activité acétylcholinestérase des cellules neuronales (cellules PC12 (Pheochromocytome de rat) et étudié l'induction de nécrose ou d'apoptose par le NP. Ils ont conclu qu'une concentration de 300 μM pendant 15 min ne provoque pas de nécrose. L'apoptose n'est pas induite même avec une concentration de 500 μM pendant 4h, tandis que l'activité acétylcholinestérase est significativement inhibée pour 0,8 μM (24h). Par contre, Aoki et al. (2004) montrent l'induction de l'apoptose dans les cellules PC12 exposées à une gamme de concentration de 0,01 à 0,1 $\mu\text{g/L}$ durant 24 à 72h. Plus récemment, Negishi et al (2003) ont émis l'hypothèse que le 4-NP influençait la mort cellulaire neuronale et l'activation de la caspase-3 dans les cultures primaires de neurones (hippocampe et corticaux). Ils ont utilisé la staurosporine pour induire la mort cellulaire neuronale et étudier l'effet d'inhibition de l'apoptose du NP sur les cultures pré-traitées. La concentration de 10 μM (24h) de NP testée n'a pas d'effet adverse sur la survie des cellules, mais inhibe l'activité caspase-3 dans les neurones corticaux.

En revanche, Kudo et al. (2004) démontrent que le traitement de cellules souches neuronales de souris avec du 4-NP induit la fragmentation de l'ADN après 12h à 5 μM et active la caspase-3 après 6 et 9h d'exposition à 10 μM . Ils démontrent également que le 4-NP arrête les cellules en phase G2/M et régule les niveaux des cyclines A et B.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

I. - PROTOCOLE D'ÉLEVAGE DES HYDRES.

I.1. - Milieu de culture.

Le stock de culture d'hydres est maintenu dans des plats en Pyrex® couverts, d'une capacité de 1,5 L et contenant 0,5 L de milieu hydre (Table 7). Le tout est placé dans une chambre thermostatée à $20 \pm 1^\circ\text{C}$, sous une photopériode de 16:8-h jour:nuit à 800 lux. Le système d'enceinte permet de prévenir d'éventuelles variations de température. Celles-ci deviennent létales à partir de 25°C (Arkhipchuk et al., 2000b).

Table 7. Caractéristiques générales des substances entrant dans la composition du milieu hydre (en mg/L).

Substances	Formule	Masse moléculaire	N°CAS	Provenance
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147,02	233-140-8	Merck
EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	292,2	60-00-4	Sigma
TES	$\text{C}_6\text{H}_{15}\text{NO}_6\text{S}$	229,25	7365-44-8	Sigma
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Chlorure de Calcium]				147
TES [N-Tris (hydroxymethyl) methyl 1-2-aminoethanesulfonic acid]				110
EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid]				4
1L H_2O MilliQ.				
Le pH est ajusté à $7,0 \pm 0,1$ avec une solution de NaOH à 1N.				

I.2. - Protocole d'alimentation et de nettoyage de la culture.

L'alimentation a un rôle primordial dans la sensibilité de l'hydre. C'est pourquoi un protocole strict est respecté.

Les populations d'hydres sont nourries avec des nauplii d'artémies (*Artemia salina*) fraîchement éclos. Ces derniers sont mis à éclosion dans un milieu salin (préparé à une concentration en sel de mer de 20 g/L dans de l'eau distillée). La dissolution du sel de mer se fait sous agitation durant quelques minutes. Le milieu ainsi préparé sera conservé à température ambiante.

La bouteille où l'on fait éclore les artémies est nettoyée à l'eau chaude après chaque utilisation pour prévenir la formation d'un biofilm. Régulièrement, celle-ci sera rincée au permanganate de potassium (KMnO_4 , 10 mg/L) puis à l'eau déminéralisée.

L'éclosion se déroule durant une période de 24h, sous une lampe de 40 watts, avec un bullage continu et avec une température de 25°C.

Afin d'empêcher la contamination des kystes d'artémies par des micro-organismes ou des moisissures, il est possible, la cas échéant, de les rincer dans une solution de KMnO_4 (10 mg/L) et ceci avant éclosion.

Après 24h les artémies sont décantées une première fois afin d'éliminer un maximum de kystes non éclos. Les artémies sont ensuite placées dans un tamis et rincées abondamment tout d'abord à l'eau du robinet, puis avec du milieu hydre. Le rinçage des artémies après éclosion est une étape importante car l'introduction de sel dans le milieu hydre serait létale pour celles-ci. Afin de décanter le reste de kystes non éclos, les artémies nageant dans le milieu hydre sont laissées quelques minutes sous une lampe, les kystes tombent dans le fond du récipient alors que les artémies vivantes surnagent. Ce sont les artémies surnageantes qui serviront à l'alimentation des hydres.

Pour les élevages, les hydres sont nourries deux fois par semaine (mardi et vendredi) *ad libitum*. Les artémies sont introduites dans le milieu hydre à l'aide d'une pipette Pasteur. Après 3-4 h les hydres sont repues et les artémies entrent en décomposition. C'est le moment choisi pour le nettoyage des hydres. Celui-ci se déroule en deux étapes :

- après chaque repas (environ 3-4 h) les hydres sont simplement rincées avec du milieu hydre neuf, pour enlever les artémies restantes et les exosquelettes régurgités. Le rinçage s'effectue avec une pissette remplie de milieu hydre, c'est la pression du jet qui permet de décrocher le maximum de déchets. Cette étape de rinçage doit s'effectuer le plus rapidement possible pour ne pas laisser les hydres trop longtemps hors du milieu.

- une fois par semaine, les hydres sont décrochées du plat avec la pulpe du doigt, récupérées dans un tamis (340 μm) où elles seront rincées puis replacées dans un plat propre.

Si une contamination devait survenir, il est possible, en plus du nettoyage des plats, de stériliser ces derniers au four Pasteur (170°C durant 3h).

De même, il est nécessaire de désinfecter régulièrement les ustensiles servant à la manipulation des hydres ou d'utiliser des ustensiles à usage unique (comme les pipettes Pasteur). S'assurer que la paille est propre avant d'y poser les plats, bien se laver les mains, rincer les ustensiles au permanganate de potassium.

Eviter également de laisser les plats ouverts à l'air ambiant (couvercle).

II. - PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX DES TESTS HYDRE SUR ADULTE ET EMBRYON.

II.1. - Toxicité sur la survie de l'adulte.

Les hydres adultes sont exposées à la substance testée durant une période continue de 96h et ceci pour la quasi totalité des substances testées. En effet pour quelques substances (dont le NP) la période d'exposition a été prolongée (6, 8 ou 10j). Les hydres sont placées soit dans 3 mL de solution en microplaque 12 puits (Greiner), soit dans 20 mL de solution en mini-cristalliseur de verre si le composé l'exige (utilisation de co-solvant, capacité d'adsorption importante). Lorsque le composé possède une capacité d'adsorption importante (cas du NP), une étape de saturation des récipients est nécessaire. On ajoute dans chaque récipient un aliquote de la solution testée que l'on laisse adsorber durant 15 min, avant de l'éliminer et de le remplacer par la solution à tester à la même concentration. Trois animaux sont alors placés dans le récipient et ceci en triplicat pour chaque série de tests. Des hydres de même taille et non bourgeonnantes sont sélectionnées. Les polypes sont observés au temps 0 pour s'assurer de leur viabilité, l'hydre est ensuite observée sous microscope binoculaire (x18) toutes les 24h. La composition du milieu test, la température et la photopériode utilisée durant les essais sont similaires à celles maintenant la culture.

Les hydres réagissent à un stress environnemental en contractant leurs tentacules et leur corps. Elles peuvent montrer ainsi toute une gamme de changements morphologiques qui sont

enregistrés et notés de 10 (normal) à 0 (désintégré) comme le montre la table 8 construite par Wilby (1988).

Ainsi, à partir de son apparence normale (score 10), l'hydre exhibe progressivement différentes étapes morphologiques (Fig. 10): (a) tentacules bulbées (score 8), (b) tentacules raccourcies (score 6), (c) phase tulipe (score 5), et (d) désintégration (score 0). Les phases tulipe et désintégration sont des phases létales (Trottier et al., 1997). La létalité va correspondre aux scores compris entre 5 et 0.

Table 8. Clé de détermination de la morphologie de l'hydre lors d'une exposition à un agent toxique (Wilby, 1988).

SCORE	Morphologie du polype
10	Tentacules étendues, corps réactif
9	Partiellement contractée, faible réaction
8	Tentacules bulbées, corps faiblement contracté
7	Tentacules raccourcies, corps faiblement contracté
6	Tentacules et corps raccourci
5	Totalement contractée, tentacules visibles
4	Totalement contractée, pas de tentacules visibles
3	Etendue, tentacules visibles
2	Etendue, tentacules non visibles
1	Morte mais intacte
0	Désintégration

II.2. - Toxicité sur le développement des hydres.

Le choix de départ s'est porté sur l'étude de la toxicité sur le développement des amas cellulaires, mais la méthode s'est révélée non appropriée aux essais de routine car longue, lourde et d'un rendement faible puisqu'il fallait 10 adultes pour obtenir 1 embryon.

La toxicité sur le développement est donc évaluée sur la section gastrique de l'hydre en étudiant la capacité à régénérer un organisme entier. La partie gastrique, composée de cellules indifférenciées, est isolée des tissus différenciés, en éliminant la tête et le pied à l'aide d'un scalpel (Fig.11). La section s'effectue sur une hydre en bourgeonnement, le bourgeon permettant de

discriminer la zone basale. La deuxième coupure se fait juste en dessous de la zone apicale (Fig.11). Une hydre bourgeonnante sera donc préférablement choisie dans cet essai afin de pouvoir discerner la région basale.

Les sections gastriques sont immédiatement exposées à la solution pour une période minimum de 96h. Trois sections gastriques sont utilisées pour chaque concentration et ceci en triplicat pour chaque série de tests. Les sections gastriques sont observées toutes les 24h sous un microscope binoculaire (x18). La composition du milieu test, la température et la photopériode utilisées durant l'exposition est similaire à celle de la maintenance de la culture.

Un score est attribué pour chaque section gastrique à chaque temps d'observation selon la classification de Wilby (Table 9). Le développement normal de l'hydre est caractérisé par une cicatrisation de la section gastrique (score 3), puis apparition des tentacules et croissance du disque basal (score 6), suivi par la bouche (score 8) et la formation du pédoncule (score 10). La létalité correspond aux scores compris entre 5 et 0.

Table 9. Clé de détermination de la morphologie de la section gastrique en développement (Wilby, 1988).

Score	Morphologie de l'embryon
10	Bouche, 4-6 tentacules, pédoncule
9	Bouche, 4-6 tentacules
8	Bouche, <4 tentacules, disque basal
7	Bouche, <4 tentacules
6	Bourgeons de tentacules et disque basal
5	Bourgeons de tentacules seulement
4	Disque basal seulement
3	Cicatrisation normale
2	Cicatrisation mais allongement
1	Extrémités ouvertes, pas de cicatrisation ou mort
0	Désintégration

III. – SUBSTANCES CHIMIQUES ÉTUDIÉES.

III.1. – Partie I : Criblage de toxicité.

Cette partie a été divisée en deux études distinctes.

Dans un premier temps, 37 substances chimiques faisant partie de diverses catégories ont été testées sur la survie des hydres adultes et le développement des tronçons gastriques. Les caractéristiques de ces substances sont présentées dans la table 10. Les différentes gammes de concentrations utilisées sont présentées dans l'annexe 5, certaines substances n'ayant fait l'objet que d'essais préliminaires. Les hydres sont exposées à la majorité des composés pour une période d'exposition de 96h. Pour la colchicine, la bléomycine et les acides rétinoïques, cette exposition est augmentée à 6j, 6j et 8j respectivement, ceci pour l'essai sur la survie et sur la régénération.

Dans un deuxième temps, dans le cadre du programme PNETOX, 10 substances médicamenteuses ont été testées sur la survie de l'hydre adulte et le développement des tronçons gastriques. Les caractéristiques de ces différentes molécules sont présentées dans la table 11. Les hydres sont exposées pendant une période d'essai de 96h.

III.2. – Partie II : Application du modèle hydre à l'étude spécifique du nonylphénol.

III.2.1. - Préparation de la solution de nonylphénol.

Le NP est une substance peu soluble dans les milieux aqueux (< 6 mg/L). Dans les tests de toxicité, l'idéal est de travailler sans introduire de tiers solvant, qui pourrait induire une faible toxicité ou interagir avec la molécule d'intérêt. Il a été montré chez l'hydre qu'une faible quantité de DMSO permettait d'ouvrir temporairement des jonctions favorisant l'introduction de macromolécules (Zhang & Sarras, 1994). Nous avons donc fait le choix de travailler avec du NP solubilisé dans du milieu hydre sans utilisation de tiers solvant. La solution test est préparée en diluant cette solution saturée (ou solution mère) en NP dans du milieu hydre.

La solution saturée en NP est préparée de la façon suivante :

- 25g de billes en verre ($\varnothing$ 1 mm, Cat # 11079110 BioSpec Products, Inc) sont mises en contact avec 1g de NP solubilisé dans 25 mL d'acétone.
- l'acétone est éliminé grâce à un évaporateur rotatif à température ambiante.
- 10g de ces billes imprégnées sont introduites dans un petit panier, lui même plongé dans 500 mL de milieu hydre.
- le tout est enfin placé dans le noir sous agitation durant 20h.

La solution saturée ainsi préparée (ou solution mère) est en premier lieu filtrée sur fibres de verre (1,2 μ m de porosité), puis diluée avec du milieu hydre pour le test. La préparation est réalisée avant chaque série d'essais (< 24h) pour s'assurer d'une concentration initiale constante.

III.2.2. – Quantification du nonylphénol par HPLC.

Sur la totalité des substances chimiques testées, seules les concentrations des solutions de NP ont été analysées par HPLC (high-performance liquid chromatography). Ces mesures ne s'étant pas déroulées au sein du laboratoire, une préparation préalable des échantillons est nécessaire à l'envoi de ceux-ci.

III.2.2.1 - Préparation de la solution de nonylphénol avant analyse.

Avant analyse, chaque solution saturée et les solutions diluées de NP sont transférées dans un tube en verre (volume V). Le même volume V d'acétonitrile est ajouté (ratio 1:1). Ce procédé prévient le phénomène d'adsorption du NP sur le verre. Le mélange peut être conservé à 4°C jusqu'à l'analyse entreprise dans les 48h.

III.2.2.2. - Mesures par HPLC.

Les mesures HPLC sont réalisées avec une pompe L6000 (Merck, Fontenay sous Bois, France) équipée d'un détecteur spectrophotométrique ultraviolet (SPD-6A Shimadzu, Duisburg, Allemagne), une valve d'injection Rheodyne 7161 avec une boucle d'injection de 50 μ L et une

colonne Inertsil ODS 3 (250 mm*4,6 mm, AIT, Mesnil le roi, France). La séparation chromatographique est réalisée en débit constant à l'aide d'un mélange eau:acétonitrile:acide trifluoroacétique (20/80/0,2 ; v/v/v) comme phase mobile.

II.2.3 – Les essais nonylphénol.

Tous les essais sur NP s'effectuent à partir d'une solution mère saturée, filtrée et fraîchement préparée.

II.2.3.1. – Essais court terme.

Différentes concentrations de NP sont testées dans une gamme de 0 – 0,4 mg/L (mesurée¹⁰). Les observations sont réalisées toutes les heures (de 1 à 7h) et les expérimentations sont répétées 6 fois. En parallèle, les observations sont également conduites tous les jours (à 24-, 48-, 72- et 96-h) et ces expérimentations sont répétées 12 fois. Les changements morphologiques sont enregistrés et notés par un score (selon Wilby, 1988). Une relation concentration-temps-réponse est modélisée en utilisant la moyenne des scores obtenus dans l'ensemble des différentes expérimentations effectuées.

II.2.3.2. – Essais long terme.

Différentes concentrations de NP sont testées dans une gamme de 0 à 7,5 % de solution saturée (nominale¹¹). Les observations sont faites tous les jours durant une période de 8j. Les expérimentations sont répétées 3 fois, chacune se déroulant sur trois réplicats. Les changements morphologiques sont notés selon la méthode des scores de Wilby (1988), ainsi que toutes les anomalies de développement. Une relation concentration-temps-réponse est modélisée en utilisant la moyenne des scores obtenus dans l'ensemble des différentes expérimentations effectuées.

¹⁰ Les concentrations sont mesurées par HPLC = concentrations réelles.

¹¹ Les concentrations sont calculées à partir des pesées = concentrations attendues.

IV. - ANALYSES STATISTIQUES

Après les observations des polypes et l'attribution du score, les résultats sont analysés statistiquement avec le logiciel ICp (The Inhibition Concentration Approach – Version 2.0.; U.S. Environmental Protection Agency, Duluth) une méthode d'interpolation linéaire pour estimer la toxicité sub-létale recommandée par l'U.S.EPA (Norberg-King, 1993). Cette approche est basée sur une estimation non-paramétrique.

La toxicité aiguë létale des substances chimiques est évaluée en déterminant les valeurs de CL50, CL10 extrapolées à partir des courbes de toxicité concentration-réponse et les valeurs de NOEC pour les hydres adultes et embryons. La concentration létale moyenne (CL50) est la concentration qui produit 50% de mortalité chez l'hydre. La mortalité est déclarée quand le score est compris entre 5 et 0. La valeur de CL10 est celle produisant 10% de mortalité chez l'hydre. La valeur de NOEC (No Observed Effect Concentration) est définie comme la concentration observée à laquelle aucun effet morphologique n'apparaît chez les individus exposés. Parce qu'un changement morphologique minime est observé pour un score 9 (partiellement contracté, réactions faibles; Table 7), la valeur de NOEC est considérée pour un score 10.

Les scores et la létalité sont enregistrés pour toute la durée des différentes expérimentations chez les organismes exposés et témoins. Les valeurs de LOEC (concentration effective la plus basse induisant un effet significatif) pour la survie des embryons et des adultes sont déterminées en modélisant les relations entre la survie et le pourcentage de solution diluée de 4-NP testé en utilisant le logiciel ICp. Les pourcentages de létalité enregistrés aux différentes concentrations testées sont comparés au témoin à l'aide de tests statistiques non-paramétriques : Kruskal-Wallis et Mann-Whitney, dans le but d'identifier les concentrations induisant un effet significatif.

Le ratio des valeurs de LOEC/CL10 de la survie des adultes (A) sur la valeur de LOEC/CL10 sur la survie des embryons (D) est établi dans chaque série d'expérimentation. Le ratio A/D est utilisé pour évaluer l'aptitude de la substance à altérer spécifiquement le développement.

V. - PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX POUR L'APOPTOSE ET EXPRESSION DES CASPASES-3.

L'étude de l'apoptose chez l'hydre a été réalisée à l'aide de deux méthodes : le « DNA ladder » (détection de la fragmentation de l'ADN) et l'expression des caspases-3.

V.1. - Analyse de la fragmentation apoptotique de l'ADN par DNA ladder

Cette méthode a été mise en place dans l'étude de l'induction de l'apoptose par le NP, ainsi que dans l'étude du niveau basal d'apoptose chez des hydres témoins.

La purification des fragments d'ADN (Table 12) est faite en utilisant le kit « Suicide Track DNA Ladder Isolation kit » et selon les recommandations du fournisseur (Catalogue #AM41-1EA – Oncogene Research Products, Cambridge, USA).

La technique est une méthode non-isotopique pour la détection des fragments d'ADN de 180-200 paires de bases séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (Fig.12). Cette fragmentation d'ADN, résulte de l'activation endogène d'endonucléases nucléaires Ca^{2+} et Mg^{2+} dépendantes, qui clivent sélectivement l'ADN à des sites localisés entre les unités nucléosomales.

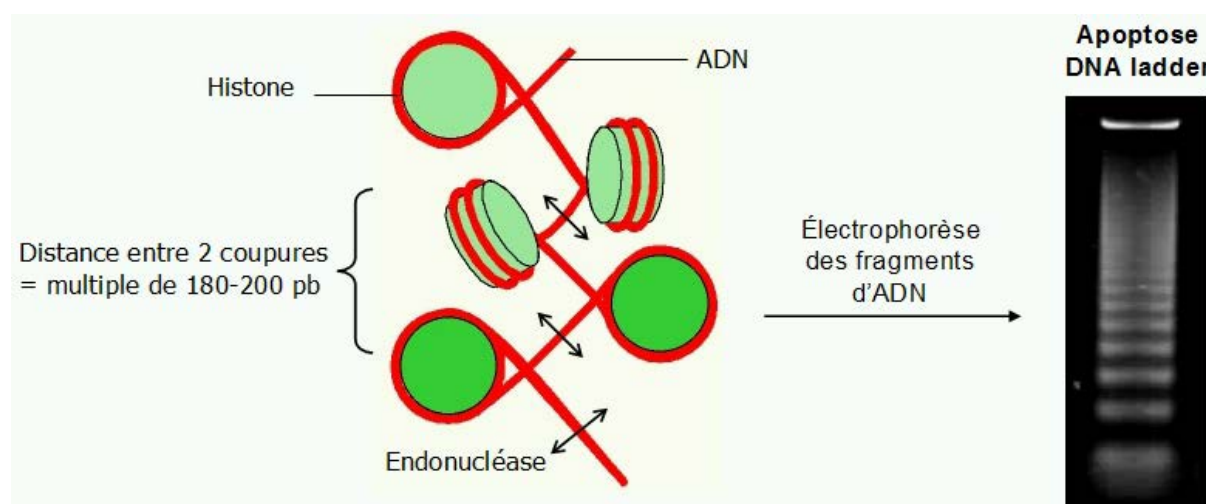


Figure 12. Profil électrophorétique des fragments d'ADN apoptotique (DNA ladder).

En résumé, l'ADN est extrait des cellules grâce au tampon de lyse. Après dégradation de l'ARN et séparation de l'ADN, de l'isopropanol est ajouté pour précipiter l'ADN en plus d'un co-précipitant (Pellet Paint®). Le culot est lavé à l'éthanol 70%, resuspendu, puis chargé sur un gel d'agarose (1,5% w/v) contenant 0,1% de bromure d'éthidium dans le tampon TAE (Tris-acétate-EDTA : 121,5g Tris base ; 28,5 mL d'acétique glacial ; 100 mL d'une solution d'EDTA à 500 mM, pH 8 ; 1L d'H₂O). Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse (50V pendant 1h) puis visualisés sous lumière ultra-violette (UV).

V.1.1. - Dosage de l'ADN.

La quantité d'ADN peut être calculée par spectrophotométrie en mesurant la DO (densité optique) à 260 et 280 nm, d'une dilution de 1/50^e et 1/100^e de la solution à doser. Le calcul suivant permet d'en déduire la concentration :

$$\text{ADN } (\mu\text{g/mL}) = 50 \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{DO}_{260\text{nm}}$$

La mesure de la DO à 280 nm permet de s'assurer de l'absence de contamination significative par les protéines et par l'ARN. Le rapport $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ doit être compris entre 1,7 et 2. S'il est inférieur à 1,7, il existe une contamination par les protéines qui impose de pratiquer une seconde extraction. S'il est supérieur à 2, ceci témoigne de la présence d'une quantité importante d'ARN.

V.1.2. - Traitements des hydres pour l'analyse de la fragmentation de l'ADN.

V.1.2.1. - Analyse du niveau basal d'apoptose : apoptose et jeûne.

La population d'hydres est maintenue avec une période d'alimentation constante (deux fois par semaine). Afin d'appréhender le niveau basal d'apoptose chez l'hydre, et ceci en fonction de son état physiologique (jeûne), cinq hydres adultes sans bourgeon sont sélectionnées au hasard dans la population après 1, 2, 3, 4 et 5j de jeûne.

Après centrifugation à 5000g durant 30s pour précipiter les hydres dans le fond du tube, le milieu hydre est ôté. L'ADN est extrait immédiatement selon la méthode du « DNA ladder », et

ceci pour chacun des temps étudiés. En parallèle, des triplicats sont réalisés sur 5 hydres adultes pour 1 et 5j de jeûne.

V.1.2.2. - Intoxication par le NP et induction de l'apoptose.

Plusieurs expérimentations indépendantes sont conduites sur différentes populations d'hydres pour étudier les effets du NP sur la fragmentation de l'ADN aux concentrations nominales induisant une létalité (CL50 et CL100). Chaque essai est conduit sur 5 hydres adultes sans bourgeon et après une période de jeûne de 5j.

Après une courte exposition (1 et 5h) aux concentrations de NP, le milieu test est centrifugé à 5000g durant 30 s afin de précipiter les hydres dans le fond du tube. Le milieu est enlevé, les hydres sont rincées avec du milieu hydre frais. Les hydres sont lysées et l'ADN extrait selon le protocole de « DNA ladder ».

V.2. – Étude de l'expression des gènes caspase3-A et caspase3-B en RT-PCR.

La méthode de RT-PCR (Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction) permet d'étudier le niveau d'expression d'un gène donné par mesure des transcrits. Après extraction des ARN totaux, l'ARNm est rétrotranscrit de manière spécifique en sa séquence codante d'ADN ou ADNc. Cette séquence d'ADNc est alors amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction), cette amplification est réalisée à l'aide d'un couple d'amorces spécifiques du gène recherché et suivant une série de cycles déterminés. Cette technique permet ainsi d'obtenir en quantité suffisante l'ADN des gènes cibles étudiés (dans notre cas les caspases3-A et -B), pour l'analyse de leur expression.

V.2.1. Traitement des hydres pour l'analyse de l'expression des caspases.

Des hydres à jeun depuis 5j ont été sélectionnées et intoxiquées en vue de l'étude de l'expression des caspases. Cinq hydres sont placées dans des cristallisoirs pour chaque concentration, c'est à dire deux solutions de NP filtrées (correspondant aux CL50 et CL100) et une solution de colchicine (250 mg/L) qui servira de contrôle positif pour l'expression des caspases.

V.2.2. – Isolation de l'ARN pour l'analyse par RT-PCR.

L'ARN total est extrait des cellules dissociées d'hydres à l'aide d'une solution d'Extract-All® (Eurobio) et selon le protocole décrit dans la table 13. Les cellules d'hydres sont dissociées mécaniquement à l'aide de la pipette par aspiration/refoulement.

V.2.3. – Dosage de l'ARN.

Afin de s'assurer de l'intégrité des ARN totaux et de leur quantité, un dosage est effectué par méthode spectrophotométrique. Les échantillons sont au préalable dilués ($d=1/250^e$ dans de l'eau DEPC). Deux mesures sont alors effectuées :

- à 260 nm correspondant au dosage des ARN.
- à 280 nm correspondant au dosage des protéines.

La quantité d'ARN se calcule comme suit :

$$\text{ARN } (\mu\text{g/mL}) = 40 \times (\text{facteur de dilution}) \times \text{DO}_{260\text{nm}}$$

Le rapport de $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ doit être compris entre 1,9 et 2. Un rapport inférieur à 1,9 signifie la présence de contaminants protéiques.

V.2.4. - La transcription inverse (RT).

L'ADNc est synthétisé en utilisant un kit « RevertAidTM » et selon les recommandations du fournisseur (#K1622 – Fermentas).

En résumé, la RT-PCR est conduite sur 0,5 μg d'ARN total (mesure de la concentration par méthode spectrophotométrique) en utilisant un oligo(dT)₁₈ comme amorce spécifique des ARNm et une transcriptase reverse M-MuLV RT (Perkin-Elmer). La réaction s'effectue sur un volume final de 20 μL .

Table 14. Préparation de la transcription inverse (RT).

Réactifs	Solutions stocks	Concentrations finales	Volume/20 μ L (μ L)
Tampon PCR	5X	1X	4
dNTP Mix	10 mM (mix)	1mM	2
Reverse Transcriptase MulV	200 U/ μ L	10 U/ μ L	1
Inhibiteur de RNase	20 U/ μ L	1 U/ μ L	1
Amorce Oligo dT	0,5 μ g/ μ L	0,025 μ g/ μ L	1
Echantillon d'ARN	0,1 - 5 μ g	0,5 μ g	X
Eau DEPC (0,1%)*	/	/	Y

* : 400 μ L de diéthyl-pyrocabamate + 400 mL d'H₂O / Incuber 4h à 37°C / Autoclaver.

Le programme du thermocycleur pour la RT est constitué de trois étapes :

- une étape d'hybridation des amorces et de transcription de l'ADNc de 30 min à 42°C.
- une étape de dénaturation des enzymes de 5 min à 99°C.
- une étape de refroidissement et de conservation des échantillons à 4°C.

Les échantillons d'ADNc sont alors prêts pour être amplifiés par PCR ; ils peuvent être conservés à -20°C.

V.2.5. – La PCR (Polymerase Chain Reaction).

L'amplification de l'ADNc s'effectue à l'aide de deux kits. Le premier «Taq DNA Polymerase» pour l'amplification et selon les recommandations du fournisseur (#EP0402 – Fermentas), les dNTP étant fournis par le second kit « dNTP Set » (#R0181 – Fermentas). La réaction s'effectue dans un volume final de 40 μ L.

Les concentrations finales vont être doublées afin de tenir compte de l'ajout de deux couples d'amorces durant la PCR : pour l'expression de la caspase et pour l'expression de l'actine utilisée comme contrôle interne. La solution de réactifs pour la PCR est appelée Mix PCR.

Table 15. Préparation pour la PCR

dNTP Mix	Solutions stocks	Concentrations finales	Volume/500 μ L (μ L)
dATP	100 mM	10 mM	5
dTTP	100 mM	10 mM	5
dGTP	100 mM	10 mM	5
dCTP	100 mM	10 mM	5
H ₂ O			480

Mix PCR	Solutions stocks	Concentrations finales	Volume/20 μ L (μ L)
Tampon PCR	10X	2X	5
MgCl ₂	25 mM	4 mM	4
dNTP Mix	10 mM (chaque)	0,4 mM	1
Taq DNA polymerase	5 U/ μ L	0,05 U/ μ L	0,2
H ₂ O	/	/	6,8

Réactifs	Solutions stocks	Concentrations finales	Volume/20 μ L
Mix PCR	2X	1X	10 μ L
Amorce caspase	10 μ M	0,25 μ M	1 μ L + 1 μ L
H ₂ O	/	/	6 μ L
Echantillon	/	/	2 μ L

Mélange pour l'amplification de la caspase pendant n cycles, puis le programme est stoppé pendant l'étape 2.

Réactifs	Solutions stocks	Concentrations finales	Volume/20 μ L
Mix PCR	2X	1X	10 μ L
Amorce actine	10 μ M	0,25 μ M	1 μ L + 1 μ L
H ₂ O	/	/	8 μ L

Mélange pour la co-amplification de l'actine, ajouté pendant la pause du programme PCR (étape 2).

Les séquences des amorces caspase et actine utilisées sont présentées dans la table 16.

Le programme du thermocycleur pour la PCR est constitué de quatre étapes dont l'étape 2 est répétée n fois suivant le protocole expérimental choisi :

- Etape 1 : dénaturation 5 minutes à 94°C.
- Etape 2 : répétée n fois suivant le protocole.
 - Dénaturation 30 secondes à 94°C.
 - Appariement des amorces 30 secondes à 55°C.
 - Elongation 30 secondes à 72°C.
- Etape 3 : élongation finale 5 minutes 72°C.
- Etape 4 : conservation des échantillons à 4°C.

L'ADN spécifiquement amplifié est visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose (1,5% dans un tampon TAE) contenant 0,1 µg/mL de bromure d'éthidium (BET). 12 µL d'échantillon PCR sont ajoutés à 2 µL de tampon de charge spécifique de l'ADN (solution de colorant bleu au xylène cyanol dans 50% de glycérol) et nécessaire à la migration. Afin d'évaluer la taille en paire de bases des produits PCR obtenus, un marqueur de taille (GeneRuler™ #SM0242 – Fermentas) est mis à migrer en parallèle. Les produits PCR sont ensuite révélés sous UV.

VI. – SÉQUENÇAGE DES GÈNES CODANT POUR LES CASPASES-3A ET -3B.

Afin de s'assurer que les résultats obtenus correspondent aux gènes des caspases-3A et -3B, ces derniers sont séquencés.

La pureté des bandes obtenues sur gel d'agarose (absence de smear ou bande parasite...) et la quantité importante d'ADN, nous ont permis d'envoyer à séquencer directement le produit PCR, sans recourir à la méthode classique de clonage.

Après migration des produits PCR sur gel d'agarose, les bandes contenant les gènes des caspases sont découpées à l'aide d'un scalpel, et stockées dans des microtubes pour une purification préalable avant envoi.

La purification est effectuée à l'aide d'un kit spécifique (Cleanmix #TA050CLN, Talent srl, Trieste, Italie). La méthode consiste à lier l'ADN sur une matrice de silice de forte capacité de ligation, et de le purifier de tout contaminant en présence d'un agent chaotrope, le thiocyanate de guanidium. L'ADN, fortement complexé à une résine, est facilement retenu sur un papier filtre, les protéines, l'agarose, l'ARN et les autres contaminants sont lavés et centrifugés. L'ADN peut alors être resuspendu dans un petit volume d'eau. C'est ce volume qui sera utilisé pour le séquençage.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

PRÉSENTATION GÉNÉRALE DES TRAVAUX

Ce travail de recherche a consisté à étudier le modèle hydre comme indicateur de toxicité de différentes substances chimiques et plus particulièrement du nonylphénol (NP). Nous avons cherché à élucider les mécanismes d'action qui pouvaient expliquer sa toxicité élevée sur l'hydre.

Cette recherche comporte trois parties :

Partie I – Étude de sensibilité de l'hydre vis à vis de substances chimiques :

A - étude du degré de sensibilité de l'hydre adulte et des tronçons gastriques sur le court terme vis-à-vis de diverses catégories de polluants hydriques comme des éthers de glycol, des phthalates, des pesticides, des perturbateurs endocriniens...

B - ...et de molécules médicamenteuses.

Partie II – Étude de la toxicité du nonylphénol (NP) :

A - toxicité à court terme du NP chez l'hydre adulte et mécanisme d'action apoptotique.

B - effets du NP sur le développement des tronçons gastriques en parallèle à la survie des hydres sur le court terme. Ces données ont été utilisées pour une analyse en terme d'évaluation de risque.

C - toxicité à long terme du NP sur le développement des embryons.

Partie III – Étude de l'apoptose chez l'hydre :

A - niveau basal d'apoptose chez l'hydre en fonction de son état physiologique.

B - implication des caspases-3A et -3B dans le processus d'apoptose chez des hydres adultes.

PARTIE I – Criblage de la toxicité de diverses substances chimiques

I.A. - CRIBLAGE DE LA TOXICITÉ ET DES EFFETS SUR LE DÉVELOPPEMENT DE 37 SUBSTANCES CHIMIQUES A L'AIDE DU MODÈLE HYDRE.

L'objectif de cette partie de la recherche est d'évaluer la sensibilité de l'hydre adulte (survie) et celle du développement des tronçons gastriques, vis-à-vis de diverses catégories de substances. La section gastrique peut être assimilée à un blastema, puisque composée uniquement de cellules indéterminées et indifférenciées (Galliot, 1997).

Dans cette première étude, la toxicité sur le développement est comparée à la toxicité sur la survie des adultes, et un ratio A/D est établi. Pour ce faire, 37 substances listées dans la table 10 de la partie matériels et méthodes, ont été étudiées.

Pour la majorité des substances, la toxicité va s'opérer pour des concentrations comprises entre 1 et 100 mg/L. Douze substances testées ont une toxicité comprise entre 1 et 10 mg/L (bisphenol A, méthoprène, parathion, TGDME, digluconate de chlorhexidine, cytochalasine, deltaméthrine, éthanol, méthoprène, parathion, carbonate de lithium, zinc). La majorité des substances testées ont donc une toxicité modérée sur la survie des adultes et la régénération des embryons. Enfin, certaines substances ont très peu ou pas d'effet sur l'hydre adulte ou sur la régénération : alpha-cyperméthrin, hydroxyurée, 2,4-D, DEHP, EGME, EGMEA, H₂O₂, méthanol.

L'étude montre cependant que sept substances apparaissent toxiques pour l'adulte et l'embryon avec des valeurs de CL50-96h ou CL50-8j inférieures à 1 mg/L (TBTO, all-trans-retinoïque acide, 13-cis-retinoïque acide, cuivre, cycloheximide, NP, thalidomide ; Fig.13). Il est intéressant de noter que toutes ces substances sont soit des PE (NP, TBTO), des tératogènes (acides rétinoïques, triclosan, thalidomide) ou encore peut affecter la reproduction (cycloheximide). Ceci laisse supposer que l'hydre peut être un modèle d'étude intéressant pour le criblage des effets sur le développement.

Les résultats d'analyses des ratios A/D obtenus dans cette étude montrent que différentes substances (nonylphénol, azétidine-2-carboxylique, carbamazépine, colchicine, diclofénac, fluoxétine, ibuprofène, propranolol, SDS, sulfaméthoxazole, TBTO, thalidomide) ont un effet spécifique sur le développement d'*Hydra attenuata* (ratio A/D >1 ; Table 17).

La thalidomide est un tératogène connu chez les vertébrés et qui a déjà été retiré du marché pour cette raison. Le calcul d'un ratio A/D élevé pour cette substance corrobore l'intérêt du modèle hydre dans les études sur le développement.

Parmi ces substances, un grand nombre ne montre des effets délétères pour le développement que pour des concentrations qui n'ont pas de réalité environnementale : azétidine-2-carboxylique, carbamazépine, colchicine, diclofénac, fluoxétine, ibuprofène, propranolol, SDS, sulfaméthoxazole. L'intérêt d'étudier de telles substances est donc moindre.

Deux substances sont mises en avant avec un ratio A/D élevé et une toxicité importante (< 1 mg/L) : le NP (A/D = 2,5) et le TBTO (A/D = 1,7). Le TBTO ayant déjà fait l'objet d'une réglementation, notre attention s'est portée sur la toxicité et les mécanismes d'action du nonylphénol.

I.B. – TOXICITÉ DE SUBSTANCES MÉDICAMENTEUSES SUR LE MODÈLE HYDRE¹²

Des problèmes environnementaux peuvent se poser par suite de la présence des médicaments ou de leurs métabolites dans les effluents domestiques et hospitaliers. De nombreuses études ont montré que certains de ces médicaments se retrouvent dans les effluents des stations d'épuration et donc dans le milieu récepteur. Or, il n'existe actuellement aucun programme de surveillance pour évaluer le devenir de telles substances dans l'environnement.

Il devient donc nécessaire de développer des méthodes qui permettront de connaître le potentiel toxique de ces substances dans l'eau. Il existe un réel manque de données concernant leurs effets sur la faune aquatique, particulièrement chez les invertébrés, qui jouent un rôle majeur dans la structure et le fonctionnement des écosystèmes d'eaux douces.

L'hydre est utilisée depuis plus de 10 ans essentiellement dans l'étude des effets sur le développement des substances pharmaceutiques (Trottier, 1996) et depuis peu dans le criblage des polluants de l'environnement et dans l'étude de leur potentiel tératogène.

Le but de cette étude est de déterminer si des médicaments d'utilisation courante et ayant été détectés dans les effluents de stations d'épuration, ont des effets adverses sur la régénération et le développement de l'hydre, et si ces molécules provoquent d'éventuelles malformations. Nous avons étudié dans le cadre du programme PNETOX, 10 substances médicamenteuses sur la survie d'hydres adultes et sur le développement des tronçons gastriques. Les substances choisies sont les suivantes : acébutolol, amoxicilline, carbamazépine, diclofenac, fénofibrate, fluoxétine, ibuprofène, propranolol, sulfaméthoxazole, triclosan.

¹² Le modèle hydre pour l'évaluation de l'impact sur le développement (Annexe 6). Soumis dans *Environnement, Risques & Santé*

Cette étude démontre que les 10 substances médicamenteuses choisies en fonction de leur présence dans le milieu aquatique, n'altèrent la viabilité et le développement de l'hydre que pour des concentrations élevées (Table 18 et Fig.14), bien supérieures à celles retrouvées dans l'environnement.

Table 18. Résultats de la toxicité de 10 substances médicamenteuses sur la survie de l'hydre adulte (A) et la régénération des tronçons gastriques (D).

Catégories	Substances		<i>Hydra attenuata</i> (mg/L)		
			Létalité adulte 96h (A)	Létalité embryon 96h (D)	Ratio A/D
Antiseptique	Sulfanéthoxazole	CL10	118	22,5	5,2
		CL50	137	100	
	Amoxicilline	CL10	>100	>100	/
		CL50	>100	>100	
AINS	Diclofenac	CL10	4	2,3	1,7
		CL50	5	3,3	
	Ibuprofène	CL10	11	4,5	2,4
		CL50	15	6,3	
Antidépresseur	Fluoxétine	CL10	11	1,8	6,1
		CL50	15	9	
Béta-bloquant	Propranolol	CL10	23	4,5	5,1
		CL50	32,5	22,5	
	Acebutolol	CL10	>100	>100	/
		CL50	>100	>100	
Antiépileptique	Carbamazépine	CL10	45	15	3
		CL50	105	112	
Hypolipémiant	Fenofibrate	CL10	5	5,5	0,9
		CL50	25	7,5	
Antimicrobien	Triclosan	CL10	0,3	0,3	1
		CL50	0,4	0,4	

De même, aucune malformation n'a été observée pour les concentrations étudiées durant 96h d'exposition. Pour la plupart des substances, la sensibilité de l'hydre est équivalente à celle des autres invertébrés d'eau douce en terme de toxicité aiguë (Table 19).

Deux substances ont une toxicité plus importante : le diclofenac et le triclosan, où les effets apparaissent pour des concentrations de l'ordre de 4 mg/L et de 0,3 mg/L respectivement. Cependant, cinq substances (sulfaméthoxazole, ibuprofène, fluoxétine, propranolol et

carbamazépine) ont un ratio A/D relativement élevé (compris entre 2,44 et 6,11), ce qui implique un effet spécifique sur le développement pour une concentration donnée, même importante.

L'exposition de l'hydre adulte et des tronçons gastrique à 10 médicaments couramment prescrits indique que les essais ne mettent pas en évidence de toxicité létale ou d'effets adverses pour le développement à des concentrations inférieures à 1 mg/L et pour une exposition de 96h. Deux des médicaments examinés (triclosan et diclofenac) manifestent cependant une toxicité significativement supérieure aux autres substances et cinq autres substances (sulfaméthoxazole, ibuprofène, fluoxétine, propranolol, carbamazépine) s'avèrent avoir un effet spécifique pour l'embryon.

Cependant, la régénération des sections gastriques en un polype fonctionnel n'est pas inhibée aux concentrations environnementales, et ceci quelle que soit la substance testée parmi les 7 classes médicamenteuses choisies. Bien que Johnson et al. (1982) préconisaient une période de 96h pour l'étude du développement de l'hydre à partir d'amas cellulaire, et que cette même durée a été par la suite appliquée à l'utilisation des tronçons gastriques par Wilby (1988) ou Bowden et al. (1995), il nous semble qu'une période d'exposition plus longue serait nécessaire, afin de pouvoir conclure sur l'impact réel de ces substances sur le développement. En effet, le développement de l'hydre, achevé après 96h chez les hydres témoins, peut être retardé en présence de substances toxiques dont les mécanismes de toxicité peuvent influencer « à retardement » l'embryon au-delà de cette période.

PARTIE II – Étude des effets toxiques du nonylphénol (NP)

II.A. ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DU NONYLPHÉNOL CHEZ L'HYDRE ADULTE (ARTICLE 1).

4-NONYLPHÉNOL INDUIT LA TOXICITÉ ET L'APOPTOSE CHEZ *HYDRA ATTENUATA*¹³.

(4-Nonylphenol induced toxicity and apoptosis in Hydra attenuata.)

Les résultats obtenus lors des essais de criblage des substances chimiques ont souligné la toxicité élevée du NP sur l'hydre adulte et sur l'embryon, ainsi qu'un ratio A/D important.

La contamination des écosystèmes aquatiques par une quantité importante de composés chimiques synthétiques et leurs métabolites est un des problèmes majeurs actuellement, entre autres parce que les mécanismes d'action sont encore peu connus. Certaines de ces substances, appelées perturbateurs endocriniens, ont une influence sur le système endocrinien de certaines espèces aquatiques, en particulier le développement, la croissance, la reproduction et le comportement sexuel.

Les alkylphenols, dont le nonylphenol (NP) est un des métabolites les plus critiques, font partie de cette catégorie de substances. Ces produits sont généralement retrouvés à l'état de trace dans les eaux de surface (< 1µg/L), mais proche de sources de pollution, les concentrations peuvent atteindre plusieurs centaines de micro-grammes par litre.

Le potentiel œstrogène du NP a été démontré chez les vertébrés (poissons, oiseaux, cellules de mammifères), peu de travaux existent chez les invertébrés. Ses propriétés apoptotiques ont également été détectées, une dérégulation de ce processus pouvant expliquer une altération du développement. Cette étude visait à évaluer la toxicité spécifique du 4-nonylphénol (4-NP) sur la survie de l'hydre d'eau douce (*H. attenuata*), et de déterminer si cette molécule induisait l'apoptose. Des hydres adultes ont été exposées durant 96h à différentes concentrations de 4-NP (environ 20 à 200 µg/L pour les gammes définitives). Les hydres ont été observées toutes les heures durant 7h, puis toutes les 24h. L'hydre réagit aux stress environnementaux en exhibant différentes morphologies. Pour démontrer une induction d'apoptose, les hydres sont intoxiquées durant 1 et 5h avec des concentrations létales en

¹³ Accepté dans *Environmental Toxicology & Chemistry*. 2005. 24(12). In press.

nonylphenol (CL50 et CL100). La fragmentation de l'ADN est alors visualisée sur un gel d'agarose par électrophorèse.

Les résultats des tests de toxicité aiguë du NP montrent que la CL50-96h est de 98 ± 20 µg/L (mesuré ; Table 20). La valeur de CL10-96h est de 64 ± 26 µg/L (mesurée). Les changements morphologiques arrivent rapidement après une exposition à de fortes concentrations, au-delà de 24h la morphologie restant la même. Des changements s'opèrent plus lentement pour de faibles concentrations. De légères variations morphologiques s'observent pour la plus faible concentration testée (25 µg/L), qui ne nous a pas permis de déterminer une NOEC. En parallèle, un profil apoptotique est observé après une courte exposition (1 et 5h) à des concentrations létales en NP (CL50 et CL100), ces intoxications induisant des changements morphologiques mineurs. Le processus apoptotique est clairement amorcé après 1h d'exposition (Fig.15).

Cette étude montre la toxicité du nonylphénol sur la survie d'*H. attenuata*, ainsi que l'induction de l'apoptose. La toxicité enregistrée apparaît pour des concentrations environnementales existant dans des secteurs pollués. L'hydre apparaît être une des espèces d'invertébrés les plus sensibles, confirmant les conclusions d'autres travaux sur diverses molécules. Cette étude démontre également les effets apoptotiques précoces (en moins de 1h) du NP, pouvant expliquer la désintégration des hydres. Cet effet ne semble pas s'accroître avec le temps, ce qui corrobore les résultats des tests de toxicité où la survie n'évolue plus après 24h d'exposition. Des études antérieures ont déjà prouvé que le NP induit l'apoptose dans des cellules spécialisées de mammifères (Sertoli, PC12, Leydig, spermatocytes). Comme la voie de la caspase-3 est activée lors de l'apoptose induite par la colchicine chez l'hydre (Cikala et al., 1999), il serait intéressant d'étudier si cette voie est mobilisée par le nonylphénol. Ce travail montre que la toxicité du NP peut résulter de l'apoptose, mais des études complémentaires restent à faire, notamment l'évaluation des effets du NP sur la reproduction sexuée ou encore l'évolution du succès d'alimentation consécutive à l'altération des tentacules. Il serait intéressant d'étudier les conséquences des changements sur le long terme et d'utiliser des concentrations plus faibles que celles employées.

4-NONYLPHENOL INDUCED TOXICITY AND APOPTOSIS IN *HYDRA ATTENUATA*

SOPHIE PACHURA,*† JEAN-PIERRE CAMBON,‡ CHRISTIAN BLAISE,§ and PAULE VASSEUR†

†Lab Ecotoxicité et Santé Environnementale, CNRS UMR 7146, Unité de Formation et de Recherche Sciences, Université de Metz, rue Général Delestraint, 57070 Metz, France

‡Centre de Phytopharmacie, Université de Perpignan, 52 Avenue Paul Alduy, 66860 Perpignan, France

§Centre Saint-Laurent, Environnement Canada, 105 rue McGill, Montréal, Québec H2Y 2E7, Canada

(Received 22 December 2004; Accepted 19 May 2005)

Abstract—Effects of 4-nonylphenol (4-NP) on the morphology and survival of the cnidarian *Hydra attenuata* were studied under acute exposure conditions. The lethal concentration value inducing 50% mortality after 96 h was $97.5 \pm 20 \mu\text{g/L}$, whereas the lethal concentration value inducing 10% mortality after 96 h was $64 \pm 25.5 \mu\text{g/L}$. The no-observed-effect concentration based on morphological criteria was less than $25 \mu\text{g/L}$. *Hydra* was one of the most sensitive freshwater invertebrate species behind the amphipod *Hyalella azteca*. Toxicity effects appeared rapidly and did not evolve substantially between 24 and 96 h of exposure. Induction of apoptosis was registered during the first hour of exposure to 4-NP at lethal concentrations, indicating rapid effects of the chemical. Abnormal increase of apoptosis may explain the acute toxicity of 4-NP in *hydra*. Results show that *hydra* viability is affected in the short term at 4-NP concentrations normally found in contaminated sites, but not at those concentrations reflecting lower levels of environmental contamination.

Keywords—Morphology Cnidarian Freshwater species Toxicity Apoptosis

INTRODUCTION

The number of anthropogenic chemicals released into the environment has been steadily increasing since the onset of industrialization. In particular, contamination of aquatic ecosystems by synthetic chemicals and their metabolites is of concern, because their mechanisms of toxicity remain largely unknown. Furthermore, reported endocrine disruption in aquatic (in)vertebrates has raised the issue of long-term effects and the impact that some anthropogenic chemicals can have on wildlife. Indeed, endocrine disruptors have been shown to disturb development, growth, reproduction, and sexual behavior in several species of oviparous biota [1].

Alkylphenols are synthetic chemicals of concern because of their endocrine properties [2]. Alkylphenols and their derivatives, alkylphenol polyethoxylates, are used in paints and pesticides and as surfactants in industrial and household detergents. Nonylphenol (NP) has been identified as a critical alkylphenol polyethoxylate metabolite because of its recalcitrance to biodegradation, toxicity, and ability to bioaccumulate in aquatic organisms [3]. Nonylphenol and degradation by-products of the parent nonylphenolic substances are detected in surface waters of Europe, North America, Japan, and Asia [4]. The median concentrations of NP in rivers generally are less than $1 \mu\text{g/L}$, but higher levels can be registered locally at the outfall of wastewater treatment plants that are inefficient in removing nonylphenolic compounds [5]. Even concentrations of several hundred micrograms per liter have been recorded at locations close to pollution sources without treatment facilities (<http://sea.helcom.fi/dps/docs/folders/Project%20on%20Hazardous%20Substances/HazSub7.html>).

Recently, estrogenic effects of NP have been well documented by numerous in vitro and in vivo studies [6,7]. Nonylphenol has been shown to have estrogenic potential in ver-

tebrates, such as fish, birds, and mammals, in which NP displaces 17β -estradiol from its receptor [2]. Less information exists on the potential endocrine-disrupting effects of NP toward invertebrates [8].

Several in vivo and in vitro studies have reported the apoptotic properties of NP [9–11], whereas others have not corroborated this finding [12,13]. Dysregulation of apoptosis, leading to an abnormal increase or a blockage of apoptosis, may explain infertility, developmental alteration, and short- or long-term toxicity [14].

The present study sought to investigate the toxicity of 4-NP on the freshwater microinvertebrate *Hydra attenuata*, a cnidarian commonly found in lentic streams and waters that are clean or slightly polluted. This hydrozoan is sensitive to various pollutants [15], and its absence in aquatic environments is a sign of chemical pollution. Field studies have shown that *hydra* play an important role in structuring the planktonic makeup of ponds and bodies of water and in maintaining diversity of zooplankton [16]. Adult *hydra* undergo drastic changes in morphology when exposed to toxic events, with death and disintegration comprising the ultimate phases of toxicity. Apoptosis occurs during growth regulation and morphogenesis of *hydra* [17]. In the present study, we investigate specific toxicity aspects of 4-NP, and we show that 4-NP induces apoptosis in *hydra* at lethal concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Culture maintenance

Hydra populations were maintained and fed as described previously [18]. *Hydra attenuata* cultures were grown in glass dishes of 1.5-L capacity and filled with 0.5 L of *hydra* medium containing 110 mg/L of N-Tris (hydroxymethyl) methyl 1-2-aminoethanesulfonic acid, 147 mg/L of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 4 mg/L of ethylenediaminetetraacetic acid. The stock cultures were

* To whom correspondence may be addressed.
(ese@sciences.univ-metz.fr).

maintained in incubators at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ under a 16:8-h light:dark photoperiod at 800 lux.

Hydra were fed twice per week with freshly hatched *Artemia salina* nauplii provided in excess. The medium was replaced after 3 h of feeding, and hydra were rinsed with fresh medium. Once a week, hydra were transferred to a clean dish. Hydra used in testing were nonbudding individuals selected at random from stock cultures and sampled 5 d after feeding, which contributed to culture homogeneity by favoring similarly sized nonbudding animals. The animals were not fed during the test period.

Chemicals

All chemicals were purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France), and 4-NP (CAS no 84852-15-3; purity, $\geq 85\%$) was obtained from Fluka (St. Quentin Fallavier, France). The latter was solubilized in the hydra medium without the addition of any cosolvent. Test solutions were prepared by diluting a 4-NP-saturated solution with the hydra medium. The saturated solution was prepared by stirring glass microspheres impregnated with 4-NP as described by Graff et al. [19]. Then, 10 g of microspheres were introduced into a small basket plunged into 500 ml of hydra medium and stirred in the dark for 20 h. Thereafter, the saturated solution was filtered on a glass-fiber membrane of 1.2- μm porosity and immediately diluted with hydra medium to obtain a series of dilutions for the hydra assays (20, 15, 10, 7.5, 5, 3, 2.5, 2, or 1%). A saturated solution was prepared before each series of assays (<24 h) in the three independent experiments (A, B, and C) that were performed. The 4-NP concentration was measured in the saturated solutions, in which the concentrations were 2.7 ± 0.9 mg/L, indicating substantial differences between preparations. In experiments B and C, the 4-NP concentration was systematically measured in the 10% dilutions of the saturated solution after sampling from test vials at the end of the 96-h hydra exposure. This dilution was chosen because it approximated the median lethal concentration (LC50) found in experiment A. Concentrations in the other dilutions were determined based on the result obtained in the 10% test dilution rather than that of the saturated solution.

Chemical analyses

A 10-ml volume of the 4-NP solution was withdrawn for analysis and placed in a glass tube (to which acetonitrile was added in a ratio of 1:1, v/v, to prevent adsorption of 4-NP on tube walls during storage). Saturated solution A was analyzed within 72 h after collection. Saturated solutions of experiments B and C were analyzed at the same time as the 10% dilutions (i.e., within 72 h after completion of the bioassays).

Concentrations of 4-NP were measured using a high-performance liquid chromatographic technique. The chromatograph was equipped with a L6000 pump (Merck, Fontenay sous Bois, France) and an ultraviolet-spectrophotometric detector (SPD-6A; Shimadzu, Duisburg, German). A Rheodyne 7161 injection valve with a 50- μl sample loop and Inertsil ODS-3 (250 $\times$ 4.6 mm; AIT) analytical column were used. Chromatographic separation was carried out in isocratic mode using a mixture of water:acetonitrile:trifluoroacetic acid (20/80/0.2, v/v/v) as a mobile phase. Analyte concentrations were determined by external calibration using peak-area measurements at the detection wavelength of 225 nm.

Table 1. Key for assessing progressive toxic effects in hydra^a

Score	Morphological status of polyp
10	Extend tentacles, body reactive
9	Partially contracted, slow reactions
8	Clubbed tentacles, body slightly contracted
7	Shortened tentacles, body slightly contracted
6	Tentacles and body shortened
5	Totally contracted, tentacles visible
4	Totally contracted, no visible tentacles
3	Expanded, tentacles visible
2	Expanded, no visible tentacles
1	Dead but intact
0	Disintegrated

^a Wilby [20].

Acute toxicity assay on hydra polyps

Adult hydra were exposed continuously to the test chemical during 96 h in 20-ml glass vials. To saturate the glass walls with 4-NP and limit chemical adsorption during the test period, an aliquot of the test solution was added to each vial, left to stand for 15 min, then removed and replaced with an identical test solution. Three animals were placed into each vial containing 20 ml of a test solution, and triplicates were carried out for each concentration tested in every bioassay. Hydra polyps were observed at time zero to ensure viability. Hydra were monitored using a stereomicroscope ($\times 18$) every hour during the first 7 h in experiment B and then every 24 h. In each series of experiment, several independent bioassays were conducted to assess 4-NP toxicity. Test medium composition, temperature, and photoperiod used during exposure were similar to those for maintaining hydra cultures.

Hydra react to an environmental stress by contracting their tentacles and body, and they can display a broad range of morphological changes. These changes were recorded and scored from 10 (normal) to 0 (disintegrated) as described in the detailed key (Table 1) constructed by Wilby [20]. Disintegrating hydra progressively exhibit different morphological stages (Fig. 1): Clubbed tentacles (score 8), shortened tentacles (score 6), tulip phase (score 5), and disintegration (score 0). Tulip phase and disintegration were recorded as death [17]; thus, lethality corresponds to scores between 5 and 0. Toxicity also was expressed by LC50s and 10% lethal concentrations (LC10s).

The highest concentration tested that failed to induce any morphological change in the exposed individuals (score 10) compared to controls was recorded in all bioassays. This concentration was defined as the no-observed-effect concentration (NOEC) in the present study.

DNA ladder

The purification of fragmented DNA was performed using the Suicide Track DNA Ladder Isolation kit according to the manufacturer's instructions (catalog no. AM41-IEA; Oncogene). The technique is a nonisotopic method for detection of the 180 to 200 base pairs of DNA fragments separated by standard agarose gel electrophoresis. This DNA fragmentation, which is typical of an apoptotic process, results from activation of endogenous Ca^{2+} - and Mg^{2+} -dependent nuclear endonuclease that selectively cleaves DNA at sites between nucleosomal units, generating mono- and oligonucleosomal DNA fragments. To summarize, DNA was extracted from cells using a lysis buffer. After RNA degradation and DNA isolation, 2-

73

75

74

76

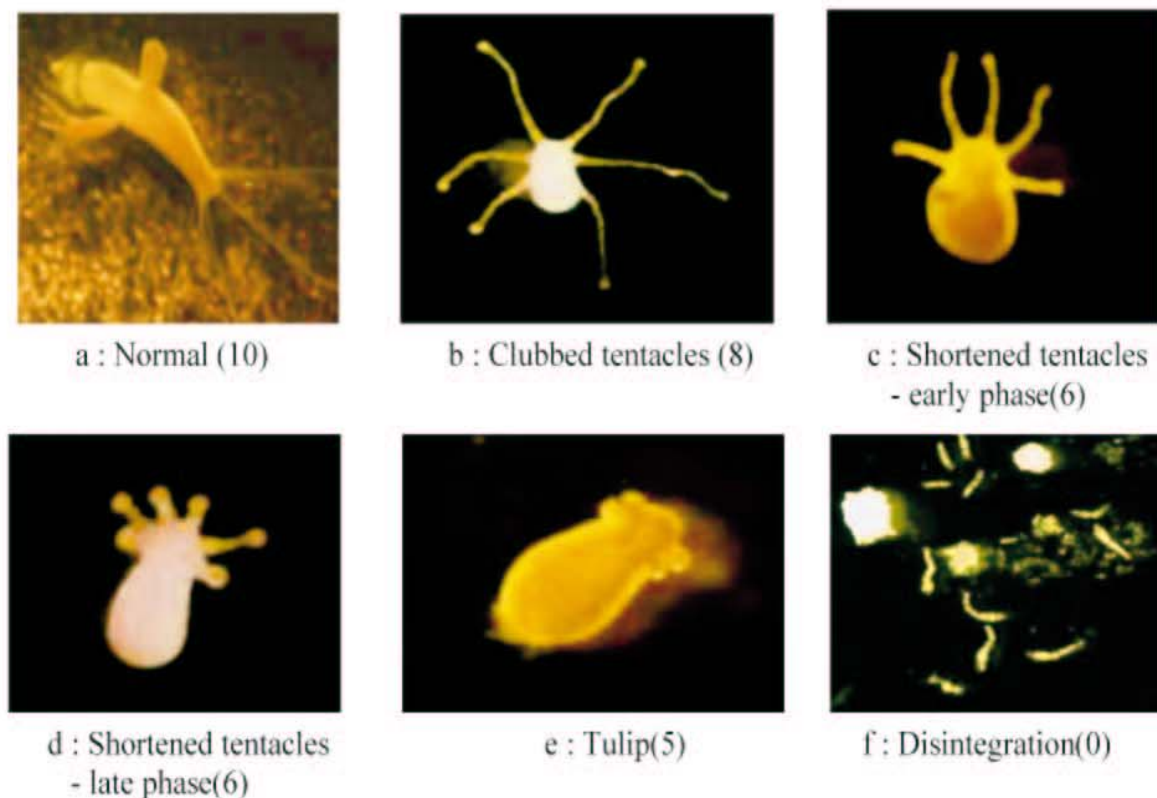


Fig. 1. Morphology of hydra polyps from normal (score 10) to disintegrated (score 0) through the intermediary steps of clubbed (score 8), shortened tentacles (score 6), and tulip phase (score 5).

propanol was added to precipitate DNA. Pellets were washed with ethanol, resuspended, and then loaded onto a 1.5% agarose gel containing 0.1% ethidium bromide. Fragments of DNA were separated by electrophoresis (50 V for 1 h) and then visualized by ultraviolet illumination.

Several independent experiments were conducted on different hydra cultures to study the effects of 4-NP on DNA fragmentation at nominal concentrations inducing lethal effects (LC50 and LC100). Each assay was performed on five hydra polyps without bud and after a 5-d period of starvation. After a short exposure (1 or 5 h) to 4-NP concentrations that were checked in parallel, the test medium was centrifuged at 5,000 *g* for 30 s to pellet the hydra. The medium was removed, and the hydra were rinsed with fresh hydra medium. Pellets were lysed and DNA extracted as described above.

Data and statistical analyses

After polyp observations and scoring, LC50s and LC10s were determined using the Inhibition Concentration Approach (ICp) software (Ver 2.0; U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN). The ICp approach is a linear interpolation method for estimating a (sub)lethal toxicity as recommended in aquatic toxicity studies by the U.S. Environmental Protection Agency [21]. The ICp, or the inhibition concentration estimator associated with proportion *p* inhibition relative to the control response (i.e., LC50 or LC10), is defined as the linear interpolant between the concentration associated with the two nearest means bracketing the specified decrement from the control mean. The number of viable hydra in each vial and for each concentration was used to determine the LC50 (IC50) and LC10 (IC10).

Because normality and homogeneity of the data could not be assumed, nonparametric methods were used to perform the comparisons. Results obtained in the three experiments were

analyzed using the Kruskal–Wallis test. Comparisons between LC50s and LC10s were performed using the nonparametric Mann–Whitney test.

RESULTS

Toxicity of 4-NP

The preliminary experiment (experiment A) was carried out with hydra exposed to seven dilutions ranging between 20 and 1% of a 4-NP saturated solution in which chemical analysis was performed in the saturated solution. Results indicated that the 96-h LC50 averaged 118 $\mu\text{g/L}$ (Table 2) and that this concentration corresponded to approximately the 10% dilution.

Further experiments were conducted by measuring the 4-NP concentration in the test medium at 10% dilution of the saturated solution. Experiment B, which was carried out using six series of dilutions from the same saturated solution, showed that the measured concentrations of the 10% dilutions were in the range of 118 to 128 $\mu\text{g/L}$. Experiment C was carried out with one series of dilutions tested on three different cultures.

The acute toxicity of 4-NP was determined from experiments A, B, and C (Table 2). No statistical difference in the 96-h LC50s ($p = 0.09$) or in the 96-h LC10s ($p > 0.5$) was registered between the three experiments. The LC50 after 96 h of exposure were $97.5 \pm 20 \mu\text{g/L}$. The 96-h LC10 was $64 \pm 25.5 \mu\text{g/L}$ and differed significantly from the 96-h LC50 ($p < 0.01$).

The relationships between concentrations and toxicity expressed by the mean score and time of exposure to 4-NP are presented in Figure 2 for the first hours of exposure (Fig. 2a) and for the period from 24 to 96 h (Fig. 2b). Mean score decreases with an increase of exposure concentrations and time during the first 4 h of exposure. Beyond 24 h, no major change in the shape of the concentration–response curve was ob-

Table 2. Acute toxicity of 4-nonylphenol (4-NP) on adult hydra expressed as lethal concentrations ($\mu\text{g/L}$) inducing 50% (LC50) and 10% (LC10) of mortality after 96 h of exposure to different dilutions of a saturated solution^a

Experiment	4-NP test solution measured		Range of concentrations tested	Bioassay no.	96-h lethal concentration			
	% Saturated solution	Concentrations ($\mu\text{g/L}$)			LC50	mean	LC10	mean
A	100%	2060	20–412	1	129	118	108	82
				2	95		31	
				3	129		108	
B	10%	118	24–177	1	59	87	31	57
	10%	126	25–189	2	88		35	
	10%	125	25–188	3	94		69	
	10%	128	26–192	4	96		70	
	10%	122	24–183	5	92		67	
	10%	125	25–188	6	94		69	
	10%	176	35–264	1	110		63	
C	10%	176	35–264	2	110	98	63	59
				3	74		51	
				Weighted mean			97.5 $\pm$ 20	

^a Lethal concentrations were evaluated from the 4-NP concentration measured in the 10% dilutions in experiments B and C.

served. Morphological changes occurred rapidly after exposure to high concentrations, with 100% lethality observed within 24 h at the highest concentration tested, but changes evolved more slowly at low concentrations. No change was observed in control hydra that were assigned a score of 10 throughout the experiment. Slight changes in tentacle morphology were noted at the lowest concentration tested (25 $\mu\text{g/L}$), and these changes corresponded to a score of 9 on the hydra scale. Hence, a concentration inducing no adverse effect on morphology could not be determined from the set of concentrations examined, and the NOEC clearly was less than this concentration.

Apoptotic effects of 4-NP

The typical DNA fragmentation ladder pattern that is characteristic of apoptosis was observed in hydra exposed to 4-NP, compared with controls in which no or only limited ap-

optotic DNA fragmentation was registered (Fig. 3). The DNA fragments revealed a distinctive ladder pattern that consisted of multiples of 180 to 200 base pairs. This apoptotic feature appeared rapidly (i.e., after 1 h of exposure to lethal concentrations of 4-NP), as shown in Figure 3, corresponding to two independent assays. Minor morphological changes (clubbed tentacles) in hydra were visible at this time for the two concentrations tested. Changes in hydra morphology were clearly detectable after 5 h, and degradation of morphology was then reflected by poor hydra scores. The DNA fragmentation presented the same intensity after 1 and 5 h of exposure, indicating early onset of the apoptotic process.

DISCUSSION

In the present study, the tested NP solutions were prepared without the use of a cosolvent to eliminate any possible carrier

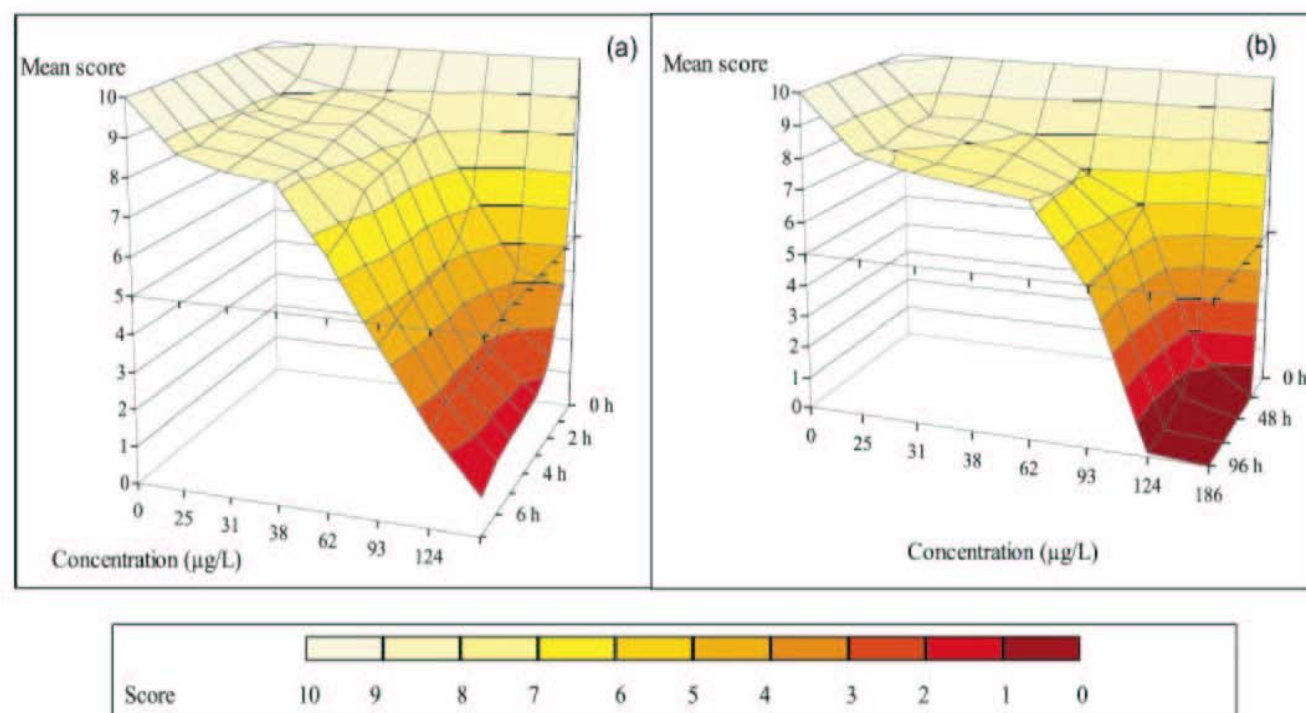


Fig. 2. Toxic effects of 4-nonylphenol (4-NP) on hydra polyps. Relationships between score of polyp morphology, concentrations, and time of exposure to 4-NP. Results from six bioassays (experiment B) were used to establish mean scores. **a.** Mean scores for hydra following 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 h of exposure to 4-NP ($n = 6$). **b.** Mean scores for hydra following 0, 24, 48, 72, and 96 h of exposure to 4-NP ($n = 6$).

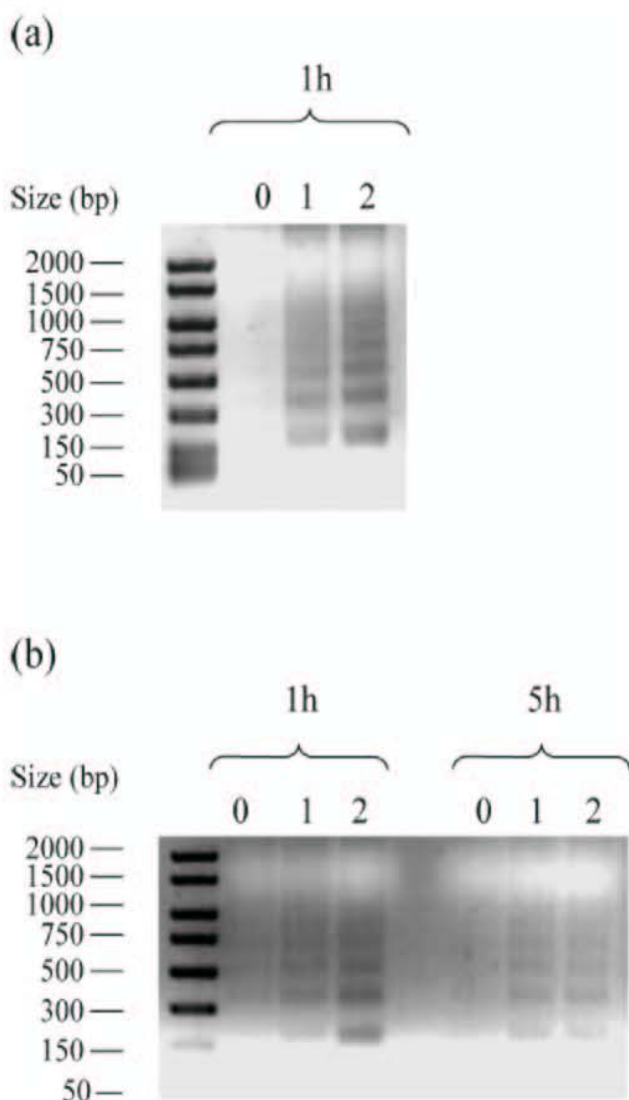


Fig. 3. Pattern of DNA electrophoresis demonstrating apoptosis in hydra polyps in two independent experiments: (a, b). Exposure to 4-nonylphenol (4-NP) during 1 and 5 h. Lane 0: control; lanes 1 and 2: concentrations corresponding to lethal concentrations inducing 50% (LC50) and 100% (LC100) of mortality, respectively. bp = base pairs.

interference. The high adsorption properties of NP could result in a rapid decrease of concentrations in the test media. To overcome this problem, we chose to assess 4-NP toxicity on hydra immediately after preparation of the test dilutions, to saturate the test glass vials with 4-NP at each concentration tested, and to sample the 10% dilution at the end of the bioassay. The 10% dilution concentration was selected for analysis because it approximated the LC50 and helped to determine the concentrations of subsequent dilutions tested. Although not all the tested concentrations were measured, the actual concentrations of test solutions lower than 10% (prepared by serial dilution with the hydra medium) can be considered to be close to the calculated concentrations.

The acute toxicity of 4-NP to hydra yielded an LC50 of $97.5 \pm 20 \mu\text{g/L}$ in the present study. Hydra appear to be one of the most sensitive invertebrate species in terms of exposure to NP that have been tested to date. The most sensitive species responding to NP was reported to be the amphipod *Hyalella azteca*, to which the U.S. Environmental Protection Agency [22] attributed a species mean acute value of $56 \mu\text{g/L}$. In contrast, the snail *Physella virgata* was the least sensitive species, with a LC50 of $774 \mu\text{g/L}$ [22,23]. The mean acute

value for *Daphnia magna* was $127 \mu\text{g/L}$ [22]. Freshwater fish species were in the midrange of toxicity to NP, with most of the 96-h LC50s ranging from 100 to $300 \mu\text{g/L}$ [24]. The freshwater final acute value for NP calculated according to the U.S. Environmental Protection Agency guidelines [25] was $55.7 \mu\text{g/L}$. Effects on survival were not dramatically increased after longer periods of invertebrate exposure to NP, contrary to effects on reproduction. Indeed, the 48-h median effective concentration of NP to *D. magna* was $190 \mu\text{g/L}$, whereas survival of daphnids was affected at greater than $130 \mu\text{g/L}$ after 21 d of exposure [26]. Likewise, the NOEC and lowest-observed-effect concentration for reproduction were 24 and $39 \mu\text{g/L}$, respectively.

These data confirm the usefulness of hydra as a sensitive and ubiquitous species in aquatic ecosystems to assess the toxicity of freshwater pollutants, as was shown for pesticides [27], metals [28–30], solvents/glycol ethers [31], estrogens [32], and drugs [33].

In the present study, we demonstrated the apoptotic effects of NP in hydra. Apoptosis was triggered very quickly after the onset of exposure and may explain disintegration of this cnidarian. Apoptotic effects did not increase with time, which is in line with the fact that effects of NP on hydra survival did not evolve dramatically over time, from 24 to 96 h of exposure and beyond. Because hydra regeneration, tested in parallel to survival, was altered at the same concentrations as those affecting survival (data not shown), it can be surmised that induction of apoptosis is responsible for both effects. This hypothesis certainly merits further study.

Programmed cell death has been shown to mediate tissue destruction and to be a mechanistic tool for body shaping and regulating events during development of the marine hydrozoan *Hydractinia echinata* [34]. Features typical of apoptosis have been observed in nurse cells during early stages of oogenesis resulting from sexual reproduction of hydra and gametogenesis [35]. Technau et al. [35] demonstrated that initiation of nurse cell apoptosis was a source of nutrients essential for oocyte development. Cikala et al. [17] also demonstrated that apoptosis can be induced in hydra by treatment with colchicines and that the process involved caspase-3-specific enzyme activity. Programmed cell death is a physiological process that occurs naturally in hydra, as corroborated by findings of some apoptotic degradation in controls. Yet, dysregulation of programmed cell death, a highly physiologically controlled process, may have consequences regarding the homeostasis of species in both the short and the long term.

Wang et al. [9] demonstrated that 4-NP caused a significant increase in apoptotic Sertoli cells exposed to $3,000 \mu\text{g/L}$ for 72 h. Aoki et al. [36] also found induction of apoptosis in PC12 mammal cells exposed to NP in the range 0.01 to $100 \mu\text{g/L}$. Additionally, in vivo studies recorded the apoptotic effects of NPs. Weber et al. [37] showed an increase of apoptotic cells in testis-Leydig-homologue cells, Sertoli cells, and spermatocytes of the adult male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed for six weeks to $100 \mu\text{g/L}$ of 4-NP. These results enabled those authors to put forward the hypothesis that defective effects of NP on gametogenesis and reproduction in vertebrates could be related, in part, to its apoptotic properties in addition to its estrogenic disrupting effects.

The present study did not investigate the effects of NP on sexual reproduction of hydra, as was done by Pascoe et al. [32] for 17α -ethinylestradiol and bisphenol A and by Vandenberg et al. [38] for 17α -ethinylestradiol. No reproductive

710

711

effects were recorded at the lower, environmentally relevant concentrations of the chemicals tested by those authors, leading to the conclusion that the primitive cnidaria are not subject to disruption by estrogens or estrogen mimics [32]. Those authors [32] postulated that damage recorded with these chemicals at high concentrations probably result from general toxicity rather than from disruption of hormonal/signaling processes.

Toxicity recorded on hydra in the present study occurred at 4-NP concentrations that are representative of those at polluted sites. As a result of the reduction in use of NP ethoxylates for industrial and domestic detergents, average NP levels in surface waters have tended to decrease during the last decade and, today, generally are less than 1 µg/L in most bodies of water [39]. Yet, environmental concentrations above this level can still be found. The median concentration of NP measured in 139 U.S. rivers sampled in the years 1999 and 2000 was 0.8 µg/L, but a maximum of 40 µg/L was recorded [39]. Moreover, several hundred micrograms per liter can be found in specific areas, especially when municipal and industrial wastewater treatment plants are either inefficient at removing nonylphenolic compounds or absent (<http://sea.helcom.fi/dps/docs/folders/Project%20on%20Hazardous%20Substances/HazSub7.html>). Toxicity to hydra may be expected under acute exposure conditions at environmental concentrations close to or greater than the 96-h LC10 (64 ± 25.5 µg/L), which would result in the disappearance of this hydrozoan in polluted freshwater ecosystems of this nature. Further investigations certainly are warranted to assess development of the hydra population under chronic exposure conditions at 4-NP environmental concentrations lower than the LC10 level.

At low concentrations that are environmentally relevant (<1 µg/L), the present data concerning 4-NP suggest that hydrozoan viability is not threatened following acute exposure if LC10 values are considered. In this case, the safety factor is close to 50, and it seems to be large enough to account for chronic effect uncertainties in the field. In contrast, if NOECs are considered, the safety factor will be less than 25, because morphological changes reflecting sublethality already have been noted at this concentration. Although changes in hydra were slight at 25 µg/L, alteration of feeding success consecutive to alteration of tentacles cannot be discarded. Therefore, it would be of interest to study the long-term consequences of these changes and to investigate concentrations lower than those employed here. Because lower exposure levels were not tested in the present study, we were unable to determine a precise acute exposure NOEC for 4-NP.

The present study has shown that toxicity of 4-NP may result from apoptosis, a cellular mechanism likely to impair survival as well as regeneration. This latter aspect remains to be investigated. Yet, adverse effects on other physiological processes, such as sexual reproduction (not evaluated in the present study), cannot be excluded and deserve additional attention in future studies.

Acknowledgement—The present study was supported by the Program National d'Ecotoxicologie, coordinated by C. Casellas. The authors warmly thank Armand Maul for his assistance in statistics. The authors acknowledge the Ministry in charge of the Environment in Paris and the French Ministry of Research for their grants as well as the Region Lorraine (Contrat Plan Etat Région) for their financial contribution.

REFERENCES

1. Ankley G, Mihaich E, Stahl R, Tillitt D, Colborn T, McMaster S, Miller R, Bantle J, Campbell P, Denslow N, Dickerson R, Folmar L, Fry M, Giesy J, Gray LE, Guiney P, Hutchinson T, Kennedy S, Kramer V, LeBlanc G, Mayes M, Nimrod A, Patino R, Peterson R, Purdy R, Ringer R, Thomas P, Touart L, Van Der Kraak G, Zacharewski T. 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-)estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environ Toxicol Chem* 17:68–87.
2. White R, Jobling S, Hoate SA, Sumpter JP, Parker MG. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135:175–182.
3. Arukwe A, Thibaut R, Ingebrigtsen K, Celius T, Goksøyr A, Cravedi JP. 1999. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol* 49:289–304.
4. Ying GG, Williams B, Kookana R. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—A review. *Environ Int* 28:215–226.
5. Berryman D, Houde F, DeBlois C, O'Shea M. 2004. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluent: A survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. *Chemosphere* 56:247–255.
6. Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 15:194–202.
7. Tollefsen KE, Mathisen R, Stenersen J. 2002. Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp Endocrinol* 126:14–22.
8. Depledge MH, Billingham Z. 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar Pollut Bull* 39:32–38.
9. Wang X, Han X, Hou Y, Yao G, Wang Y. 2003. Effect of nonylphenol on apoptosis of Sertoli cells in vitro. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:898–904.
10. Bevan CL, Porter DM, Prasad A, Howard MJ, Henderson LP. 2003. Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*. *Environ Health Perspect* 111:488–496.
11. Yao G, Hou Y. 2004. Nonylphenol induces thymocyte apoptosis through Fas/FasL pathway by mimicking estrogen in vivo. *Environ Toxicol Pharmacol* 17:19–27.
12. Talorete TPN, Isoda H, Maekawa T. 2001. Alkylphenolic compounds and their effect on the injury rate, survival, and acetylcholinesterase activity of the rat neuronal cell line PC12. *Cyto technology* 36:163–169.
13. Negishi T, Ishii Y, Kyurwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. 2003. Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neurosci Lett* 353:99–102.
14. Wyllie AH. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer Metastasis Rev* 11:95–103.
15. Holdway DA. 2005. Hydra population reproduction toxicity test method. In Blaise C, Féraud JF, eds. *Small-Scale Freshwater Toxicity Investigations*, 1st ed, Vol 1—Toxicity Test Methods. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 502–522.
16. Schwartz SS, Hann BJ, Hebert PDN. 1983. The feeding ecology of *Hydra* and possible implications in the structuring of zooplankton communities. *Biol Bull* 164:136–142.
17. Cikala M, Wilm B, Hobmayer E, Böttger A, David CN. 1999. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Curr Biol* 9:959–962.
18. Trotter S, Blaise C, Kusui T, Johnson EM. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ Toxicol Water Qual* 12:265–271.
19. Graff L, Isnard P, Cellier P, Bastide J, Cambon JP, Narbonne JF, Budzinski H, Vasseur P. 2003. Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters. *Environ Toxicol Chem* 22:1368–1379.
20. Wilby OK. 1988. The Hydra regeneration assay. *Proceedings, Workshop Organized by Association Française de Teratologie*, Royanmont, France, June 3, pp 108–124.
21. Norberg-King TJ. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach. Ver 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 03-93. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN, USA.

22. U.S. Environmental Protection Agency. 2003. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol—Draft. EPA 822-R-03-029. Washington, DC.
23. Brooke LT. 1993. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. EPA 68-C1-0034. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN.
24. Servos MR, Maguire RJ, Bennie DT, Lee HB, Cureton PM, Davidson N, Sutcliffe R, Rawn DFK. 2003. An ecological risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in the aquatic environment. *Hum Ecol Risk Assess* 9:569–587.
25. Stephan CE, Mount DI, Hansen DJ, Gentile JH, Chapman GA, Brungs WA. 1985. Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. PB85-227049. National Technical Information Service, Springfield, VA, USA.
26. Comber MHL, Williams TD, Stewart KM. 1993. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Res* 27:273–276.
27. Pollino CA, Holdway DA. 1999. Potential of two *Hydra* species as standard toxicity test animals. *Ecotoxicol Environ Saf* 43:309–316.
28. Karntanur W, Pascoe D. 2000. A comparison of methods for measuring acute toxicity to *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* 41:1543–1548.
29. Holdway DA, Lok K, Semaan M. 2001. The acute and chronic toxicity of cadmium and zinc to two *Hydra* species. *Environ Toxicol* 16:557–565.
30. Karntanur W, Pascoe D. 2002. The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere* 47:1059–1064.
31. Bowden HC, Wilby OK, Botham CA, Adam PJ, Ross FW. 1995. Assessment of the toxic and potential teratogenic effects of four glycol ethers and two derivatives using the *Hydra* regeneration assay and rat whole embryo culture. *Toxicol In Vitro* 9:773–781.
32. Pascoe D, Carroll K, Karntanur W, Watts MM. 2002. Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. *Arch Environ Contam Toxicol* 43:56–63.
33. Pascoe D, Karntanur W, Müller CT. 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere* 51:521–528.
34. Selpp S, Schmich J, Leitz T. 2001. Apoptosis—A death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa). *Development* 128:4891–4898.
35. Technau U, Miller MA, Bridge D, Steele RE. 2003. Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis. *Dev Biol* 260:191–206.
36. Aoki M, Kurasaki M, Saito T, Seki S, Hosokawa T, Takahashi Y, Fujita H, Iwakuma T. 2004. Nonylphenol enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *Life Sci* 74:2301–2312.
37. Weber LP, Kiparissis Y, Hwang GS, Niimi AJ, Janz DM, Metcalfe CD. 2002. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comp Biochem Physiol C* 131:51–59.
38. Vandenberg GF, Adriaens D, Verslycke T, Janssen CR. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicol Environ Saf* 54:216–222.
39. Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211.

II.B. - ÉTUDE DE LA TOXICITÉ DU NONYLPHÉNOL CHEZ L'EMBRYON (ARTICLE 2).

TOXICITÉ DU NONYLPHÉNOL CHEZ LE CNIDAIRE *HYDRA ATTENUATA* ET ÉVALUATION DE RISQUE POUR L'ENVIRONNEMENT.¹⁴

(Toxicity of nonylphenol on the cnidarian Hydra attenuata and environmental risk assessment.)

Les résultats obtenus après criblage des substances chimiques et l'étude de la toxicité du NP chez l'adulte, nous ont amenés à approfondir l'étude du NP sur la survie de l'hydre et sur le développement, en particulier sur la régénération d'un tronçon gastrique (Fig.16). La toxicité sur le développement est d'abord comparée à celle obtenue chez l'adulte, puis à celles obtenues chez d'autres espèces d'invertébrés et vertébrés d'eau douce, afin d'en discuter en terme de risque pour l'environnement et selon les objectifs de qualité recommandés dans les pays industrialisés. Des adultes et des embryons sont exposés en parallèle à la même gamme de concentrations de NP et dans les mêmes conditions. La survie et le développement sont observés durant 96h. Le test de toxicité nous permet de déterminer une LOEC en terme de pourcentage de solution (nominal) chez l'adulte (A) et chez l'embryon (D); la LOEC est employée dans le calcul d'un ratio A/D. Ce ratio exprime l'aptitude du NP à altérer spécifiquement le développement ou non.

Nous avons ainsi pu montrer que le ratio A/D obtenu à partir de plusieurs expérimentations indépendantes est de $3,1 \pm 1,8$ (Table 21), bien qu'aucune anomalie dans le développement n'ait été enregistrée durant les 96h d'exposition, mise à part la mortalité. Les premiers travaux sur le NP nous donnaient une valeur de CL10-96h de 64 µg/L chez l'adulte, ce qui nous permet grâce au ratio de 3,1 d'estimer une LOEC-96h autour de 21 µg/L chez l'embryon.

Si l'on compare ces résultats aux effets enregistrés sur les anomalies induites par le NP chez d'autres invertébrés (daphnie, huître ou éponge), il apparaît que l'hydre a une sensibilité plus importante. L'espèce la plus sensible à la toxicité du NP enregistrée est un invertébré marin *Mysidopsis bahia* avec une NOEC-28j de 3,9 µg/L. Les valeurs de toxicité, aiguë et chronique, montrent que l'hydre apparaît être l'une des espèces d'invertébrés les plus

¹⁴ Soumis dans *Environmental Toxicology*

sensibles à l'état adulte, comparés à d'autres espèces de vertébrés et invertébrés d'eau douce (Fig.17). Pour la toxicité chronique, peu d'informations existent chez les invertébrés. L'une des espèces d'invertébrés les plus sensibles est *Brachionus calyciflorus*. Le tronçon gastrique semble être un bon indicateur pour l'étude de la toxicité chronique puisque la LOEC-96h observée (21 µg/L) est l'un des résultats sur le développement les plus sensibles (Fig.18). Bien que les méthodes de calcul mises en œuvre dans l'estimation du risque pour l'environnement varient selon les pays, parfois selon les auteurs, il apparaît que le NP relargué dans l'environnement a, ou peut avoir un effet sur le court et le long terme, chez les vertébrés et les invertébrés, en particulier sur leur reproduction et leur développement, dans le cas de milieux pollués comprenant des concentrations supérieures au µg/L, voire des dizaines de µg/L.

Nous avons montré que l'hydre était l'une des espèces d'invertébrés les plus sensibles pour la toxicité chez l'adulte et l'embryon. Cependant, les effets se produisent à des concentrations supérieures à celles normalement retrouvées dans l'environnement et généralement inférieures au µg/L. L'étude des effets toxiques du NP chez des larves et embryons d'invertébrés est récente. Les invertébrés représentent un ensemble d'individus d'une trentaine de phyla, avec des systèmes de contrôle de la reproduction et du cycle de vie très divers, mais aussi très mal connus. Les vertébrés, apparus dans la suite, ont développés des systèmes endocriniens qui ont vraisemblablement des caractères communs avec les invertébrés, mais sont aussi plus évolués. Il n'est pas certain que les perturbateurs endocriniens présentent un risque équivalent chez les vertébrés et les invertébrés. Cependant, plusieurs travaux ont démontré que l'hydre peut être utilisée comme indicateur des polluants hydriques. L'hydre semble également être un bon modèle prédictif dans la compréhension de la toxicité aiguë mais également de la toxicité sur le développement. Cependant, des essais prolongés au-delà des 96h d'exposition et sur de plus faibles concentrations seraient intéressants.

Figure 17. Toxicité du NP sur le court terme sur les vertébrés et invertébrés d'eau douce pour la mortalité (□), reproduction (○), production de vitellogénine (v) et développement (◇). Les symboles vides ou pleins représentent les résultats chez les adultes et les juvéniles, respectivement. Les valeurs sont exprimées en concentrations mesurées (italique pour le nominal).

	Species	Toxicity endpoint	Concentration (µg/L)				References
			0	10	100	1000	
VERTEBRATES	<i>Lepomis macrochirus</i>	NOEC-96h			■		Brooke, 1993a
		LOEC-96h				■	
		LC50-96h			■		
		LC50-96h				□	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LC50-96h				□	Brooke, 1993b
	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC-96h		■			
		LOEC-96h				■	
		LC50-96h			■		
	<i>Xiphophorus helleri</i>	LOEC-72h	v				Kwak et al., 2001
		LC50-96h				□	
INVERTEBRATES	<i>Physella virgata</i>	LC50-96h				□	Brooke, 1993a
		EC50-96h				□	
	<i>Tapes philippinarum</i>	NOEC-96h			□		Matozzo et al., 2003
		LC50-96h				>□	
	<i>Leptodea fragilis</i>	NOEC-24h			□		Milam et al., 2005
		LC50-24h				□	
	<i>Lampsilis cardium</i>	NOEC-24h			□		
		LC50-24h				>□	
	<i>Lampsilis siliquoidea</i>	NOEC-24h				□	
		LC50-24h				□	
	<i>Megalonyx nervosa</i>	NOEC-24h			□		
		LC50-24h				□	
	<i>Ligumia subrostrata</i>	NOEC-24h				□	
		LC50-24h			□		
	<i>Utterbackia imbecillis</i>	NOEC-24h				□	
		LC50-24h				□	
	<i>Paracentrotus lividus</i>	EC50-1h				●	Ghirardini et al., 2001
	<i>Ceriodaphnia</i> sp.	NOEC-24h			□		Milam et al., 2005
		LC50-24h				□	
	<i>Daphnia magna</i>	NOEC-24h				□	Comber et al., 1993 Milam et al., 2005 Comber et al., 1993 Brooke, 1993a Hirano et al., 2004 Zhang et al., 2003
		EC50-24h				□	
		LC50-24h			□		
		EC50-48h			□		
		EC50-48h		□			
		LC50-48h			□		
		EC50-96h				■	
		EC50-96h			◆		
		EC50-48h			◆		
	<i>Daphnia galeata</i>	LC50-48h		□			Tanaka and Nakanishi, 2002
PLANTS	<i>Brachionus calyciflorus</i>	EC50-72h				○	Radix et al., 2002
	<i>Brachionus calyciflorus</i>	NOEC-96h	○				Preston et al., 2000
		LOEC-96h		○			
	<i>Hyalella azteca</i>	LC50-96h		■			Brooke, 1993a
	<i>Eurytemora affinis</i>	LC50-96h		■			Forget-Leray et al., 2005
	<i>Eohaustorius estuarius</i>	LC50-96h				□	Hecht and Boese, 2002
	<i>Hydra attenuata</i>	LC50-96h				□	Pachura et al., In press
		LC10-96h			□		
		LOEC-96h		◆			
	<i>Ophiogomphus</i> sp.	EC50-96h				■	this study
	<i>Lumbricus variegatus</i>	LC50-96h				□	Brooke, 1993a
		EC50-96h				□	
		EC50-96h				□	
	<i>Lemna minor</i>	NOEC-96h				□	Graf et al., 2003
		LOEC-96h				>□	
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50-72h				◇	Brooke, 1993a
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	NOEC-96h				□	EU-RAR, 2002
		LOEC-96h				>□	
		EC50-96h				□	
	<i>Lemna minor</i>	NOEC-96h				□	Brooke, 1993a
		LOEC-96h				>□	
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	EC10-72h	□				EU-RAR, 2002
		EC50-72h	□				

TOXICITY OF NONYLPHENOL ON THE CNIDARIAN *HYDRA ATTENUATA* AND ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT.¹⁵

S. Pachura¹, C. Blaise², P. Vasseur¹

¹ Laboratoire ESE, CNRS UMR 7146, UFR Sciences - Université de Metz - rue du général Delestraint – 57070 Metz, France

² Centre Saint-Laurent – Environnement Canada – 105 rue McGill – Montréal – Québec – Canada, H2Y 2E7

ABSTRACT: Alkylphenols and their derivatives, alkylphenol polyethoxylates (APEs), are synthetic chemicals of concern owing to their endocrine properties. Nonylphenol (NP) is a critical APE metabolite because of its recalcitrance to biodegradation, toxicity and ability to bio-accumulate in aquatic organisms. Studies of NP effects in vertebrates demonstrated estrogenic disrupting properties in fish, birds, reptiles and mammal cells in which NP displaces the natural estrogen from its receptor. Less is known on its toxicity toward invertebrates. Effects on reproduction have been reported, but toxicity on development has been poorly documented thus far. We investigated NP toxicity on survival and regeneration of the freshwater coelenterate *Hydra attenuata*. Hydra is known for its regenerative capacity and its sensitivity to chemical pollution. It has been used for over 20 years to screen for teratogenicity of chemicals (Johnson et al., 1982). Our results showed that hydra appeared as one of the most sensitive species to acute and chronic toxicity of NP compared to several freshwater invertebrates. Regeneration was disrupted at NP concentrations lower than those affecting survival. Toxicity thresholds of NP for aquatic vertebrates and invertebrates are also reported and discussed in the context of environmental risk assessment and of water quality objectives recommended for surface waters in industrialized countries. NP levels have decreased during the last decade because of a voluntary agreement of surfactant producers and users. At present, concentrations of NP found in surface waters are far below 1 µg/L in European countries, but can reach several µg/L when wastewater treatment plant inefficiency occurs.

Keywords: Nonylphenol; Toxicity; Cnidarian; Hydra; Freshwater sp.; Risk assessment

¹⁵ Soumis dans Environmental Toxicology

INTRODUCTION

Nonylphenol is a high production volume chemical mainly used in the synthesis of nonylphenol ethoxylates and the production of resin plastics and stabilizers. Alkylphenol polyethoxylates (APnEOs), are non-ionic surfactants used in several industrial applications like pulp and paper production, textile manufacturing, detergents and paints, emulsifiers and dispersing agents of pesticides. Most APnEOs (60%) are released into aquatic systems (Ying et al., 2002). The breakdown of nonylphenol polyethoxylates (NPnEOs) in the environment gives rise to significant quantities of NP and a number of by-products of lower molecular weight after progressive loss of ethoxylate groups (Table I). A reduction of the use of NPnEOs in industrial and domestic detergents has been initiated in the last decade to limit environmental contamination. Therefore the average levels of NPs in surface waters tend to diminish below 1 µg/L in most receiving waters (Kolpin et al., 2002; Ying et al., 2002). Yet, several hundreds µg/L have been recorded close to pollution sources when treatment plants are inefficient or absent.

Nonylphenol is one of the most critical metabolites of NPnEOs due to its high octanol/water partition coefficient ($\log K_{ow} = 4.48$), its high adsorption capacity on organic carbon ($\log K_{oc} = 5.4$), its recalcitrance to biodegrade and its bioaccumulation in aquatic organisms (Staples et al., 1998).

Effects of NP have been documented in numerous *in vitro* and *in vivo* studies. Estrogenic potential has been shown in vertebrates where NP mimics the effects of 17β-estradiol by binding to the estrogen receptor (White et al., 1994). Nonylphenol is widely studied for its estrogenicity in vertebrates, but much less is known concerning its effects on invertebrates (Depledge and Billingham, 1999), in particular on development. In invertebrates, NP has been shown to disrupt reproduction and development. In *Daphnia*, 4-NP reduced fecundity of exposed daphnids at 100 µg/L (Baldwin et al., 1997), and developmental abnormalities were recorded at 10 µg/L (Shurin and Dodson, 1997). 4-NP delayed *Crassostrea gigas* development at 0.1 µg/L and caused deformities at 100 µg/L (Nice et al., 2000).

In the present work, we studied developmental toxicity of NP on the freshwater invertebrate model, *Hydra attenuata*. This hydrozoan has been successfully used to demonstrate the teratogenic potential of chemicals by Johnson et al. (1982). This organism is attractive for several reasons, especially because of its remarkable regenerative capacity by which a body fragment and dissociated cells are able to regenerate a whole organism (Fig. 1).

The gastric column consists of mitotically active multipotent stem cells (Bosch and David, 1984). These undifferentiated cells are absent in head and foot tissues. Hydra has a fast asexual reproduction rate, resulting in large numbers of genetically similar individuals. Hydra is also ubiquitous in clean freshwater environments and easy to culture in the laboratory. Moreover, laboratory experiments are cost effective and simple, as hydra display recognisable physical changes over time in response to different toxicant ranges (Trottier et al., 1997).

Effects of nonylphenol (NP) on *Hydra attenuata* development were assessed by studying regeneration of the gastric section. Developmental toxicity was compared to NP toxicity on adult survival. Toxicity threshold values were determined and results with hydra were compared to those reported with other freshwater vertebrate and invertebrate species. Results are further discussed in the context of environmental risk assessment and of water quality objectives recommended for surface waters in industrialized countries.

METHODS

Culture maintenance, chemical preparation and analyses

Hydra populations were maintained and fed as described previously (Trottier et al., 1997). *Hydra attenuata* cultures were grown in glass dishes of 1.5 L capacity and filled with 0.5 L of hydra medium containing 110 mg/L TES [N-Tris (hydroxymethyl) methyl 1-2-aminoethanesulfonic acid], 147 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg/L EDTA [ethylenediaminetetraacetic acid]. The stock cultures were maintained in incubators at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, under a 16-h light and 8-h dark photoperiod at 800 lux.

Hydra were fed twice per week with freshly-hatched *Artemia salina* nauplii provided in excess. The medium was replaced after 3 h of feeding and hydra were rinsed with fresh medium. Once a week, hydra were transferred into a clean dish. Hydra were sampled within 48 h after feeding and were selected at random from stock cultures. Non-budding and budding cultures were used for acute and chronic assays, respectively. The animals were unfed during the test period.

All chemicals were purchased from Sigma (St Quentin Fallavier, France) and nonylphenol (CAS N°84852-15-3 ; purity $\geq 85\%$) from Fluka (St Quentin Fallavier, France). A saturated solution of nonylphenol in hydra medium was prepared without use of any co-solvent and this solution was diluted with hydra medium for preparation of test solutions. The saturated solution was made by stirring glass microspheres impregnated with the chemical in

the dark for 20 h at 20°C as described in Graff et al. (2003). Briefly, 1 g NP was dissolved in 25 mL acetone and 25 g of 1-mm glass microspheres were impregnated with this NP acetone solution, acetone being eliminated afterwards in an evaporator. The microspheres (10 g) covered with a film of NP were introduced in a small basket immersed into 500 mL of the hydra medium and stirred in the dark during 20 h. The saturated solution was filtered on a paper disk (1.2 µm porosity) and diluted with hydra medium in order to obtain a range of seven to ten different concentrations from 0.1 to 10%. Fresh saturated solutions and corresponding dilutions were prepared before each series of experiments. Five independent series of experiments were carried out with different hydra cultures.

Toxicity on hydra development

Developmental toxicity of NP was assessed on the gastric section of hydra by studying its capacity to regenerate an entire organism. The gastric part composed of undifferentiated cells was isolated from the head and foot differentiated tissues, by dissection of the section above a bud and below the head (Fig. 1b).

Hydra gastric sections were immediately exposed to the test solutions in 20 mL glass vials for 96 h. In order to saturate the glass walls with NP at the concentration tested and to limit chemical adsorption during the test period, an aliquot of the appropriate test solution was added to each vial, left to stand for 15 min, then removed and replaced with the identical test solution. Three gastric sections were placed into each vial and triplicates were carried out for each concentration tested. Gastric sections were observed every 24 h from time zero to 96 h and monitored using a stereomicroscope (X 18). In two experiments, observations were made beyond 96 h, up to 8 d. Test medium composition, temperature and photoperiod used during exposure were similar as those for maintaining hydra cultures.

A score was attributed to each section at each observation time according to the Wilby classification (Table II). Normal hydra development was characterized by the wounding healing of the gastric section (a, b : score 3), then apparition of tentacles and growth of basal disk (c : score 6), followed by mouth (d : score 8) and peduncle formation (e : score 10 ; Fig. 2). Lethality corresponded to scores lying between 6 and 0, based on lack of mouth and Wilby scores (1988).

Scores and lethality in control and exposed organisms were recorded. The lowest NP concentration inducing significant embryo lethality in comparison to controls was determined

in each series of experiment. This concentration was defined as the LOEC (lowest effective concentration inducing a significant toxicity effect compared to controls).

Toxicity on hydra adult survival

In parallel to each experiment on embryo development, a toxicity assay on adult hydra was performed to evaluate NP effects on survival. Adult hydra were exposed in the same conditions as gastric sections using the same NP test solutions in each series of experiments. Hydra were observed at time zero to ensure viability and were monitored using a stereomicroscope (X 18). Hydra react to an environmental stress by contracting their tentacles and body, and display a broad range of morphological changes. These changes were recorded and scored from 10 (normal) to 0 (disintegrated) as described in the detailed key constructed by Wilby (1988). Disintegrating hydra progressively exhibit different morphology stages: clubbed tentacles (score 8), shortened tentacles (score 6), tulip phase (score 5), and disintegration (score 0). Tulip phase and disintegration are recorded as death (Trottier et al., 1997). Lethality corresponds to scores lying between 5 and 0.

Toxicity was expressed by the LOEC which is defined as the lowest effective concentration significantly affecting survival in the exposed animals compared to controls.

Toxicity endpoint determinations and statistical analyses

Scores and lethality were registered over the duration of the different experiments in the exposed and control organisms to express toxicity. LOEC values for embryo and adult survival were determined by modelling the relationship between survival and percentage of the NP tested dilutions. Percentages of lethality registered at the different tested concentrations were compared to controls using the non-parametric Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney test in order to identify the concentrations inducing a significant effect. The Statistica software (version 6.0, Tulsa, USA) was used for calculations.

The ratio of the LOEC values on adult survival (A) to the LOEC values on embryo development (D) was established in each series of experiments. The A/D ratio was used to evaluate the ability of NP to specifically alter development. An A/D ratio > 1 expresses an ability to affect development at a concentration lower than that affecting survival. A higher ratio (> 3) was considered as specifically targeting development (Jonhson et al., 1987).

RESULTS

In the five experiments, gastric sections in control hydra medium developed normally within 96 h with scores 9 and 10 noted for 60% and 40% of gastric sections, respectively. All control embryos reached a score of 10 after 5 days of development. In the NP containing media, embryo lethality was recorded after 96 h of exposure in test media containing at least 1% of the saturated dilutions (Table III).

In adult assays, no change was observed in control hydra that were assigned a score of 10 throughout the experiment. Mean score decreased with an increase of exposure concentrations to NP and time, with morphological changes occurring rapidly.

Lethality in adult hydra was registered at NP concentrations three fold higher than in embryos. The mean value of the A/D ratios obtained from the four independent experiments was 3.1 ± 1.8 (Table III). No developmental abnormalities other than embryo lethality and delayed development were observed following a NP exposure of 96 h.

In experiments 4 and 5 conducted during 8 d, no change in the A/D ratios was registered at the end of the exposure time compared to 96 h (data not shown).

DISCUSSION

Hydra has been already successfully employed to detect the teratogenic potential of numerous chemicals by Johnson et al. (1982) who studied hydra regeneration from dissociated cells. Wilby (1988) recommended the use of gastric sections to study regeneration and a few studies were conducted with this method to assess developmental toxicity of chemicals (Bowden et al., 1995 ; Pascoe et al., 2002). This use of the gastric section method appears to be easier to perform than the technique of dissociated cells.

Johnson et al. (1988) recommended the use of NOEL (no-observed-effect level) values instead of LOELs (lowest-observed-effect level), whenever possible, to establish the A/D ratio. In the present work, we chose to use the lowest effective concentration derived from the model and tested as significant, instead of the observed lowest-effect level, in order to gain accuracy in reporting A/D ratios. The mean A/D ratio of 3 obtained here indicated a higher toxicity of NP on development than on whole organism in hydra.

Our experimental protocol was designed to allow direct comparisons between sensitivity of embryos and adult polyps which were tested with the same NP dilutions in parallel, in every series of experiments. This procedure allowed us to express biological effects with nominal

instead of measured concentrations of the test solutions. Indeed, NP is a “difficult” chemical to work with owing to its high adsorption capacity, which explains the decrease of NP concentrations in solutions with time. We circumvented this inconvenience by renewal of test solutions and use of freshly prepared saturated NP solution with the corresponding dilutions before each series of experiment. In a previous work on hydra NP toxicity (Pachura et al., In press), we measured NP concentrations in the test solutions, and found that LC10-96h values averaged 64 µg/L on adult polyps. In the present study, a ratio of 3 was found between LOEC of embryos and of adults, allowing us to estimate the LOEC-96h on embryo survival to be around 21 µg/L. Comparisons with effects registered on abnormalities induced by NP on *Daphnia*, oyster and freshwater sponges indicate that sensitivity of hydra is intermediate to that of these invertebrates for NP. Deformities in *Daphnia* were seen in 11% of live young grown at 10 µg/L below the NOEC on development of 24 µg/L (Shurin and Dodson, 1997). Long term exposure at NP concentrations of 101 and 200 µg/L induced curved shell spine and underdeveloped antennae, respectively (LeBlanc et al., 2000) and a deformity increase in 10% of neonates was observed at 50 µg/L (Zhang et al., 2003). Abnormalities in the shape of *Crassostrea gigas* larvae were registered at 100 µg/L (Nice et al., 2000). In the freshwater sponges, Hill et al. (2002) determined an abnormal growth with production of a tight cluster of cells exuding from the gemmule, at high concentrations (> 10 mg/L) for *Heteromyenia* sp. and at 2.2 mg/L for *Eunapius fragilis*. Freshwater invertebrates did not appear to be the most sensitive species to NP toxicity in the long term. Indeed, the highest sensitivity was registered by Ward and Boeri (1991) on the marine shrimp *Mysidopsis bahia*, with a 28-day NOEC_{length} value of 3.9 µg/L.

The NP toxicity results on hydra were compared with data reported for aquatic freshwater vertebrates and invertebrates in the literature, in the short (Fig. 3) and the long (Fig. 4) terms. Figure 3 shows a general trend for all species represented, and acute toxicity expressed as LC50 or EC50 values generally ranged between 100 and 1000 µg/L.

Several fish species seem to be quite sensitive to NP toxicity such as *Lepomis macrochirus* and *Pimephales promelas*. LC50-96h and NOEC-96h values were around 135 µg/L and 85 µg/L, respectively, on these two species regarding juvenile survival (Brooke, 1993b).

LC50s for invertebrates were comprised between 21 and 1190 µg/L (Fig. 3). An LC50-96h of 20.7 µg/L was estimated for the amphipod *Hyalella azteca* (Brooke, 1993a). Forget-Leray et al. (2005) reported a LC50-96h of 38 µg/L for nauplii mortality in the copepod *Eurythemora affinis*. Numerous data exist for the crustacean *Daphnia* sp. LC50s-48h values are comprised between 85 and 190 µg/L for *D. magna* (Comber et al., 1993 ; Brooke, 1993a; Hirano et al.,

2004) and determined to be 60.8 µg/L for *D. galeata* (Tanaka and Nakanishi, 2002). The LC50-48h for *D. magna* embryo development was reported to be 281 µg/L and LC50-96h for embryo lethality was 738 µg/L (Zhang et al., 2003).

One of the most sensitive freshwater invertebrate species was the rotifer *Brachionus calyciflorus*. Preston et al. (2000) reported a NOEC-96h of 5 µg/L and a LOEC-96h of 50 µg/L (for fertilization endpoint), while Radix et al. (2002) mentioned reproduction disturbances with a decrease of the total number of females at 370 µg/L. The ovigerous females/non-ovigerous females ratio was enhanced at 127 µg/L (Radix et al. 2002).

In this data set, *H. attenuata* appeared as one of the most sensitive invertebrate species with an LC50-96h of 98 µg/L for adult survival (Pachura et al., In press).

Fewer data are available regarding NP toxicity to freshwater algae and aquatic macrophytes. Growth inhibition was noted in green algae at concentrations from 3 to > 1000 µg/L, the lowest EC50-72h of 3.3 µg/L being registered on biomass of *Scenedesmus subspicatus* (EU-RAR, 2002). Toxicity on the duckweed *Lemna minor* was low and recorded at concentrations above 2 mg/L (Brooke, 1993a).

Endpoints used in long term toxicity studies included conventional mortality, growth, and reproductive effects as well as biomarkers such as vitellogenin production in males (Fig. 4).

In fish, the most sensitive species was *Oncorhynchus mykiss*, with a NOEC-90d of 6 µg/L on adult survival (Brooke, 1993a) and a NOEC-60d of 8 µg/L for mortality in F0 generation (Yokota et al., 2001). Lahnsteiner et al. (2005) determined that 4-NP affected reproduction of *O. mykiss* by decreasing semen quantity in males at the NP concentration of 130 ng/L. As for vitellogenin induction, the LOEC-21d was equal to 20 µg/L for males (Jobling et al., 1996), 100 µg/L for juveniles (Van den Belt, 2003), and LOEC-14d of 16 µg/L for female juvenile rainbow trout (Thorpe et al., 2000).

An induction of vitellogenin expression in *Xiphophorus helleri* after a short term exposure was also reported with a LOEC-72h of 4 µg/L (Kwak et al., 2001) (Fig 3).

Less information exists on invertebrate chronic toxicity (Kahl et al., 1997). In *Eurythemora affinis* (nauplii mortality) a NOEC-10d and a LOEC-10d of 7 and 15 µg/L, respectively, were estimated by Forget-Leray et al. (2005). In *Daphnia*, The NOEC values on reproduction were 76 µg/L after 7d (O'Halloran et al., 1999), 24 µg/L and 77 µg/L after 21 d as reported by Comber et al. (1993) and Brooke (1993a) respectively, and 50 µg/L after 35 d (Zhang et al., 2003). The LOEC-96h observed in *H. attenuata* (21 µg/L) in the present work was one of the

most sensitive developmental results of the data set. In this context, gastric section regeneration seems to be a good predictor of potential chronic toxicity.

Environmental risk assessment of NP was carried out based on acute and chronic toxicity results and exposure levels in the aquatic environment. The U.S Environmental Protection Agency (U.S. EPA, 2003) determined different limit values of toxicity for aquatic organisms. A final acute value (FAV) of 55.71 µg/L was established using the model developed by Stephan et al. (1985), from the acute values of the four most sensitive species. A final chronic value (FCV) of 5.9 µg/L was derived from the FAV using a mean final acute to chronic ratio of 9.4. The mean ratio was the geometric mean of the acute to chronic ratios obtained with *Daphnia magna* (ratio of 3.5), *Oncorhynchus mykiss* (ratio of 28.1) and *Mysidopsis bahia* (ratio of 8.4).

The Canadian water quality criterion for the protection of freshwater life was set at 1 µg/L for NP. Different approaches were used to calculate an estimated no-effect value (ENEV) and values of 0.17, 0.39 or 1 µg/L were obtained by Servos et al. (2003) using a hyperconservative, conservative and distributional assessment, respectively.

In the hyperconservative assessment, a critical toxicity value (CTV) of 17 µg/L was derived from the most sensitive endpoint (LC50-96h in marine Winter flounder) and divided by a factor of 100 to estimate a ENEV of 0.17 µg/L.

In the conservative way, Servos et al. (2003) used a CTV of 3.9 µg/L which corresponded to the NOEC-28d (*Mysidopsis bahia*). The CTV was divided by a factor 10 to obtain a ENEV of 0.39 µg/L.

In the distributional assessment, the ENEV based on an analysis of the distribution of all the acute and chronic data reported in the literature was equal to 1 µg/L. This value was obtained by applying a factor of 10 to the chronic value of 10 µg/L, determined to be the concentration at which 95% of the species would be protected (Servos et al., 2003).

In the European Community, a PNEC (predicted no effect concentration) of 0.33 µg/L was calculated by dividing the lowest chronic NOEC value by a safety factor of 10 ; the lowest NOEC value registered had been obtained from the algae *Scenedesmus subspicatus* (72-hour EC10_{biomass} of 3.3 µg/L).

It should be noted that aquatic concentrations reported in polluted areas in several countries were in the same range or exceeded the different water quality criteria defined above.

Concentrations of NP observed in Europe appeared to be in the same range as those observed in North America. Concentrations are in general less than 1.0 µg/L (close to 0.1 µg/L)

(Kolpin et al., 2004). The exceptions concerned certain rivers receiving NP-containing effluents, in which NP concentrations may exceed this level and reach hundreds µg/L in polluted areas (Berryman et al., 2004). The concentration of nonylphenol in surface water in Europe was evaluated to be 0.60 µg/L on a regional scale (EU-RAR, 2002). Therefore, it appeared that regional concentration of nonylphenol in surface waters (0.6 µg/L) was higher than the PNEC, suggesting that toxic effects to wild life were probable and that risk reduction measures should be applied to decrease NP concentrations in the freshwater environment.

Servos et al. (2003) noted that approximately 40% of the municipal wastewater treatment plants have mean NP concentrations above 1 µg/L and that risk was higher in untreated effluents from the textile and pulp mill effluents, or in areas immediately adjacent to industrial or municipal effluents.

From these results, it can be concluded that NP is released in the aquatic environment at concentrations that have or may have a short or long-term harmful effect on vertebrate and invertebrate species, in particular on their reproduction and development.

Potential effects of suspected endocrine disrupting chemicals on the various invertebrate endocrine systems have not been studied with comparable intensity as in fish. Most studies have focused on teleost fish, whereas invertebrates have received little attention, despite the fact that they constitute 95 % of all living species and play an essential role in the functioning and health of aquatic ecosystems (Segner et al., 2003).

Nonylphenol has been demonstrated to be acutely toxic to different vertebrate and invertebrate freshwater species. Toxic effects of NP to developing embryos and larvae of invertebrates, which are life stages more sensitive to environmental contaminants, were only investigated recently. Hydra appeared as one of the most sensitive freshwater invertebrate species to acute and chronic toxicity of NP. However, toxicity effects occurred at concentrations substantially higher than those normally found in the environment, but representative of polluted sites.

In invertebrates, the evolution of endocrine control systems differed significantly from that of vertebrates and it is not clear whether endocrine disruptors in vertebrates present an equivalent risk in invertebrates (DeFur, 2004). Several investigators have demonstrated that the cnidarian *Hydra* can be useful as an indicator of freshwater pollutants (Pollino and Holdway, 1999 ; Pascoe et al., 2002). Hydra thus seems to be a good animal model to use in studies aimed at understanding and predicting developmental and acute toxicities of emerging chemicals.

REFERENCES

- Baldwin WS, Graham SE, Shea D, LeBlanc G.A. 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environ Toxicol Chem.* 16(9):1905-1911.
- Berking S. 1997. Pattern formation in Hydrozoa. *Naturwissenschaften.* 84:381-388.
- Blackburn MA, Waldock MJ. 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.* 29(7):1623-1629.
- Berryman D, Houde F, DeBlois C, O'Shea M. 2004. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluents: a survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. *Chemosphere.* 56:247-255.
- Bosch TCG, David CN. 1984. Growth regulation in *Hydra*: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Dev Biol.* 104:161-171.
- Bowden HC, Wilby OK, Botham CA, Adam PJ, Ross FW. 1995. Assessment of the toxic and potential teratogenic effects of four glycol ethers and two derivatives using the *Hydra* regeneration assay and rat whole embryo culture. *Toxicol In Vitro.* 9(5):773-781.
- Brooke LT. 1993a. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. EPA 68-C1-0034. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN.
- Brooke LT. 1993b. Accumulation and lethality for two freshwater fishes (Fathead minnow and Bluegill) to nonylphenol. U.S.EPA contract N°68-C1-0034, work assignment N° 1-12, September 30, 1993, Duluth, MN 55804.
- Cardinali M, Maradonna F, Olivetto I, Bortoluzzi G, Mosconi G, Polzonetti-Magni AM, Carnevali O. 2004. Temporary impairment of reproductive in freshwater teleost exposed to nonylphenol. *Reprod Toxicol.* 18:597-604.
- Comber MHI, Williams TD, Stewart KM. 1993. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Res.* 27:273-276.
- DeFur PL. 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing. *Institute for Laboratory Animal Research Journal.* 45(4):484-493.
- Depledge MH, Billingham Z. 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar Pollut Bull.* 39(1-12):32-38.
- EU-RAR. 2002. 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol – European Union Risk Assessment Report. EUR 20387. Institute for Health and Consumer Protection, European chemicals bureau, United Kingdom.
- Forget-Leray J, Landriau I, Minier C, Leboulenger F. 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Pope). *Ecotoxic Environ Saf.* 60:288-294.
- Ghirardini AV, Novelli AA, Likar B, Pojana G, Ghetti PF, Marcomini A. 2001. Sperm cell toxicity test using sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck (echinodermata: echinoidea): sensitivity and discriminatory ability toward anionic and non-ionic surfactants. *Environ Toxicol Chem.* 20(3):644-651.
- Graff L, Isnard P, Cellier P, Bastide J, Cambon JP, Narbonne JF, Budzinski H, Vasseur P. 2003. Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters. *Environ Toxicol Chem.* 22:1368-1379.
- Gray MA, Metcalfe CD. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environ Toxicol Chem.* 16(5):1082-1086.
- .

Hecht S, Boese BL. 2002. Sensitivity of an infaunal amphipod, *Eohaustorius estuaries*, to acute waterborne exposures of 4-nonylphenol: evidence of a toxic hangover. *Environ Toxicol Chem.* 21(4):816-819.

Hill M, Stabile C, Steffen LK, Hill A. 2002. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. *Environ Pollut.* 117:295-300.

Hirano M, Ishibashi H, Matsumura N, Nagao Y, Watanabe N, Watanabe A, Onikura N, Kishi K, Arizono K. 2004. Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *J Health Sci.* 50(1):97-100.

Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem.* 15(2):194-202.

Johnson EM, Gorman RM, Gabel BEG, George ME. 1982. The *Hydra attenuata* system for detection of teratogenic hazards. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2:263-276.

Johnson EM, Christian MS, Dansky L, Gabel BEG. 1987. Use of the adult developmental relationship in prescreening for developmental hazards. *Teratog Carcinog Mutagen.* 7:273-285.

Johnson EM, Newman LM, Gabel BEG, Boerner TF, Dansky LA. 1988. An analysis of the Hydra assay's applicability and reliability as a developmental toxicity prescreen. *J Am Coll Toxicol.* 7(2):111-126.

Kahl MD, Makynen EA, Kosian PA, Ankley GT. 1997. Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxic Environ Saf.* 38:155-160.

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol.* 36:1202-1211.

Kolpin DW, Skopec M, Meyer MT, Furlong ET, Zaugg SD. 2004. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci Total Environ.* 328:119-130.

Kwak H-I, Bae M-O, Lee M-H, Lee Y-S, Lee B-J, Kang K-S, Chae C-H, Sung H-J, Shin J-S, Kim J-H, Mar W-C. 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ Toxicol Chem.* 20(4):787-795.

Lahnsteiner F, Berger B, Grubinger F, Weismann T. 2005. The effects of 4-nonylphenol on semen quality, viability of gametes, fertilization success, and embryo and larvae survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol.* 71:297-306.

LeBlanc GA, Mu X, Rider CV. 2000. Embryotoxicity of alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environ Health Perspect.* 108:1133-1138.

Li MH, Wang ZR. 2005. Effect of nonylphenol on plasma vitellogenin of male adult guppies (*Poecilia reticulata*). *Environ Toxicol.* 20:53-59.

Liber K, Gangl JA, Corry TD, Heinis LJ, Stay FS. 1999. Lethality and bioaccumulation of 4-nonylphenol in bluegill sunfish in littoral enclosures. *Environ Toxicol Chem.* 18(3):394-400.

Matozzo V, Deppieri M, Moschino V, Marin MG. 2003. Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environ Res.* 91:179-185.

Milam CD, Farris JL, Dwyer FJ, Hardesty DK. 2005. Acute toxicity of six freshwater mussel species (glochidia) to six chemicals: implications for Daphnids and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (unionidae). *Arch Environ Contam Toxicol.* 48:166-173.

Nice HE, Thorndyke MC, Morritt D, Steele S, Crane M. 2000. Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. *Mar Pollut Bull.* 40(6):491-496.

O'Halloran S, Liber K, Gangl JA, Knuth ML. 1999. Effects of repeated exposure to 4-nonylphenol on the zooplankton community in littoral enclosures. *Environ Toxicol Chem.* 18(3):376-385.

Pachura S, Cambon J-P, Blaise C, Vasseur P. 2005. 4-Nonylphenol induced toxicity and apoptosis in *Hydra attenuata*. *Environ Toxicol Chem.* 24(12): in Press.

Pascoe D, Carroll K, Karntanut W, Watts MM. 2002. Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. *Arch Environ Contam Toxicol.* 43:56-63.

Pollino CA, Holdway DA. 1999. Potential of two *Hydra* species as standard toxicity test animals. *Ecotoxic Environ Saf.* 43:309-316.

Preston BL, Snell TW, Robertson TL, Dingmann BJ. 2000. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors. *Environ Toxicol Chem.* 19(12):2923-2928.

Radix P, Severin G, Schramm KW, Kettrup A. 2002. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disruptors. *Chemosphere.* 47:1097-1101.

Schmude KL, Liber K, Corry TD, Stay FS. 1999. Effects of 4-nonylphenol on benthic macroinvertebrates and insect emergence in littoral enclosures. *Environ Toxicol Chem.* 18(3):386-393.

Segner H, Carroll K, Fenske M, Janssen CR, Maack G, Pascoe D, Schäfers C, Vandenberg GF, Watts M, Wenzel A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxic Environ Saf.* 54(3):302-314.

Servos MR, Maguire RJ, Bennie DT, Lee HB, Cureton PM, Davidson N, Sutcliffe R, Rawn DFK. 2003. An ecological risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in the aquatic environment. *Hum Ecol Risk Assess.* 9:569-587.

Shurin JB, Dodson SI. 1997. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*. *Environ Toxicol Chem.* 16(6):1269-1276.

Staples CA, Weeks J, Hall JF, Naylo CG. 1998. Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates. *Environ Toxicol Chem.* 17(12): 2470-2480.

Stephan CE, Mount DI, Hansen DJ, Gentile JH, Chapman GA, Brungs WA. 1985. Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. PB85-227049. National Technical Information Service, Springfield, VA.

Tanaka Y, Nakanishi J. 2002. Chronic effects of *p*-nonylphenol on survival and reproduction of *Daphnia galeata*: multigenerational life table experiment. *Environ Toxicol.* 17:487-492.

Thorpe KL, Hutchinson TH, Hetheridge MJ, Sumpter JP, Tyler CR. 2000. Development of an in vivo screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem.* 19(11):2812-2820.

Trottier S, Blaise C, Kusui T, Johnson EM. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environ Toxicol Water Qual.* 12(3):265-271.

US-EPA. 2003. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol – Draft. EPA 822-R-03-029. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

Van den Belt K, Verheyen R, Witters H. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxic Environ Saf.* 56:271-281.

Van den Belt K, Berckmans P, Vangenechten C, Verheyen R, Witters H. 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat Toxicol.* 66:183-195.

Ward TJ, Boeri RL. 1991. Chronic toxicity of nonylphenol to the mysid (*Mysidopsis bahia*). Study No. 8977-CMA. Prepared for the Chemical Manufacturers Association by Resource Analysts, Hampton, NH, USA.

Wilby OK. The Hydra regeneration assay. Proceedings of workshop organised by Association Française de Teratologie, Royaumont, France, June, 3, 1988, pp 108-124.

White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology.* 135(1):175-182.

Ying G.-G., Williams B., Kookana R., 2002, Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. *Environ Int.* 28:215-226.

Yokota H., Seki M., Maeda M., Oshima Y., Tadokoro H., Honjo T., Kobayashi K., 2001, Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem.* 20(11):2552-2560.

Zhang L., Gible R., Baer K.N., 2003, The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxic Environ Saf.* 55:330-337.

Table I. Structures, names and abbreviations of the most important metabolites of alkylphenol polyethoxylates (APnEOs), composed principally by nonylphenol (NPnEOs) and octylphenol polyethoxylates (OPnEOs). n = number of ethoxy groups in the hydrophilic chain; m = number of ethoxy groups in the chain plus one acetate; R is usually branched nonyl or octyl.

	$\text{R} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} (\text{OCH}_2\text{---CH}_2)_n \text{---} \text{OH}$ Alkylphenol polyethoxylates APNEOS n = 6 - 100	R = C₉H₁₉ Nonylphenol polyethoxylates NPNEOS	R = C₈H₁₇ Octylphenol polyethoxylates OPNEOS
n=2	$\text{R} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---OH}$ Alkylphenol diethoxylate AP2EO	Nonylphenol diethoxylate NP2EO	Octylphenol diethoxylate OP2EO
n=1	$\text{R} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---OH}$ Alkylphenol monoethoxylate APIEO	Nonylphenol monoethoxylate NP1EO	Octylphenol monoethoxylate OP1EO
	$\text{R} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{OH}$ Alkylphenols APS	Nonylphenols NPS	Octylphenols OPS
m=2	$\text{R} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C---OH}$ O $\parallel$ Alkylphenol di-ethoxy carboxylic acid AP2EC	Nonylphenol di-ethoxy carboxylic acid NP2EC	Octylphenol di-ethoxy carboxylic acid OP2EC
m=1	$\text{R} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O---CH}_2\text{---CH}_2\text{---C---OH}$ O $\parallel$ Alkylphenol mono-ethoxy carboxylic acid APIEC	Nonylphenol mono-ethoxy carboxylic acid NP1EC	Octylphenol mono-ethoxy carboxylic acid OP1EC
	$\text{R} \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} (\text{OCH}_2\text{---CH}_2)_m \text{---C---OH}$ O $\parallel$ Alkylphenol polyethoxy carboxylic acids APMECS	Nonylphenol polyethoxy carboxylic acids NPMECS	Octylphenol polyethoxy carboxylic acids OPMECS

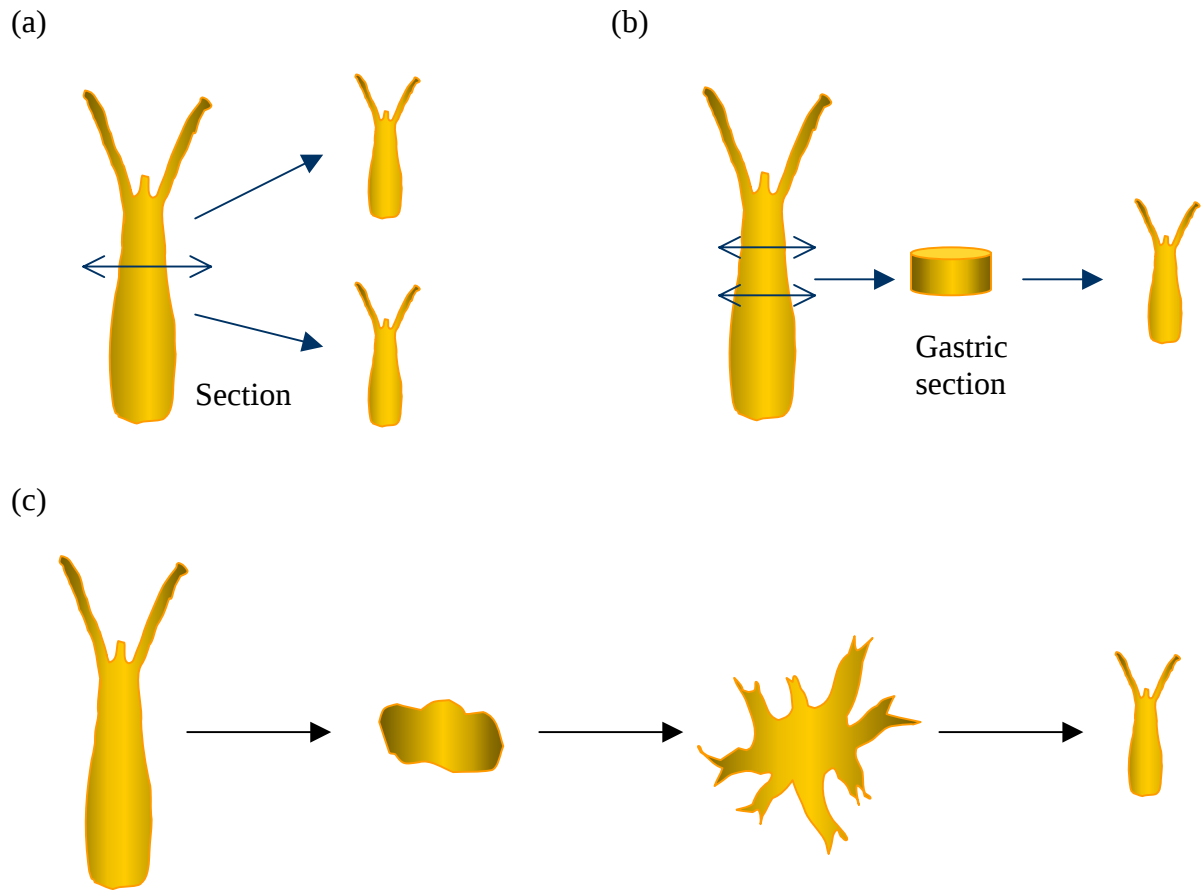
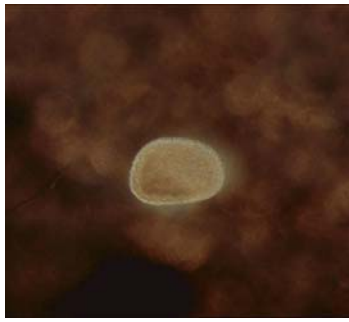


Fig. 1. Regeneration capacities of *Hydra attenuata*. Body sections regenerate in well-proportioned animals : when hydra is cut in half, both parts regenerate the appropriate patterned elements (a), a gastric section forms a new whole adult (b). An animal dissociated in reaggregated cells (pellet) can regenerate in one or several polyps, based on cell number (c; reviewed in Berking, 1997).

Table II : Key for assessing progressive toxic effects in regenerating gastric sections (from Wilby, 1988).

Score	Morphological status of polyp
10	Mouth, 4-6 tentacles, peduncle
9	Mouth, 4-6 tentacles
8	Mouth, <4 tentacles, basal disk
7	Mouth, <4 tentacles
6	Tentacle buds and basal disk
5	Tentacle buds only
4	Basal disk only
3	Normal wounding healing
2	Healed but expanded
1	Open ends, not healed or dead
0	Disintegrated



a : 0 h

Normal wounding healing (3)



b : 24 h



c : 48 h

Tentacle buds, basal disk (6)



d : 72 h

Mouth, < 4 tentacles, basal disk (8)



e : 96 h

Mouth, 4-6 tentacles, peduncle (10)

Fig. 2. Morphology of hydra embryo during normal regeneration from gastric section (a ; score 3) to normal hydra with mouth, 4 to 6 tentacles and peduncle (e ; score 10), through intermediary steps with tentacle buds (c ; score 6) and mouth , 4 tentacles or less, basal disk (d ; score 8).

Table III. LOEC values (lowest effective concentrations) significantly reducing survival in exposed animals compared to controls after 96 h of exposure and A/D ratios of the LOEC values on adult lethality (A) and embryo development (D) for each series of experiments. LOECs are expressed as percent of saturated solution in the test medium.

LOEC-96h survival (% saturated solution)			
Experiment	Adult (A)	Embryo (D)	Ratio A/D
1	5	1	5
2	2	1	2
3	5	1	5
4	5	4	1.25
5	6	3	2
Mean			3.1 ± 1.8

Fig. 3. Nonylphenol long term toxicity on freshwater vertebrates and invertebrates for mortality (□), reproduction (○), vitellogenin production (v) and development (◇) endpoints. Open and filled symbols represent results on adults and juveniles, respectively. Endpoints are expressed as measured concentration (when nominal, endpoints are noted in *italic*).

	Species	Toxicity endpoint	Concentration (µg/L)				References
			0	10	100	1000	
VERTEBRATES	<i>Lepomis macrochirus</i>	NOEC-96h			■		Brooke, 1993a
		LOEC-96h				■	
		LC50-96h			■		
		LC50-96h			□		
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	LC50-96h				□	Brooke, 1993b
	<i>Pimephales promelas</i>	NOEC-96h			■		
		LOEC-96h				■	
		LC50-96h			■		
		LC50-96h			■		
	<i>Xiphophorus helleri</i>	LOEC-72h	v				Brooke, 1993a
INVERTEBRATES		LC50-96h			□		Kwak et al., 2001
	<i>Physella virgata</i>	LC50-96h				□	Brooke, 1993a
		EC50-96h				□	
	<i>Tapes philippinarum</i>	NOEC-96h			□		Matozzo et al., 2003
		LC50-96h				>□	
	<i>Leptodea fragilis</i>	NOEC-24h			□		Milam et al., 2005
		LC50-24h				□	
	<i>Lampsilis cardium</i>	NOEC-24h			□		
		LC50-24h				>□	
	<i>Lampsilis siliquoidea</i>	NOEC-24h				□	
		LC50-24h				□	
	<i>Megalonyx nervosa</i>	NOEC-24h			□		
		LC50-24h				□	
	<i>Ligumia subrostrata</i>	NOEC-24h				□	
		LC50-24h			□		
	<i>Utterbackia imbecillis</i>	NOEC-24h				□	
		LC50-24h				□	
	<i>Paracentrotus lividus</i>	EC50-1h			●		Ghirardini et al., 2001
	<i>Ceriodaphnia</i> sp.	NOEC-24h			□		Milam et al., 2005
		LC50-24h				□	
	<i>Daphnia magna</i>	NOEC-24h				□	Comber et al., 1993
		EC50-24h				□	
		LC50-24h			□		
		EC50-48h			□		Milam et al., 2005
		EC50-48h			□		
		LC50-48h			□		Comber et al., 1993
		EC50-48h			□		
		EC50-96h				■	Brooke, 1993a
		EC50-96h			◆		
	<i>Daphnia galeata</i>	LC50-48h			□		Hirano et al., 2004
PLANTS	<i>Brachionus calyciflorus</i>	EC50-72h				○	Zhang et al., 2003
		NOEC-96h	○				Tanaka and Nakanishi, 2002
		LOEC-96h		○			
	<i>Hyalella azteca</i>	LC50-96h		■			Radix et al., 2002
	<i>Eurytemora affinis</i>	LC50-96h		■			
	<i>Eohaustorius estuarius</i>	LC50-96h				□	Preston et al., 2000
	<i>Hydra attenuata</i>	LC50-96h			□		
		LC10-96h			□		Brooke, 1993a
		LOEC-96h		◆			
	<i>Ophiogomphus</i> sp.	EC50-96h				■	Forget-Leray et al., 2005
	<i>Lumbricus variegatus</i>	LC50-96h				□	
		EC50-96h				□	Hecht and Boese, 2002
	<i>Lemna minor</i>	NOEC-96h				□	
		LOEC-96h				>□	Pachura et al., In press
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	EC50-72h				◇	
	<i>Selenastrum capricornutum</i>	NOEC-96h				□	Brooke, 1993a
		LOEC-96h				>□	
	<i>Lemna minor</i>	EC50-96h			□		EU-RAR, 2002
		NOEC-96h				□	
		LOEC-96h				>□	Brooke, 1993a
	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	EC10-72h	□				
		EC50-72h		□			EU-RAR, 2002

Fig. 4. Nonylphenol long term toxicity on freshwater vertebrates and invertebrates for mortality (□), reproduction (○), vitellogenin production (v) and development (◇) endpoints. Open and filled symbols represent results on adults and juveniles, respectively. Endpoints are expressed as measured concentration (when nominal, endpoints are noted in *italic*).

	Species	Toxicity endpoint	Concentration (µg/L)				References
			0	10	100	1000	
VERTEBRATES	<i>Lepomis macrochirus</i>	NOEC-20d			○		Liber et al., 1999
		LOEC-20d				■	
		NOEC-28d			■		Brooke, 1993a
		LOEC-28d			■		
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>LOEC-60d</i>	○				Lahnsteiner et al., 2005
		NOEC-14d	v				Thorpe et al., 2000
		LOEC-14d		v			
		EC50-14d		v			
		LOEC-21d		v			Jobling et al., 1996
		<i>LOEC-21d</i>			v		Van den Belt, 2003
		NOEC-90d	□				Brooke, 1993a
	<i>Pimephales promelas</i>	LOEC-90d		□			
		NOEC-28d			■		
		LOEC-28d				■	
		LOEC-28d				□	Brooke, 1993b
	<i>Japanese medaka</i>	NOEC-60d		□			Yokota et al., 2001
		LOEC-60d		□			
		<i>LOAEC-90d</i>			◇		Gray and Metcalfe, 1997
	<i>Danio rerio</i>	<i>LOEC-21d</i>				○	Van den Belt, 2003
		EC10-21d				○	Van den Belt, 2004
		EC50-21d				○	
	<i>Poecilia reticulata</i>	<i>LOEC-21d</i>		□			Li and Wang, 2005
		<i>NOEC-90d</i>			□		Cardinali et al., 2004
INVERTEBRATES	<i>Ceriodaphnia sp.</i>	NOEC-7d			○		O'Halloran et al., 1999
		LOEC-7d				○	
		NOEC-43d		□			
		LOEC-43d			□		
	<i>Daphnia magna</i>	LC50-7d				□	Comber et al., 1993
		LC50-14d				□	
		NOEC-21d		○			
		LOEC-21d		○			Brooke, 1993a
		NOEC-21d			○		
		LOEC-21d				○	
		NOEC-21d				□	
		LOEC-21d				□	
		<i>NOEC-21d</i>				□	Baldwin et al., 1997
		<i>LOEC-21d</i>				○	
		<i>LOEC-21d</i>				○	LeBlanc et al., 2000
		LC50-21d			□		Comber et al., 1993
	<i>Daphnia galeata</i>	<i>NOEC-30d</i>		◇			Shurin and Dobson, 1997
		LOEC-35d			◆		Zhang et al., 2003
		<i>NOEC-21d</i>		□			Tanaka and Nakanishi, 2002
	<i>Eurytemora affinis</i>	<i>NOEC-21d</i>			○		
		<i>NOEC-10d</i>	■				Forget-Leray et al., 2005
	<i>Chironomus tentans</i>	<i>LOEC-10d</i>		■			
		NOEC-20d		□			Kahl et al., 1997
	<i>Tanytarsini sp.</i>	LOEC-20d				□	
		NOEC-53d			□		Schrude et al., 1999
	<i>Naididae sp.</i>	LOEC-53d				□	
		NOEC-75d		□			
		LOEC-75d			□		

II.C. - LE NONYLPHÉNOL INDUIT DES MALFORMATIONS SUR LE DÉVELOPPEMENT DES CNIDAIRES *HYDRA ATTENUATA*.

La toxicité du NP sur la survie d'*H. attenuata* a été démontrée dans des tests de toxicité à court terme (96h). Les études préliminaires ont montré un effet chez les adultes et les embryons, avec une toxicité pour la survie chez l'adulte (CL50-96h) aux alentours de 100 µg/L, une LOEC-96h pour les embryons proche de 20 µg/L et un ratio A/D supérieur à 3.

Dans cette partie, nous avons étudié les effets du NP sur l'hydre en développement au delà de 96h d'exposition. Les concentrations en NP n'ayant pu être encore déterminées (étude en cours), les résultats sont exprimés en fonction du pourcentage de solution saturée en NP. Les concentrations nominales sont déduites des mesures faites sur des solutions saturées en NP diluées à 10%. La moyenne des mesures des solutions saturées à 10% (d'après nos études antérieures) correspondrait à une concentration de l'ordre de 130 µg/L. Les concentrations nominales sont données à titre indicatif, celles-ci seront mesurées dans des essais ultérieurs.

Des hydres adultes et des embryons ont été exposés durant 8j à différentes concentrations de NP (environ 0,1 à 7,5 % soit une estimation de 1,3 à 98 µg/L pour les gammes définitives). Les hydres sont alors observées toutes les 24h. L'hydre adulte réagit aux stress environnementaux en exhibant différentes morphologies, tandis que l'embryon va ralentir son développement, l'inhiber ou alors présenter des malformations morphologiques plus particulièrement au niveau des tentacules (Fig.19).

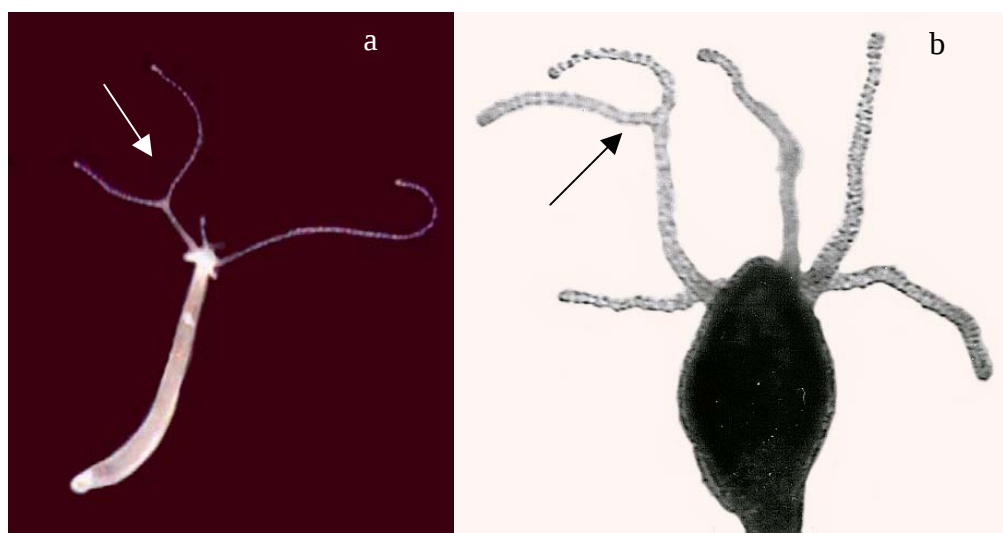


Figure 19. Échantillon représentatif de tronçons gastriques en développement exhibant des tentacules anormales (tentacules bifides; flèches) observées après 96h (a) et 8j (b) d'exposition à 1% de solution saturée en nonylphénol.

Des anomalies s'observent à partir de 6j d'exposition pour de très faibles concentrations. En effet, 20% des hydres exposées à 0,1% de solution saturée en NP montrent des tentacules bifides, ce qui correspondrait à une concentration de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ (sous les réserves mentionnées plus haut). 13% des individus exposés montrent cette anomalie à 1 et 3% de solution saturée, et près de 7% pour une exposition à 4% de solution saturée. Au niveau des plus fortes concentrations ($> 4\%$), des anomalies tentaculaires ne sont pas visibles pour la simple raison que les embryons ont des morphologies correspondant aux scores 6 à 2 (effets graves pour des scores ≤ 5). Ce qui signifie que les tentacules sont peu ou pas développées.

Les résultats des tests de toxicité chronique du NP montrent que la valeur de CL50-8j est proche de 5% (soit 66 $\mu\text{g/L}$) pour les adultes et de 6% (soit 79 $\mu\text{g/L}$) pour les embryons.

Dans tous les cas, ces changements s'opèrent dans les 24h, au-delà la morphologie varie peu (Fig. 20). De légères variations morphologiques (score moyen de 8,7) s'observent pour la plus faible concentration testée chez les adultes (0,1%), ce qui nous permettrait d'évaluer la LOEC-8j à 0,1% (soit 1,3 $\mu\text{g/L}$), mais pas de déterminer une NOEC puisque la concentration la plus basse testée était de 0,1%. Chez les embryons, les changements morphologiques significatifs s'observent pour une concentration de 1% (score moyen de 8,9), ce qui nous permettrait d'évaluer la LOEC-8j à 1% et une NOEC-8j à 0,1%.

En ce qui concerne la régénération des embryons, celle-ci n'est réellement amorcée qu'au deuxième jour. Le développement est complet chez les témoins au sixième jour, les changements morphologiques pour les embryons intoxiqués sont mineurs au-delà. Cette constatation remet en cause la durée d'exposition initiale de 96h et étaye l'hypothèse qu'un temps d'exposition ou d'examen des embryons plus long est nécessaire.

Il s'avère donc que le ratio A/D des LOEC pour cet essai est de 0,1, résultat nettement inférieur à celui exprimé pour un essai aiguë 96h de 3,1.

Une expérimentation supplémentaire d'exposition au NP a été réalisée. Les hydres adultes et les embryons ont été exposés en parallèle à une gamme de concentrations de 0,05 à 7,5% de solution saturée. Les hydres ont été nourries et le milieu d'intoxication renouvelé, après 5j d'exposition. Cet essai nous a permis de constater que les embryons montrant des tentacules bifides étaient capables de se nourrir.

Un dénombrement des hydrantes¹⁶ à la fin des 10j d'exposition montre que le bourgeonnement est significativement affecté chez les adultes et chez les embryons ($p < 0,05$) pour une exposition à une concentration élevée de 7,5% (Fig.21).

Bien que les concentrations n'aient été mesurées, la toxicité estimée semble proche des concentrations représentatives des sites peu pollués. En effet, la concentration environnementale générale des eaux douces de surface est proche du $\mu\text{g/L}$. Ceci laisse présager d'un impact du NP sur le développement des hydres dans le milieu naturel. Au vue des très faibles concentrations estimées, des études supplémentaires sont nécessaires afin de conclure sur ce point.

Ces résultats soulignent la toxicité du NP sur la survie d'*H. attenuata* et sur son développement et les malformations engendrées après une exposition de 8j. Les expérimentations ont été répétées trois fois et ont montré une bonne reproductibilité des effets chez l'embryon. L'exposition des embryons sur le long terme nous a permis de mettre en évidence des malformations, laissant apparaître une tératogénicité du produit. Il ne semble pas que ces malformations aient une influence sur la prise alimentaire et sur la dynamique de croissance des populations d'hydres sur 10j. Enfin, cette étude met l'accent sur l'intérêt de poursuivre les investigations au delà de 96h d'exposition. Une des perspectives de ce travail sera l'étude sur le long terme du NP et des substances qui avaient été étudiées sur 96h dans les essais de criblage de toxicité, au début de notre recherche (partie I, page 60).

¹⁶ Tête de l'hydre (tentacules + hypostome). Les bourgeons ayant déjà formé une tête sont comptabilisés.

PARTIE III – Étude de l'apoptose chez l'hydre

III.A. - NIVEAU BASAL D'APOPTOSE CHEZ L'HYDRE ET INFLUENCE DU JEÛNE.

Afin de pouvoir analyser l'induction du NP chez les hydres adultes, une étude du mécanisme a été nécessaire chez les hydres témoins.

Une première étude du niveau basal a été effectuée sur 5 hydres adultes sans bourgeon à 1, 2, 3, 4 et 5j de jeûne (Fig.22). Les résultats indiquent bien que le processus apoptotique est important chez des hydres dont l'activité métabolique est intense comme dans les 24h à 48h qui suivent la prise de nourriture (Bosch & David, 1984). La figure 22 montre clairement que le profil apoptotique (fragmentation de l'ADN) diminue avec l'augmentation du nombre de jours de jeûne. Une fragmentation de l'ADN est importante jusqu'à 2j après la prise de nourriture. Au-delà, soit 3, 4 et 5j de jeûne, aucune fragmentation n'est visible.

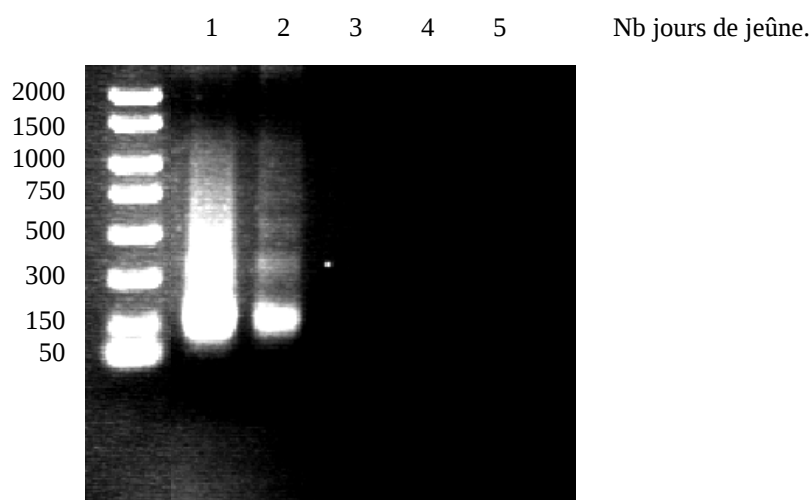


Figure 22. Évolution de la fragmentation d'ADN au cours du temps, en fonction du nombre de jours de jeûne.

Cette expérience a été répétée sur 5 hydres pour 1 et 5j de jeûne, et ceci en triplicat (Fig.23). Ainsi, l'étude de la fragmentation de l'ADN chez des hydres venant juste d'être nourries (1j de jeûne) montre un profil apoptotique (Fig.23). La fragmentation de l'ADN n'est plus visible pour des hydres à jeun durant 5j.

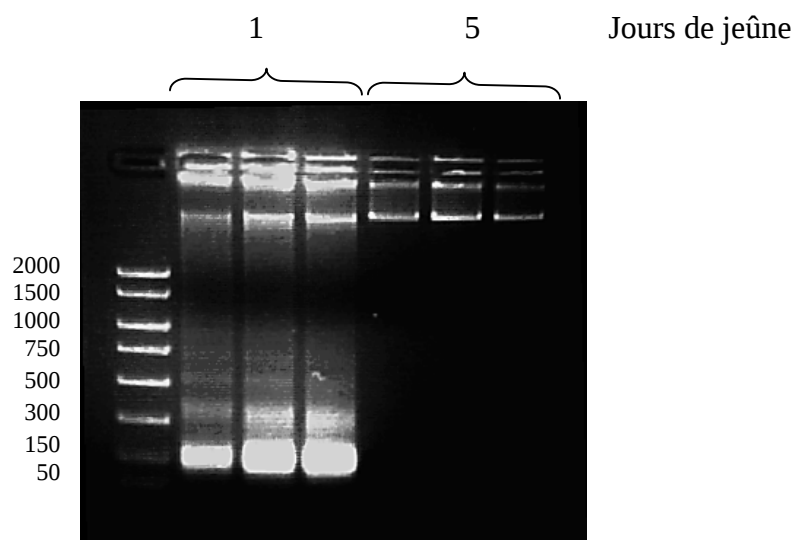


Figure 23. Évolution de l'apoptose en fonction du nombre de jours de jeûne. Fragmentation de l'ADN chez des hydres à jeun 1j et absence d'apoptose après 5j de jeûne.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence un niveau basal d'apoptose chez des hydres dont le métabolisme est activé par la nourriture. Ce résultat est en accord avec les travaux de Bosch & David (1984), qui montrent qu'une hydre bien nourrie va produire plus de cellules au niveau de sa colonne gastrique. Ces cellules servent pour la régénération du pied mère mais également pour la formation du bourgeon. Comme le nombre de cellules total reste constant, l'excédant de cellules produites est éliminé par apoptose et phagocytose au niveau de la tête et du pied. En période de jeûne, la production de cellules diminue, l'hydre n'a donc plus intérêt à éliminer ces cellules : l'apoptose est stoppée.

C'est pourquoi dans l'étude de l'induction d'apoptose par le NP, nous avons choisi de travailler avec des hydres à jeun 5j.

III.B. - EXPRESSION DES CASPASES-3 CHEZ L'HYDRE.

Les études précédentes ont démontré que le NP était fortement toxique pour les hydres adultes et pour le développement des tronçons gastriques, qu'il induisait des malformations au niveau des tentacules des embryons en développement, et qu'une exposition courte à des concentrations létales (LC50 et LC100) provoquait une fragmentation apoptotique de l'ADN. Une hypothèse serait que l'apoptose est également impliquée dans l'apparition des tentacules bifides.

Nous avons voulu savoir si le phénomène apoptotique impliquait la participation des caspases-3, car ces molécules effectrices possèdent un rôle important dans le phénomène d'apoptose et d'autre part car deux d'entre elles (caspase-3A et -3B) ont été identifiées chez *H. vulgaris* par Cikala et al. (1999). Ainsi, il serait intéressant de vérifier l'expression et l'activité des caspases-3 après exposition au NP.

Dans un premier temps, nous avons voulu étudier l'expression des caspases-3A et -3B chez l'hydre en dehors de tout traitement et en fonction de leur état physiologique (jeûne). Les produits PCR ont été envoyés à séquencer pour nous assurer que les résultats obtenus correspondent aux deux caspases recherchées.

La caspase3-A a été séquencée et le résultat correspond pour 93% à la séquence attendue. La caspase3-B a été séquencée avec 92% d'homologie avec la séquence attendue (Table 22). Ceci nous permet de conclure que les produits obtenus correspondent bien aux deux caspases.

Nous avons donc étudié l'expression de ces caspases par la technique de RT-PCR. En premier lieu nous avons cherché à connaître le niveau basal d'expression des caspases chez des hydres adultes et des tronçons gastriques pour 1, 2, 3 et 4j de jeûne (Fig.24).

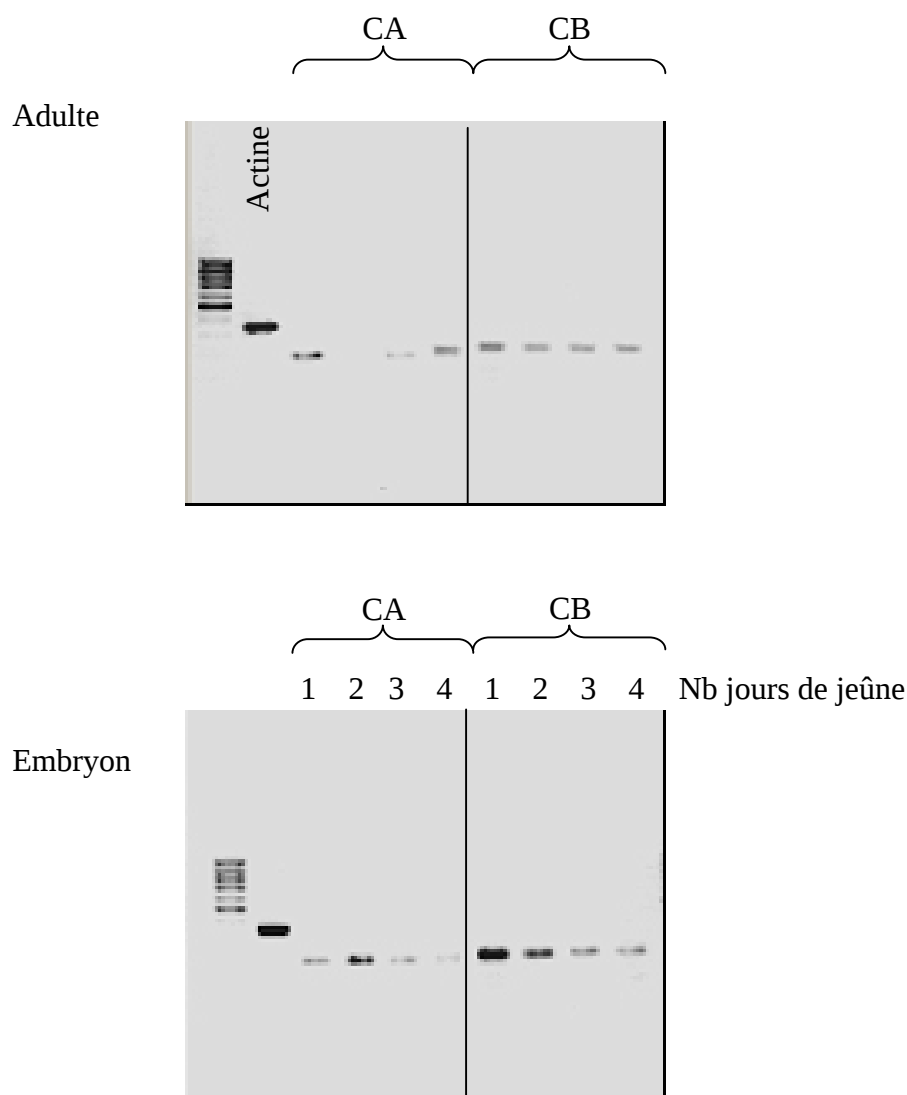


Figure 24. Analyse de l'expression des caspases-3 chez des hydres adultes et embryons témoins à 1, 2, 3, et 4j de jeûne. CA = Caspase-3A ; CB = Caspase-3B.

La figure 24 démontre que l'expression des caspases-3A et -3B est présente chez l'adulte et l'embryon, avec une diminution de l'expression en fonction du nombre de jours de jeûne. Ceci est corroboré avec l'étude de Cikala et al. (1999) qui démontrent un niveau basal d'expression des caspases chez les hydres témoins. Cependant l'absence de co-amplification avec l'actine, gène exprimé de manière constitutive et servant de contrôle interne, ne permet pas de conclure quant à cette diminution de l'expression des caspases.

Dans un deuxième temps, nous avons exposé des hydres adultes sans bourgeon et à jeun 5j, 5h aux concentrations létales induisant l'apoptose (CL50 et CL100), mais également à une concentration de 250 mg/L (5h) de colchicine utilisée ici comme témoin positif de l'induction d'apoptose. Les résultats obtenus ne peuvent toutefois être interprétés. En effet, les différentes expérimentations menées ont montré que le niveau d'expression des caspases-3 est identique chez les témoins positifs (colchicine) et négatifs. Les résultats préliminaires n'ont pas montré de modification du niveau d'expression des caspases chez les hydres traitées au NP. Mais les essais méritent d'être répétés.

Les conditions expérimentales doivent être étudiées afin d'augmenter l'intensité du signal d'expression des caspases, lorsque celle-ci est co-amplifiée avec l'actine. Les résultats préliminaires montrent un signal et la présence d'une bande chez les hydres quel que soit leur état métabolique. Il ne semble pas que le NP active l'expression des caspases. Mais les résultats restent à vérifier.

Dans la suite, nous envisageons d'étudier l'activité des caspases-3 en relation avec les effets du NP et de la colchicine. Une méthode de mesure fluorimétrique des produits de clivage des caspases pourrait être mise en œuvre (selon Cikala et al. (1999)). En effet, deux substrats fluorescents (Ac-DEVD-AMC et Ac-YVAD-AMC) sont spécifiquement clivés par les caspases-3. La fluorescence de l'AMC peut alors être facilement mesurée et corrélée à l'activité de clivage des caspases.

DISCUSSION

DISCUSSION

Ce travail consistait à établir, dans un premier temps, le degré de sensibilité de l'hydre adulte mais surtout des tronçons gastriques (TG) vis-à-vis de diverses catégories de substances. Cette première étape a souligné la forte toxicité du NP dont le modèle hydre nous a servi par la suite à étudier les mécanismes d'actions.

Ces résultats mettent en évidence :

- les substances testées ayant un effet délétère sur le développement ($A/D > 1$) :
thalidomide (50), fluoxétine (6,11), SDS (5,8), diflubenzuron ($>5,3$), sulfaméthoxazole (5,24), propranolol (5,11), NP (3,1), carbamazépine (3), ibuprofène (2,44), azetidine-2-carboxylique (2,2), colchicine (1,83), TBTO (1,7), parathion (1,5), TGDME (1,3), DP (1,23), éthanol (1,2), méthoprène (1,1).
- les substances testées ayant une forte toxicité ($CL_{50} < 1 \text{ mg/L}$) :
TBTO, NP, acides rétinoïques, cuivre, cycloheximide, triclosan.
- l'induction très rapide de l'apoptose chez l'hydre adulte par le NP pour des concentrations létales (CL_{50} et CL_{100}) et sur de très courtes périodes d'exposition (1 et 5h).
- des malformations au niveau des tentacules chez des embryons d'hydre en régénération, après 8j de développement à des concentrations environnementales en NP.
- l'utilité de prolonger les essais de toxicité notamment pour l'étude de la régénération et de ses anomalies au-delà de 96h.

Trois grands points vont être discutés :

- sensibilité de l'hydre, adulte et embryon, vis-à-vis des substances chimiques ;
- toxicité et effets du NP sur le modèle hydre ;
- apoptose chez l'hydre et implication des caspases-3.

I - Sensibilité des hydres adultes et des tronçons gastriques.

Dans les essais de toxicité de routine, il n'existe aucune exigence en ce qui concerne l'étude des effets sur le développement, ce qui est une lacune dans une perspective de protection environnementale.

Dans cet objectif, l'hydre pourrait être un outil de criblage des substances toxiques sur le développement. L'hydre a déjà été employée avec succès pour démontrer le potentiel toxique de diverses substances sur des adultes, mais surtout sur des embryons développés par Johnson et al. (1982) à partir d'amas de cellules. Avec cet essai, il est possible d'examiner rapidement un large spectre de molécules, dont les résultats obtenus chez l'adulte et les amas cellulaires semblent, pour Johnson, être le reflet de ce qui se passe chez les mammifères.

La section gastrique a été préférée à l'amas cellulaire car elle possède toutes les caractéristiques d'un blastema et le rendement de régénération est acceptable. Wilby (1988) recommande l'utilisation de ce type d'embryon dans l'étude de la régénération et certains travaux ont été conduits avec cette méthode (Bowden et al., 1995; Pascoe et al., 2002). Cette technique reste cependant critiquée par certains auteurs qui la trouvent moins sensible que l'amas cellulaire (Zhang et al., 1990). La sensibilité de l'hydre adulte a été discutée dans de précédents travaux, où les avis divergent. Pollino & Holdway (1999) montrent la faible sensibilité de l'hydre envers des substances organiques et sa forte sensibilité aux substances inorganiques comme le cuivre, le zinc ou le cadmium, en la comparant à d'autres espèces d'invertébrés (*Gammarus pseudolimnaeus*, *D. magna*). Un essai inter-laboratoires plus global (Arkhipchuk et al., 2000b; Beauregard & Ridal, 2000; Castillo et al., 2000b; Castillo & Schäfer, 2000; Diaz-Baez & Perez, 2000; Forget et al., 2000a, b; Pica-Granados et al., 2000; Ronco et al., 2000) a démontré que *H. attenuata* (96h-sublétaleté) arrivait au premier rang des espèces les plus sensibles aux composés organiques et inorganiques confondus, suivi par *D. magna* (48h-létaleté) et *Panagrellus redivivus* (96h-inhibition de la maturation).

Dans ce contexte, il nous fallait au préalable tester le degré de sensibilité du tronçon gastrique en parallèle à celle des adultes. Pour ce faire, différents groupes de substances chimiques ont été étudiés. Nous avons ainsi pu démontrer que cet embryon est un bon modèle prédictif pour l'étude des effets sur le développement. Un récapitulatif des ratios A/D

disponibles pour certaines substances chez l'hydre et chez les mammifères (Table 23) montre que, hormis pour l'azétidine, la colchicine, les acides rétinoïques et le carbonate de lithium, le tronçon gastrique donne des ratios du même ordre de grandeur que les amas cellulaires, bien que légèrement inférieurs. Pour des essais sur le tronçon gastrique, nous pouvons noter des différences de sensibilité (colchicine et le carbonate de lithium selon les auteurs) pouvant être imputées aux différentes méthodes d'intoxications. Ainsi, la plupart des substances ayant un effet sur le développement des mammifères ont manifesté une toxicité sur le développement du tronçon gastrique.

La toxicité observée pour certaines substances chimiques peut être expliquée par leurs effets soit sur la mésoglée, soit le système nerveux ou encore par l'induction d'apoptose.

En effet, différentes études ont démontré l'importance de la mésoglée dans la régénération. Cette structure est d'abord un support pour les cellules, qui influence leur prolifération, leur différenciation, leur adhésion et leur migration (Sarras et al., 1993; Zhang & Sarras, 1994). Cette matrice est connue pour contenir différents composés comme de la fibronectine, de la laminine, des protéoglycanes et surtout du collagène, qui est une des protéines les plus abondantes chez l'animal (Zhang et al., 1994; Schmid et al., 1999). Rien de surprenant qu'un inhibiteur de la polymérisation des microtubules (colchicine) induise un effet important sur le développement, de même qu'un analogue de la proline (azétidine-2-carboxylique), inhibiteur de la synthèse du collagène.

Les hydres sont les premiers métazoaires à avoir développé un système nerveux. Celui-ci est un réseau neuronal diffus à travers le corps, composé de cellules ganglionnaires et sensorielles (Taddei-Ferretti & Musio, 2000). De nombreux neuropeptides ont d'ailleurs été identifiés chez *Hydra* (Annexe 3). Ils fonctionnent comme des neurotransmetteurs ou des neurohormones, qui contrôlent les processus de développement (Takahashi et al., 1997). Le développement du système nerveux est le premier événement important de la régénération de l'hydre (Galliot et al., 1995). A cause des mouvements tissulaires, celui-ci est également en état dynamique et donc continuellement en mitose (Takahashi et al., 2000). Des substances qui interfèrent avec la transmission du système nerveux (fluoxétine, carbamazépine, propranolol) peuvent avoir un impact important sur le développement des embryons. Toutefois, la mise en place du système nerveux n'est pas nécessaire à la régénération, comme l'ont prouvé des traitements avec des substances inhibitrices de la division cellulaire ou de la synthèse de l'ADN (colchicine, hydroxyurée). Ces substances tuent rapidement et

sélectivement les cellules souches interstitielles en prolifération (initiatrices des cellules nerveuses), en laissant en vie les cellules souches épithéliales qui continuent à se diviser mais plus lentement (Fujisawa, 2003).

D'autres substances peuvent influencer la mort cellulaire, ce qui peut expliquer la toxicité visualisée chez l'hydre. Il a été démontré que le triclosan et le diclofenac induisent un effet apoptotique dans différentes cultures cellulaires (Inoue et al., 2004; Amin & Hamza, 2005). Le diclofenac augmente l'activité de la caspase-3 dans des cellules HL-60 après 24h d'incubation à 125 μ M (Inoue et al., 2004) ou après 36h à 10 μ M pour les cellules SCC 1483 (Kim et al., 2004). Ces mêmes auteurs proposent également l'ibuprofène comme inducteur d'apoptose, mais dans une moindre mesure. Une augmentation de l'apoptose a également été observée après une exposition de 1h à 0,25 mM de triclosan dans une lignée cellulaire épithéliale de gencive humaine (Zuckerbraun et al., 1998).

Les substances avec un ratio A/D égal ou inférieur à 1 sont nombreuses dans cette étude. Elles ne montrent pas d'effet adverse spécifique sur le développement des embryons d'hydre. Or, certaines substances de cette catégorie expriment des toxicités en décalage avec leur mécanisme d'action. La bléomycine par exemple, inhibiteur de la synthèse de l'ADN, n'affecte pas plus l'embryon que l'adulte, comme la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse des protéines). Nous sommes peut-être en présence de substances agissant sélectivement sur une population cellulaire spécifique. Les substances dont les valeurs de toxicité sont comprises entre 1 et 10 mg/L, ont des effets variés. Elles perturbent la membrane (digluconate de chlorhexidine), affectent le cytosquelette en dépolarisant l'actine (cytochalasine), interfèrent avec la transmission nerveuse (deltaméthrine, carbonate de lithium), inhibent la fragmentation de l'ADN et l'expression des caspases (zinc).

Certaines substances montrent des toxicités assez faibles ($CL_{50} > 100$ mg/L), ce qui peut sembler peu en accord avec les mécanismes d'action avancés, comme pour l'acrylamide ou l'alpha-cyperméthrine, dont la cible est le système nerveux central (Elbetieha et al., 2001). Il a été montré que pour l'hydroxyurée la réplication de l'ADN dans des amas cellulaires d'hydre est bloquée par un traitement à 761 mg/L (Zhang & Sarras, 1994), concentration supérieure à la gamme de concentrations choisie dans cette étude, ce qui peut expliquer les différences enregistrées.

II - Toxicité du nonylphénol sur la survie des hydres adultes et le développement des embryons.

Le NP s'avère être une molécule difficile à étudier à cause de sa faible solubilité dans les milieux aqueux et sa propriété de forte adsorption pouvant faire diminuer rapidement les concentrations dans le milieu test. Pour pallier à ces problèmes, nous avons choisi de dissoudre le NP directement dans le milieu hydre, sans utilisation de tiers solvant pour éliminer toute possibilité d'interférence, d'utiliser cette solution immédiatement après sa préparation, de saturer tous les cristallisoirs pour chaque concentration de NP testée et d'échantillonner les dilutions de solution saturée afin d'en mesurer la concentration.

Toxicité du nonylphénol chez *H attenuata*.

En comparant ces résultats à ceux retrouvés dans la littérature, l'hydre apparaît être une des espèces d'invertébrés d'eau douce les plus sensibles pour la toxicité aiguë du NP chez les adultes (CL10-96h = 64 µg/L) et les embryons (CL10-96h = 21 µg/L). Les valeurs de CL50 pour toutes les espèces d'eau douce sont généralement comprises entre 100 et 1000 µg/L. Pour les invertébrés d'eau douce cette gamme est plus vaste, entre 20 et 1200 µg/L.

Parmi les invertébrés, citons *Hyalella azteca* avec une LC50-96h de 20,7 µg/L (Brooke, 1993a), *Eurythemora affinis* avec une CL50-96h de 38 µg/L (Forget-Leray et al., 2005), *Daphnia* sp. pour laquelle les valeurs de CL50s-48h s'échelonnent entre 61 et 190 µg/L (Comber et al., 1993; Brooke, 1993a; Tanaka & Nakanishi, 2002; Hirano et al., 2004). Pour les vertébrés, les valeurs de CL50-96h varient entre 80 et 230 µg/L (Brooke, 1993a,b) avec pour l'expression de la vitellogénine chez le poisson d'eau douce *Xiphophorus helleri*, une valeur de LOEC-72h de 4 µg/L (Kwak et al., 2001).

Zhang et al. (2003) notent une CL50-48h pour le retard de développement des embryons de *D. magna* à 281 µg/L et une CL50-96h pour la létalité de 738 µg/L. Preston et al. (2000) reportent pour *B. calyciflorus* une NOEC-96h de 5 µg/L (mesurée) et une LOEC-96h de 50 µg/L (mesurée) pour la fertilisation, tandis que Radix et al. (2002) mentionnent une perturbation de la reproduction pour 370 µg/L (mesurée).

Notons que l'espèce d'eau douce la plus sensible au nonylphénol est l'algue *Scenedesmus subspicatus* dont la croissance est inhibée pour 3,3 µg/L (EC50-72h; EU-RAR, 2002) ; pour la

plupart des autres végétaux (algues uni-cellulaires et macrophytes) l'inhibition est observée pour des concentrations de 3 à plusieurs centaines de $\mu\text{g/L}$ (Brooke, 1993a).

Cependant, les espèces d'invertébrés, de vertébrés ou de végétaux d'eau douce ne sont pas les plus sensibles envers le NP. L'analyse de la toxicité par Ward & Boeri (1991) sur un micro-crustacé marin *A. bahia* a montré une NOEC-28j de 2,9 $\mu\text{g/L}$.

Toxicité chronique du nonylphénol chez *H. attenuata*.

Nous avons noté que la majorité des données bibliographiques sur la toxicité du NP sur le long terme concernaient les vertébrés. Ainsi, la plus sensible des espèces est un poisson, *O. mykiss* avec une LOEC_{reproduction} de 130 ng/L (Lahnsteiner et al., 2005) et une NOEC-90j_{survie} de 6 $\mu\text{g/L}$ (Brooke, 1993a).

Peu d'informations existent sur la toxicité chronique des invertébrés (Kahl et al., 1997). Chez *Eurythemora affinis* (mortalité des nauplii) une NOEC-10j et une LOEC-10j de 7 et 15 $\mu\text{g/L}$ respectivement, été estimées par Forget-Leray et al. (2005). Chez *Daphnia*, la valeur de NOEC sur la reproduction est de 76 $\mu\text{g/L}$ après 7j (O'Halloran et al., 1999), 24 $\mu\text{g/L}$ (Comber et al., 1993) et 77 $\mu\text{g/L}$ (Brooke, 1993a) après 21j d'exposition, les différences pouvant s'expliquer par l'utilisation ou non de solvant. Zhang et al. (2003) notent une NOEC-35j de 50 $\mu\text{g/L}$.

Chez l'hydre les valeurs de LOEC-8j pour l'adulte et l'embryon semblent proches du $\mu\text{g/L}$ voire de la dizaine de $\mu\text{g/L}$ (valeurs estimées). Une mesure ultérieure des concentrations sera nécessaire afin de conclure quant à ces faibles valeurs.

Le nonylphénol induit un mécanisme d'apoptose chez des hydres adultes.

Notre travail de recherche a démontré que l'hydre exprime un niveau basal d'apoptose. Le programme de mort cellulaire est un processus naturel chez l'hydre comme chez d'autres organismes (gamétogenèse (Technau et al., 2003; Miller et al., 2000), élimination des cellules en excès (Bosch & David, 1984)), ce qui corrobore les dégradations de l'ADN que l'on peut retrouver chez les témoins.

Les deux techniques mises en œuvre pour l'étude explorent deux aspects du mécanisme. La technique du « DNA ladder » qui témoigne de la réalité d'un processus apoptotique et de son intensité, met en évidence un niveau apoptotique variable chez des hydres adultes témoins en fonction de leur état physiologique (jeûne). Après 2j de jeûne, plus

aucune fragmentation n'est visible par cette méthode. Le niveau basal apoptotique a également été mis en évidence par l'expression des caspases-3A et -3B chez les hydres témoins adultes et embryons.

Le deuxième volet qu'il nous faut explorer est la mesure de l'activité lytique des caspases, laquelle est activée par les inducteurs d'apoptose. La colchicine induit l'activité caspase chez l'hydre selon Cikala et al. (1999), qui ont proposé une méthode de fluorescence pour la mesure d'activité. Nous remettons en œuvre cette technique pour étudier l'influence du NP sur ces activités et étudier la relation éventuelle avec l'induction d'apoptose par le nonylphénol.

Dans un deuxième temps, l'hydre a permis de démontrer que le NP induisait un processus d'apoptose. Ces effets sont très rapides (1 et 5h) après une exposition à de fortes concentrations létales (CL50 et CL100). Les effets apoptotiques n'augmentent pas avec le temps, comme les effets sur la survie de l'hydre qui n'évolue plus de façon importante après 24h d'exposition. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont également démontré *in vivo* et *in vitro* des effets apoptotiques du NP au niveau des cellules spécialisées dans la reproduction chez les mammifères (Weber et al., 2002; Wang et al., 2003; Aoki et al., 2004).

Le nonylphénol induit des anomalies du développement chez l'hydre.

L'hydre présente des malformations au niveau des tentacules pour une concentration faible de 0,1% (estimation à 2 µg/L) de solution saturée en NP. Si l'on recherche dans la littérature les effets délétères du NP enregistrés sur le développement, on constate que les informations sont peu nombreuses à ce sujet, et que le NP provoque des malformations chez les daphnies, les huîtres ou encore les éponges.

Les malformations chez les daphnies sont visibles chez 11% des jeunes à 10 µg/L après 30j d'exposition, en dessous de la NOEC sur le développement de 24 µg/L (Shurin & Dodson, 1997). Les expositions long terme (21j) à des concentrations en NP de 101 et 200 µg/L induisent respectivement des malformations des épines postérieures et des antennes (LeBlanc et al., 2000). Une déformation (épines postérieures, antennes) est visible chez 10% des jeunes exposés à 50 µg/L durant 35j (Zhang et al., 2003). Des anomalies sont enregistrées au niveau de la coquille de la larve de *Crassostrea gigas* pour une exposition de 4h à 100 µg/L (Nice et al., 2000). Enfin, chez les éponges d'eau douce, Hill et al. (2002) déterminent

une croissance anormale avec des déformations pour des concentrations supérieures à 10 mg/L chez *Heteromyenia sp.* et à 2,2 mg/L pour *Eunapius fragilis*.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que le mécanisme d'apoptose est à l'origine des malformations observées chez l'hydre, comme peut être impliqué ce processus dans la formation des doigts chez les mammifères (Ameisen, 1996). Il semblerait que ce phénomène soit exclusivement observé chez des hydres dont le nombre de tentacules développées est faible (<4). La division des tentacules en deux pourrait amener à un nombre standard (5 à 8) pouvant assurer une meilleure capture des proies. Cependant plusieurs questions restent en suspens : pourquoi cette anomalie n'est visible que chez les hydres exposées au NP, quelle est l'implication du NP dans ce phénomène ? Des expérimentations supplémentaires seraient nécessaires répondre à ces questions.

Evaluation de risque pour le nonylphénol.

Différentes évaluations de risque pour le NP (EU RAR, 2002; US EPA, 2003 et Servos et al., 2003) ont été proposées et les résultats obtenus sont résumés dans la figure 25.

La Communauté Européenne (EU RAR, 2002) donne une PNEC (Predictive No Effect Concentration) pour le compartiment aquatique de 0,33 µg/L, obtenue en divisant la plus faible valeur de NOEC enregistrée par un facteur 10 ; cette NOEC est obtenue chez l'algue *Scenedesmus subspicatus* (EC10_{biomass}-72h de 3,3 µg/L; Kopf, 1997). Il apparaît que la concentration de NP à l'échelle régionale dans les eaux de surfaces est de l'ordre de 0,6 µg/L (PEC ou Predictive Environmental Concentration), soit équivalente, sinon supérieure à la PNEC (EU RAR, 2002). Ce résultat conduit à la conclusion que la probabilité d'avoir des effets toxiques sur la faune n'est pas négligeable, car PEC/PNEC >1.

L'approche mise en œuvre au USA par l'EPA (U.S. EPA, 2003) détermine différentes valeurs limites de toxicité à partir des données de toxicité chez différents vertébrés et invertébrés aquatiques. Une valeur finale aiguë (FAV) de 55,71 µg/L est établie pour les milieux d'eau douce en utilisant le modèle développé par Stephan et al. (1985), à partir des valeurs aiguës des quatre espèces les plus sensibles (*H. azteca*, *Bufo boreas*, *D. magna*, *P. promelas*). Une valeur chronique finale (FCV) de 5,9 µg/L a été dérivée de la valeur aiguë finale FAV (55,71 µg/L), en la divisant par un ratio moyen aigu sur chronique (FACR) de 9,4. Le ratio moyen est la moyenne géométrique des ratios aigus sur chroniques obtenus avec *D. magna*, *Americamysis bahia* et *O. mykiss*, dont les valeurs aiguës et chroniques sont disponibles.

Dans le domaine marin une FAV de 13 µg/L a été globalement calculée, ainsi qu'une FCV de 1,4. Notons également pour cette étude que les plantes ou algues n'ont pas été prises en compte.

Au Canada, le critère de qualité des eaux douces pour la protection de la vie aquatique a été fixé à 1 µg/L pour le NP (Sabik et al., 2003). Différentes approches ont été proposées par Servos et al. (2003), qui utilisent trois modèles : hyperconservatif, conservatif et directionnel pour l'évaluation de risque.

Dans l'évaluation hyperconservatrice, ils définissent une valeur de toxicité critique (CTV) de 17 µg/L à partir du paramètre le plus sensible en aigu (CL50-96h chez *P. americanus*, espèce marine). En appliquant un facteur de 100 à la CTV aiguë, ils estiment une valeur sans effet environnementale (ENEV) de 0,17 µg/L.

Dans l'approche conservatrice, ils partent de l'espèce la plus sensible sur le long terme (*A. bahia* NOEC-28j de 3,9 µg/L, espèce marine) et dérivent une CTV de 3,9 µg/L. Ils divisent la CTV par un facteur de 10 et aboutissent à une ENEV de 0,39 µg/L.

Dans l'évaluation directionnelle, la ENEV est basée sur toutes les valeurs de données de toxicité aiguë et chronique. Une valeur de 10 µg/L est déterminée comme étant la concentration pour laquelle 95% des espèces peuvent être protégées (i.e. la EC50 est dépassée dans moins de 5% des espèces). Un facteur 10 est appliqué à cette valeur, ce qui donne une ENEV de 1 µg/L.

Les concentrations environnementales de NP observées en Europe semblent être dans la même gamme que les concentrations observées en Amérique du nord, avec quelques exceptions dans certaines rivières recevant des effluents contaminés (Kolpin et al., 2004). Ces concentrations sont généralement proches de 1 µg/L, ce qui est approximativement 6 fois moins que la FCV de 5,9 calculé par l'U.S. EPA (2003). Les concentrations aquatiques reportées dans certains sites d'eau douce pollués de plusieurs pays sont du même ordre ou excèdent les différentes ENEV de 0,17, de 0,39 ou de 1 µg/L recommandées par Servos et al. (2003).

Nous pouvons noter que les effets néfastes enregistrés chez l'hydre se produisent pour des concentrations en NP représentatives des environnements pollués (un à plusieurs centaines de µg/L) mais également pour le développement à des concentrations environnementales plus faibles.

A partir de ces résultats, il peut être conclu que le NP est relargué dans l'environnement aquatique à des concentrations qui ont ou peuvent avoir un effet délétère sur les espèces de vertébrés et d'invertébrés pour le court et le long terme, en particulier sur leur reproduction et leur développement, comme le démontrent les résultats obtenus chez l'hydre. Les dangers environnementaux reconnus présentés par les APEs ont déjà conduit à certaines restrictions d'usage. Notons en particulier dans le contexte européen, la recommandation adoptée par la commission OSPAR qui exigeait l'abandon des NPEs des agents domestiques et d'entretiens industriels d'ici 2000 (Parcom, 1992).

III – Implication des caspases-3.

Nos travaux ont permis de déterminer un niveau basal d'expression des caspases-3 et d'obtenir la séquence partielle des caspases-3A et -3B. Notre travail de recherche ne nous a pas permis pour le moment d'obtenir de résultats témoignant de l'implication des caspases-3 dans l'induction d'apoptose observée après intoxication au NP. Il reste à étudier les effets d'une exposition au NP sur l'activité caspase des hydres ainsi qu'à explorer d'autres voies possibles pouvant expliquer la toxicité du NP.

Chez la drosophile en développement il a été récemment montré (Lohmann et al., 2002) que le gène Hox *Deformed* (*Dfd*) active directement l'expression d'un activateur de mort cellulaire *reaper* (*rpr*). Les liens directs entre les gènes Hox et les composés orchestrant l'apoptose n'ont pas encore été documentés chez l'hydre. Il serait intéressant d'étudier l'expression des gènes Hox, gènes impliqués dans le développement, et la toxicité du 4-NP.

Une cible potentielle pour les perturbateurs endocriniens est la voie de signalisation des acides rétinoïques (des dérivés de la vitamine A). Les membres de la super famille des récepteurs nucléaires aux rétinoïdes (récepteurs X rétinoïdes ou RXR), jouent un rôle signalétique fondamental dans le développement des animaux (Maden, 2000), des hydres, mais aussi dans le développement axial, craniofaciale et des membres durant l'embryogenèse des vertébrés (Smith et al., 2003).

Il a été montré que le génome de cnidaires contient 11 récepteurs nucléaires, incluant le groupe RXR. Seulement un de ces récepteurs a été fonctionnellement analysé chez la méduse *Tripedalia cystophora*, dont l'expression du gène est activée en présence d'une très faible concentration de l'acide 9-cis rétinoïque (Kostrouch et al., 1998). Dans le corail

Acropora millepora, des récepteurs sont détectés dont l'action est similaire aux RXR (Wiens et al., 2003).

Il est également établi que dans plusieurs systèmes biologiques, l'acide rétinoïque (0 à 50 $\mu\text{mol/L}$) est impliqué dans l'induction d'apoptose (Wiens et al., 2003). Sarkar & Sharma (2002) ont évalué l'implication de plusieurs gènes chez la souris dont l'apoptose est influencé par l'acide rétinoïque. Les résultats démontrent que durant l'organogenèse, une dose tératogène connue d'acide rétinoïque cause l'apoptose et module l'expression de plusieurs gènes (dont la caspase-3).

Il serait intéressant dans le futur d'étudier l'effet du NP sur cette voie de signalisation (RXR).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail consistait à compléter nos connaissances sur le degré de sensibilité de l'hydre adulte et des embryons envers une large gamme de substances chimiques, l'étude de la toxicité du NP et ses mécanismes d'action.

Ce cnidaire a été choisi dans cette étude car il alliait plusieurs avantages, le plus important étant sa capacité à se régénérer. Cette caractéristique a été mise à profit pour l'étude du développement des embryons. En effet, les connaissances manquent pour juger de l'étendue des problèmes et des conséquences pour l'homme et l'environnement, que peuvent avoir les substances en général, et les perturbateurs endocriniens en particulier, sur le développement.

➤ Dans la première partie de cette étude, nous avons mis en évidence que l'hydre adulte et les embryons étaient capables de détecter les potentialités toxiques de divers composés organiques. Le tronçon gastrique semble être un bon indicateur de la toxicité sur le développement. L'étude de la régénération de l'hydre à partir des tronçons gastriques a permis de mettre en évidence la toxicité de divers perturbateurs endocriniens inclus dans notre étude dont le NP, le TBTO, le dibutyl phthalate. Ces données confirment la sensibilité de cette espèce pour évaluer la toxicité des polluants hydriques comme ce qui a déjà été démontré pour les pesticides, les métaux, les solvants, les éthers de glycol, les œstrogènes et les molécules pharmaceutiques.

➤ Dans la seconde partie de notre étude, nous avons mis en évidence que l'hydre est un bon indicateur du potentiel toxique du NP sur la survie et sur le développement. L'hydre est l'une des espèces d'invertébrés d'eau douce les plus sensibles vis-à-vis de la toxicité du NP. Ceci est vrai pour l'adulte sur le court terme, mais également pour l'embryon sur le court et le long terme.

L'étude de la toxicité du NP sur l'hydre a mis en évidence une induction de l'apoptose. Nous pouvons relier ce phénomène à la toxicité du NP qui pourrait être le résultat d'un mécanisme apoptotique, mécanisme cellulaire qui est physiologique dans le contrôle de la différenciation des tissus, mais qui peut avoir des effets délétères si le processus est dérégulé, anormalement activé et inhibé. Il serait d'ailleurs intéressant de faire des essais sur

des embryons. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce mécanisme est à l'origine des malformations observées au niveau des tentacules des hydres en développement. Des expérimentations supplémentaires sont encore nécessaires conclure sur l'expression et l'activation des caspases-3A et -3B.

Cette partie de notre étude a mis en avant l'intérêt de prolonger les essais sur l'étude de la régénération et de la survie au-delà de 96h d'exposition.

➤ Dans la troisième partie de notre étude, nous avons pu montré l'influence du jeûne sur l'apoptose. Cependant, aucune conclusion ne peut être retirée quant à l'implication des caspases-3 dans l'induction de l'apoptose par le NP ou la colchicine. Des études supplémentaires sont nécessaires pour valider ou non cette hypothèse, mais également pour étudier d'autres voies possibles de l'induction de l'apoptose par le NP, comme la voie de signalisation des récepteurs X rétinoïdes.

Ainsi, l'hydre a démontré une réelle capacité à détecter les problèmes que certaines substances peuvent créer lorsqu'elles sont relarguées dans l'environnement. La détermination du ratio A/D peut donner de bonnes indications sur la toxicité sur le développement, avant de procéder à des examens plus élaborés.

Les effets endocriniens des substances suspectées sur divers systèmes endocriniens n'ont pas été étudiés avec la même intensité chez les invertébrés que chez les poissons. La plupart des études se focalisent sur les téléostéens, tandis que les invertébrés ne reçoivent qu'une très faible attention, en dépit du fait qu'ils constituent 95% des espèces vivantes et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement et la santé des écosystèmes aquatiques.

Chez les invertébrés, l'évolution des systèmes endocriniens diffère significativement de ceux des vertébrés et il n'est pas certain que les PE chez les vertébrés présentent un risque équivalent chez les invertébrés.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- ALEXANDROVA O, SCHADE M, BÖTTGER A, DAVID CN. 2005. Oogenesis in *Hydra*: Nurse cells transfer cytoplasm directly to the growing oocyte. *Developmental Biology*. **281**:91-101.
- ALVARADO AS. 2000. Regeneration in the metazoans: why does it happens?. *Bioessays*. **22**:578-590.
- ALZIEU C, THIBAUD Y, HÉRAL M, BOUTIER B. 1980. Evaluation des risques dus à l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchylicoles. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*. **44**:306-348.
- AMEISEN JC. 1996. Le suicide des cellules. *Pour la Science*. **224**: 52-59.
- AMIN A, HAMZA AA. 2005. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats : a possible role of DNA fragmentation. *Toxicology*. **208**:367-375.
- ANDREOZZI R, RAFFAELE M, NICKLAS P. 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*. **50**:1319-1330.
- ANKLEY G, MIHAICH E, STAHL R, TILLITT D, COLBORN T, MCMASTER S, MILLER R, BANTLE J, CAMPBELL P, DENSLOW N, DICKERSON R, FOLMAR L, FRY M, GIESY J, GRAY LE, GUINEY P, HUTCHINSON T, KENNEDY S, KRAMER V, LeBLANC G, MAYES M, NIMROD A, PATINO R, PETERSON R, PURDY R, RINGER R, THOMAS P, TOUART L, VAN DER KRAAK G, ZACHAREWSKI T. 1998. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **17**:68-87.
- AOKI M, KURASAKI M, SAITO T, SEKI S, HOSOKAWA T, TAKAHASHI Y, FUJITA H, IWAKUMA T. 2004. Nonylphenol enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells. *Life Sciences*. **74**:2301-2312.
- ARKHIPCHUK VV, MALINVOSKAYA MV, GARANKO NN. 2000a. Cytogenetic study of organic and inorganic toxic substances on *Allium cepa*, *Lactuca sativa*, and *Hydra attenuata* cells. *Environmental Toxicology*. **15**:338-344.
- ARKHIPCHUK VV, ROMANENTO VD, MALINVOSKAYA MV, KIPNIS LS, SOLOMATINA VD, KROT YG. 2000b. Toxicity assessment of water samples with a set a animal and plant bioassays: experience of the Ukrainian participation in the watertox program. *Environmental Toxicology*. **15**:277-286.
- ARUKWE A, FÖRLIN L, GOKSOYR A. 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **16**(12):2576-2583.
- ARUKWE A, THIBAUT R, INGEBRIGTSEN K, CELIUS T, GOKSOYR A, CRAVEDI JP. 1999. In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*. **49**:289-304.
- BALDWIN WS, GRAHAM SE, SHEA D, LeBLANC GA. 1997. Metabolic androgenization of female *Daphnia magna* by the xenoestrogen 4-nonylphenol. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **16**(9):1905-1911.
- BEACH MJ, PASCOE D. 1998. The role of *Hydra vulgaris* (Pallas) in assessing the toxicity of freshwater pollutants. *Water Research*. **32**(1):101-106.
- BEAUREGARD T, RIDAL J. 2000. Evaluation of six simple bioassays for the determination of drinking water quality-canadian results. *Environmental Toxicology*. **15**:304-311.
- BENNIE DT, SULLIVAN CA, LEE HB, PEART TE, MAGUIRE RJ. 1997. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *The Science of the Total Environment*. **193**:263-275.

- BERKING S. 1997. Pattern formation in hydrozoa. *Naturwissenschaften*. **84**:381-388.
- BERKING S. 2003. A model for budding in *Hydra*: pattern formation in concentric rings. *Journal of Theoretical Biology*. **222**:37-52.
- BERRYMAN D, HOUDE F, DEBLOIS C, O'SHEA M. 2004. Nonylphenolic compounds in drinking and surface waters downstream of treated textile and pulp and paper effluent: A survey and preliminary assessment of their potential effects on public health and aquatic life. *Chemosphere*. **56**:247-255.
- BESTER K, THEOBALD N, SCHRÖDER HF. 2001. Nonylphenols, nonylphenol-ethoxylates, linear alkylbenzenesulfonates (LAS) and bis(4-chlorophenyl)-sulfone in the German Bight of the North Sea. *Chemosphere*. **45**:817-826.
- BEVAN CL, PORTER DM, PRASAD A, HOWARD MJ, HENDERSON LP. 2003. Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspectives*. **111**:488-496.
- BETTINETTI R, PROVINI A. 2002. Toxicity of 4-nonylphenol to *Tubifex tubifex* and *Chironomus riparius* in 28-day whole-sediment tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **53**(1):113-121.
- BLACKBURN MA, WALDOCK MJ. 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*. **29**(7):1623-1629.
- BLACKBURN MA, KIRBY SJ, WALDOCK MJ. 1999. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*. **38**:109-118.
- BLAGOSKLONNY MV. 2000. Cell death beyond apoptosis. *Leukemia*. **14**(8):1502-1508.
- BLAISE C, KUSUI T. 1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology Water Quality*. **12**:53-60.
- BODE PM, BODE HR. 1980. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. I. Head-body proportion regulation. *Developmental Biology*. **78**:484-496.
- BODE PM, BODE HR. 1984a. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. III. The shaping of the body column. *Developmental Biology*. **106**:315-325.
- BODE PM, BODE HR. 1984b. Formation of pattern in regenerating tissue pieces of *Hydra attenuata*. II. Degree of proportion regulation is less in the hypostome and tentacle zone than in the tentacles and basal disc. *Developmental Biology*. **103**:304-312.
- BODE PM, AWAD TA, KOIZUMI O, NAKASHIMA Y, GRIMMELIKHUIJZEN CJP, BODE HR. 1988. Development of the two-part pattern during regeneration of the head in *Hydra*. *Development*. **102**:223-235.
- BODE HR. 1996. The interstitial cell lineage of *Hydra*: a stem cell system that arose early in evolution. *Journal of Cell Science*. **109**:1155-1164.
- BODE HR. 2001. The role of Hox genes in axial patterning in *Hydra*. *American Zoologist*. **41**:621-628.
- BOLZ U, HAGENMAIER H, KÖRNER W. 2001. Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. *Environmental Pollution*. **115**:291-301.
- BOLZER A, MELZER RR, BOSCH TCG. 1994. A SEM analysis of DMSO treated *Hydra* polyps. *Biology of the Cell*. **81**:83-86.
- BOSCH TCG, DAVID CN. 1984. Growth regulation in *Hydra*: relationship between epithelial cell cycle length and growth rate. *Developmental Biology*. **104**:161-171.
- BOSCH TCG, BENITEZ E, GELLNER K, PRAETZEL G, SALGADO LM. 1995. Cloning of a *ras*-related gene from *Hydra* which responds to head-specific signals. *Gene*. **167**:191-195.

- BOSCH TCG, FUJISAWA T. 2001. Polyps, peptides and patterning. *Bioessays*. **23**:420-427.
- BOSCH TCG. 2003. Ancient signals: peptides and interpretation of positional information in ancestral metazoans. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. **136**:185-196.
- BOWDEN HC, WILBY OK, BOTHAM CA, ADAM PJ, ROSS FW. 1995. Assessment of the toxic and potential teratogenic effects of four glycol ethers and two derivatives using the *Hydra* regeneration assay and rat whole embryo culture. *Toxicology In Vitro*. **9**(5):773-781.
- BOYD GR, REMTSMA H, GRIMM DA, MITRA S. 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment*. **311**:135-149.
- BOYD GR, PALMERI JM, ZHANG S, GRIMM DA. 2004. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *The Science of the Total Environment*. **333**:137-148.
- BRIDGE DM, STOVER NA, STEELE RE. 2000. Expression of a novel receptor tyrosine kinase gene and a *paired*-like homeobox gene provides evidence of differences in patterning at the oral and aboral ends of *Hydra*. *Developmental Biology*. **220**:253-262.
- BROOKE LT. 1993a. Acute and chronic toxicity of nonylphenol to ten species of aquatic organisms. EPA 68-C1-0034. U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN.
- BROOKE LT. 1993b. Accumulation and lethality for two freshwater fishes (Fathead minnow and Bluegill) to nonylphenol. U.S.EPA contract N°68-C1-0034, work assignment N° 1-12, September 30, 1993, Duluth, MN 55804.
- BROOKS BW, FORAN CM, RICHARDS SM, WESTON J, TURNER PK, STANLEY JK, SOLOMON KR, SLATTERY M, La POINT TW. 2003. Aquatic Ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters*. **142**:169-183.
- BROUN M, SOKOL S, BODE HR. 1999. *Cngsc*, a homologue of goosecoid, participates in the patterning of the head, and is expressed in the organizer region of *Hydra*. *Development*. **126**:5245-5254.
- BROUN M., BODE HR. 2002. Characterization of the head organizer in *Hydra*. *Development*. **129**:875-884.
- BRYAN GW, GIBBS PE, BURT GR, HUMMERSTONE LG. 1987. The effects of tributyltin TBT accumulation on adult dog-welks, *Nucella lapillus*: long term field laboratory experiments. *Journal of the Marine Biological Association of the U K*. **67**:525-544.
- BURNS RG. 1973. ³H-colchicine binding. *Experimental Cell Research*. **81**(2):285-292.
- CAMPBELL RD, DAVID CN. 1974. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. II. Interstitial cells. *Journal of Cell Science*. **16**:349-358.
- CAMPBELL RD. 1976. Elimination by *Hydra* interstitial and nerve cells by means of colchicine. *Journal of Cell Science*. **21**(1):1-13.
- CARBALLA M, OMIL F, LEMA JM, LLOMPART M, GARCIA-JARES C, RODRIGUEZ I, GOMEZ M, TERNES T. 2004. Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water Research*. **38**:2918-2926.
- CARDENAS M, FABILA YV, YUM S, CERBON J, BOHMER ED, WETZKER R, FUJISAWA T, BOSCH TCG, SALGADO LM. 2000. Selective protein kinase inhibitors block head-specific differentiation in *Hydra*. *Cellular Signalling*. **12**:649-658.
- CARDINALI M, MARADONNA F, OLIVOTTO I, BORTOLUZZI G, MOSCONI G, POLZONETTI-MAGNI AM, CARNEVALI O. 2004. Temporary impairment of reproductive in freshwater teleost exposed to nonylphenol. *Reproductive Toxicology*. **18**:597-604.

- CARTWRIGHT P, BOWSHER J, BUSS LW. 1999. Expression of a Hox gene, *Cnox-2*, and the division of labor in a colonial hydroid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **96**:2183-2186.
- CASTILLO GC, VILA IC, NEILD E. 2000a. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology*. **15**:370-375.
- CASTILLO LE, PINNOCK M, MARTINEZ E. 2000b. Evaluation of a battery of toxicity tests for use in the assessment of water quality in a Costa Rican laboratory. *Environmental Toxicology*. **15**:312-321.
- CASTILLO G, SCHÄFER L. 2000. Evaluation of a bioassay battery for water toxicity testing: a Chilean experience. *Environmental Toxicology*. **15**:331-337.
- CELIUS T, WALTHER BT. 1998. Oogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis in vivo and in vitro. *Journal of Endocrinology*. **158**:259-266.
- CEMAGREF. 2004. Evaluation de l'écotoxicité de produits pharmaceutiques sur la survie, le développement et la reproduction de zooplankton et de poisson. Programme PNETOX 2001, ENIMED, Rapport Final, Laboratoire d'écotoxicologie, Lyon.
- CHATTERJEE S, LAUDKAR S, GODBOLE NN, GHASKADBI S. 2001. *Hydra* constitutively expresses transcripts involved in vertebrate neural differentiation. *Indian Academy of Sciences*. **26**(2):153-155.
- CHINNAIYAN AM, DIXIT VM. 1996. The cell-death machine. *Current Biology*. **6**:555-562.
- CHUN YH, JOHNSON EM, GABEL BEG, CADOGAN ASA. 1983a. Regeneration by dissociated adult *Hydra* cells: a histologic study. *Teratology*. **27**:81-87.
- CHUN YH, JOHNSON EM, GABEL BEG, CADOGAN ASA. 1983b. Effect of vinblastine sulfate on growth and histologic development of reaggregated *Hydra*. *Teratology*. **27**:89-94.
- CIKALA M, WILM B, HOBMAYER E, BÖTTGER A, DAVID CN. 1999. Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan *Hydra*. *Current Biology*. **9**:959-962.
- CLEUVERS M. 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*. **142**:185-194.
- COMBER MHI, WILLIAMS TD, STEWART KM. 1993. The effects of nonylphenol on *Daphnia magna*. *Water Research*. **27**:273-276.
- CORFF SC, BURNETT AL. 1969. Morphogenesis in *Hydra*. I. Peduncle and basal disc formation at the distal end of regenerating *Hydra* after exposure to colchicine. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. **21**:417-443.
- CRISP TM, CLEGG ED, COOPER RL, WOOD WP, ANDERSON DG, BAETCKE KP, HOFFMANN JL, MORROW MS, RODIER DJ, SCHAEFFER JE, TOUART LW, ZEEMAN MG, PATEL YM. 1998. *Environmental Health Perspectives*. **106**:11-56.
- DASTON GP, ROGERS JM, VERSTEEG DJ, SABOURIN TD, BAINES D, MARSH SS. 1991. Interspecies comparisons of A/D ratios: A/D ratios are not constant across species. *Fundamental and Applied Toxicology*. **17**:696-722.
- DAVID CN, CAMPBELL RD. 1972. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. I. Epithelial cells. *Journal of Cell Science*. **2**:57-568.
- CAMPBELL RD, DAVID CN. 1974. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. II. Intertitial cells. *Journal of Cell Science*. **16**:349-358.
- DAVIES WJ, FREEMAN SJ. 1995. The *Hydra attenuata* assay. Methods in molecular biology. In vitro toxicity testing protocols. Eds O'Hare, Atterwill. Humana Press Inc, Totowa, NJ 43:321-326.

- DeFUR PL. 2004. Use and role of invertebrate models in endocrine disruptor research and testing. *Institute for Laboratory Animal Research*. **45**(4):484-493.
- DEPLEDGE MH, BILLINGHURST Z. 1999. Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Marine Pollution Bulletin*. **39**:32-38.
- DIAZ-BAEZ MC, PEREZ JB. 2000. Intralaboratory experience with a battery of bioassays: Colombia experience. *Environmental Toxicology*. **15**:297-303.
- ELBETIEHA A, DA'AS SI, KHAMAS W, DARMANI H. 2001. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **41**:522-528.
- ENDL I, LOHMANN JU, BOSCH TCG. 1999. Head-specific gene expression in *Hydra*: Complexity of DNA-protein interactions at the promoter of Ks1 is inversely correlated to head activation potential. *Developmental Biology*. **96**:1445-1450.
- EU-RAR. 2002. 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol – European Union Risk Assessment Report. EUR 20387. Institute for Health and Consumer Protection, European chemicals bureau, United Kingdom.
- FENET H, GOMEZ E, PILLON A, ROSAIN D, NICOLAS J-C, CASELLAS C, BALAGUER P. 2003. Estrogenic activity in water and sediments of a French river: contribution of alkylphenols. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **44**:1-6.
- FENGER U, HOFMANN M, GALLIOT B, CHICA SCHALLER H. 1994. The role of the cAMP pathway in mediating the effect of head activator on nerve-cell determination and differentiation in *Hydra*. *Mechanisms of Development*. **47**:115-125.
- FERRARI B, MONS R, VOLLAT B, FRAYSSE B, PAXEUS N, Lo GIUDICE R, POLLIO A, GARRIC J. 2004. Environmental risk assessment of 6 human pharmaceuticals: Are the current ERA procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology & Chemistry*. **23**(5):1344-1354.
- FORGET G, GAGNON P, SANCHEZ WA, DUTKA BJ. 2000a. Overview of methods and results of the eight country international development research centre (IDRC) watertox project. *Environmental Toxicology*. **15**:264-276.
- FORGET G, SANCHEZ-BAIN A, ARKHIPCHUK V, BEAUREGARD T, BLAISE C, CASTILLO G, CASTILLO LE, DIAZ-BAEZ MC, PICA-GRANADOS Y, RONCO A, SRIVASTAVA RC, DUTKA BJ. 2000b. Preliminary date of a single-blind, multicountry trial of six bioassays for water toxicity monitoring, *Environmental Toxicology*. **15**:362-369.
- FORGET-LERAY J, LANDRIAU I, MINIER C, LEBOULENGER F. 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **60**:288-294.
- FRIES E, PÜTTMANN W. 2004. Occurrence of 4-nonylphenol in rain and snow. *Atmospheric Environment*. **38**:2013-2016.
- FU LJ, STAPLES RE, STAHL RG Jr. 1991. Application of the *Hydra attenuata* assay for identifying developmental hazards among natural waters and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **22**:309-319.
- FU LJ, STAPLES RE, STAHL RG Jr. 1994. Assessing acute toxicities of pre- and post-treatment industrial wastewaters with *Hydra attenuata*: a comparative study of acute toxicity with the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **13**(4):563-569.
- FUJISAWA T. 2003. *Hydra* regeneration and epitheliopeptides. *Developmental Dynamics*. **226**:182-189.

- FUKUHORI N, KITANO M, KIMURA H. 2005. Toxic effects of bisphenol A on sexual and asexual reproduction in *Hydra oligactis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **48**:495-500.
- FURLONG J. 1995. EC approach to environmental risk assessment of new substances. *The Science of the Total Environment*. **171**:275-279.
- GALLIOT B, WELSCHOF M, SCHUCKERT O, HOFFMEISTER S, CHICA SCHALLER H. 1995. The cAMP Response Element Binding protein is involved in *Hydra* regeneration. *Development*. **121**:1205-1216.
- GALLIOT B. 1997. Signaling molecules in regeneration *Hydra*. *Bioessays*. **19**(1):37-46.
- GALLIOT B. 2000. Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Genetics & Development*. **10**:629-637.
- GALLIOT B, SCHMID V. 2002. Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *The International Journal of Developmental Biology*. **46**:39-48.
- GAUCHAT D, KREGER S, HOLSTEIN T, GALLIOT B. 1998. *prdl-a*, a gene marker for hydra apical differentiation related to triploblastic *paired*-like head-specific genes. *Development*. **125**:1637-1645.
- GHIRARDINI AV, NOVELLI AA, LIKAR B, POJANA G, GHETTI PF, MARCOMINI A. 2001. Sperm cell toxicity test using sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck (echinodermata: echinoidea): sensitivity and discriminatory ability toward anionic and non-ionic surfactants. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **20**(3):644-651.
- GIBBS PE, BRYAN GW, PASCOE PL, BURT GR. 1987. The use of the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as an indicator of TBT contamination. *Journal of the Marine Biological Association of the U K*. **67**:507-524.
- GIERER A, MEINHARDT H. 1972. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik*. **12**:30-39.
- GIERER A, BERKING S, BODE H, DAVID CN, FLICK K, HANSMANN G, SCHALLER H, TREKNER E. 1972. Regeneration of *Hydra* from reaggregated cells. *Nature New Biology*. **27**:98-101.
- GIESY JP, PIERENS SL, SNYDER EM, MILES-RICHARDSON S, KRAMER VJ, SNYDER SA, NICHOLS KM, VILLENEUVE DA. 2000. Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology & Chemistry*. **19**(5):1368-1377.
- GOMEZ E, PILLON A, FENET H, ROSAIN D, DUCHESNE MJ, NICOLAS JC, BALAGUER P, CASELLAS C. 2005. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines; parabens, UV screens, and musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. **68**(4):239-251.
- GRAFF L, ISNARD P, CELLIER P, BASTIDE J, CAMBON JP, NARBONNE JF, BUDZINSKI H, VASSEUR P. 2003. Toxicity of chemicals to microalgae in river and in standard waters. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **22**:1368-1379.
- GRAY MA, METCALFE CD. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oyzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **16**(5):1082-1086.
- GREBER MJ, DAVID CN, HOLSTEIN TW. 1992. A quantitative method for separation of living *Hydra* cells. *Roux's Archives of Developmental Biology*. **201**:296-300.
- GRENS A, MASON E, MARSH JL, BODE HR. 1995. Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the *Hydra achaete-scute* homolog has proneural activity in *Drosophila*. *Development*. **121**:4027-4035.
- GRENS A, GEE L, FISCHER DA, BODE HR. 1996. *CnNK-2*, an NK-2 Homeobox gene, has a role in patterning the basal end of the axis in *Hydra*. *Developmental Biology*. **180**:473-488.
- GRENS A, SHIMIZU H, HOFFMEISTER SAH, BODE HR, FUJISAWA T. 1999. The novel signal peptides, Pedibin and Hym-346, lower positional value thereby enhancing foot formation in *hydra*. *Development*. **126**:517-524.

- HAGER G, DAVID CN. 1997. Pattern of differentiated nerve cells in *Hydra* is determined by precursor migration. *Development*. **124**:569-576.
- HALLING-SORENSEN B, NIELSEN SN, LANZKY PF, INGERSLEV F, HOLTEN LÜTZHOFT HC, JORGENSEN SE. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere*. **36**:357-393.
- HAM RG, EAKIN RE. 1958. Loss of regenerative capacity in *Hydra* treated with lipoic acid. *Journal of Experimental Zoology*. **139**:55-68.
- HANSEN GN, WILLIAMSON M, GRIMMELIKHUIJZEN CJP. 2000. Two-color double-labeling in situ hybridization of whole-mount *Hydra* using RNA probes for five different *Hydra* neuropeptide preprohormones : evidence for colocalization. *Cell and Tissue Research*. **301**:245-253.
- HARAFUJI N, TAKAHASHI T, HATTA M, TEZUKA H, MORISHITA F, MATSUSHIMA O, FUJISAWA T. 2001. Enhancement of foot formation in *Hydra* by a novel epitheliopeptide, Hym-323. *Development*. **128**:437-446.
- HARVILICZ H. 1999. NPE demand remains strong despite environmental concerns in Europe. Chemical Market Reporter. October 18. pp15
- HASSEL M, BRIDGE DM, STOVER NA, KLEINHOLZ H, STEELE RE. 1998. The level of expression of a protein kinase C gene may be an important component of the patterning process in *Hydra*. *Development Genes and Evolution*. **207**:502-214.
- HECHT S, BOESE BL. 2002. Sensitivity of an infaunal amphipod, *Eohaustorius estuaries*, to acute waterborne exposures of 4-nonylphenol: evidence of a toxic hangover. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **21**(4):816-819.
- HELCOM. 2002. Draft guidance document on nonylphenol/nonylphenol ethoxylates (NP/NPE). Final Project Report. Helsinki Commission. Baltic Marine Environment Protection Commission
- HENRY TB, KWON JW, ARMBRUST KL, BLACK MC. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **23**(9):2229-2233.
- HENSCHKE KP, WENZEL A, DIEDRICH M, FLIEDNER A. 1997. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. **25**:220-225.
- HEROLD M, CIKALA M, MAC WILLIAMS H, DAVID CN, BOTTGER A. 2002. Cloning and characterisation of PKB and PRK homologs from *Hydra* and the evolution of the protein kinase family. *Developmental Genes Evolution*. **212**:513-519.
- HILL M, STABILE C, STEFFEN LK, HILL A. 2002. Toxic effects of endocrine disrupters on freshwater sponges: common developmental abnormalities. *Environmental Pollution*. **117**:295-300.
- HIRANO M, ISHIBASHI H, MATSUMURA N, NAGAO Y, WATANABE N, WATANABE A, ONIKURA N, KISHI K, ARIZONO K. 2004. Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *Journal of Health Science*. **50**(1):97-100.
- HIRSCH R, TERNES T, HABERER K, KRATZ K-L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment*. **225**:109-118.
- HOBMAYER B, HOLSTEIN TW, DAVID CN. 1997. Stimulation of tentacle and bud formation by the neuropeptide Head Activator in *Hydra magnipapillata*. *Developmental Biology*. **183**:1-8.
- HOBMAYER B, SNYDER P, ALT D, HAPPEL CM, HOLSTEIN TW. 2001. Quantitative analysis of epithelial cell aggregation in the simple metazoan *Hydra* reveals a switch from homotypic to heterotypic cell interactions. *Cell and Tissue Research*. **304**:147-157.

- HOFFMEISTER SAH. 1996. Isolation and characterization of two new morphogenetically active peptides from *Hydra vulgaris*. *Development*. **122**:1941-1948.
- HOFFMEISTER-ULLERICH SAH. 2001. The foot formation stimulating peptide pedibin is also involved in patterning of the head in *Hydra*. *Mechanisms of Development*. **106**:37-45.
- HOLDWAY DA, LOK K, SEMAAN M. 2001. The acute and chronic toxicity of cadmium and zinc to two *Hydra* species. *Environmental Toxicology*. **16**:557-565.
- HOLDWAY DA. 2005. *Hydra* population reproduction toxicity test method. In Blaise C, Férard JF, eds, Vol 1 – Toxicity Test Methods. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp 502-522.
- HOLSTEIN TW, HOBMAYER E, DAVID CN. 1991. Pattern of epithelial cell cycling in *Hydra*. *Developmental Biology*. **148**(2):602-611.
- HONEGGER TG, ZÜRRER D, TARDENT P. 1989. Oogenesis in *Hydra carnea*: a new model based on light and electron microscopic analyses of oocyte and nurse cell differentiation. *Tissue and Cell*. **21**(3):381-393.
- HUGHES PJ, MCLELLAN H, LOWES DA, ZAFAR KHAN S, BILMEN JG, TOVEY SC, GODFREY RE, MICHELL RH, KIRK CJ, MICHELANGELO F. 2000. Estrogenic alkylphenols induce cell death by inhibiting testis endoplasmic reticulum Ca^{2+} pumps. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **277**:568-574.
- HUGGETT DB, BROOKS BW, PETERSON B, FORAN CM, SCHLENK D. 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **43**:229-235.
- INOUE A, MURANAKA S, FUJITA H, KANNO T, TAMAI H, UTSUMI K. 2004. Molecular mechanism of diclofenac-induced apoptosis of promyelocytic leukemia: dependency on reactive oxygen species, akt, bid, cytochrome c, and caspase pathway. *Free Radical Biology & Medicine*. **37**(8):1290-1299.
- JACOBSON MD, WEIL M, RAFF MC. 1997. Programmed cell death in animal development. *Cell*. **88**(3):347-354.
- JAVOIS LC, BESSETTE DR. 1996. The dynamics of head activation changes during proportioning in *Hydra oligactis* with altered head-body ratios. *Developmental Biology*. **177**:323-331.
- JOBLING S, SHEAHAN D, OSBORNE JA, MATTHIESSEN P, SUMPTER JP. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **15**(2):194-202.
- JOHANSON G. 1999. Criteria document for Swedish occupational standards. Ethylene glycol monomethyl ether and ethylene glycol monomethyl ether acetate. National Institute for Working Life & authors, Stockholm Sweden.
- JOHNSON EM, GORMAN RM, GABEL BEG, GEORGE ME. 1982. The *Hydra attenuata* system for detection of teratogenic hazards. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. **2**:263-276.
- JOHNSON EM, GABEL BEG. 1983. An artificial “embryo” for detection of abnormal developmental biology. *Fundamental and Applied Toxicology*. **3**:243-249.
- JOHNSON EM. 1983. Practical application of systems for rapid detection of potential teratogenic hazards. *Advances in Modern Environmental Toxicology*. **3**:77-91.
- JOHNSON EM, GABEL BE, LARSON J. 1984. Developmental toxicity and structure/activity correlates of glycols and glycol ethers. *Environmental Health Perspectives*. **57**:135-139.
- JOHNSON EM, CHRISTIAN MS, DANSKY L, GABEL BEG. 1987. Use of the adult developmental relationship in prescreening for developmental hazards. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. **7**:273-285.

- JOHNSON EM, NEWMAN LM, GABEL BEG, BVERNER TF, DANSKY LA. 1988. An analysis of the *Hydra* assay's applicability and reliability as a developmental toxicity prescreen. *Journal of the American College of Toxicology*. **7**(2):111-126.
- JOHNSON EM. 1998. Utility and practical considerations for *in vitro* developmental toxicity testing: *Hydra* and FETAX assays. In: Microscale testing in aquatic toxicology. Advances, techniques, and practice. Eds Wells PG, Lee K, Blaise C. CRC Press. 679p.
- JOLIBOIS B, GUERBET M, VASSAL S. 2003. Detection of hospital wastewater genotoxicity with the SOS chromotest and Ames fluctuation test. *Chemosphere*. **51**:539-543.
- JOLIBOIS B, GUERBET M. 2005. Evaluation of industrial, hospital and domestic wastewater genotoxicity with the Salmonella fluctuation test and the SOS chromotest. *Mutation Research*. **565**:151-162.
- KAHL MD, MAKYNEN EA, KOSIAN PA, ANKLEY GT. 1997. Toxicity of 4-nonylphenol in a life-cycle test with the midge *Chironomus tentans*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **38**:155-160.
- KALAFATIC M, ZNIDARIC D, LUI A, WRISCHER M. 1991. Effect of insecticides (Dimiline WP 25, Torak EC 24 and Gamacide 20) on hydra (*Hydra vulgaris* Pallas). *The International Journal of Developmental Biology*. **35**:335-340.
- KALAFATIC M. 1997. Regeneration and asexual reproduction of *Hydra oligactis* treated with different pesticides. *Biologia*. **52**(3):475-480.
- KARNTANUT W, PASCOE D. 2000. A comparison of methods for measuring acute toxicity to *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*. **41**:1543-1548.
- KARNTANUT W, PASCOE D. 2002. The toxicity of copper, cadmium and zinc to four different *Hydra* (Cnidaria: Hydrozoa). *Chemosphere*. **47**:1059-1064.
- KASAHARA S, BOSCH TCG. 2003. Enhanced antibacterial activity in *Hydra* polyps lacking nerve cells. *Developmental and Comparative Immunology*. **27**:79-85.
- KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. **26**:239-257.
- KHAN SZ, KIRK CJ, MICHELANGELI F. 2003. Alkylphenol endocrine disrupters inhibit IP₃-sensitive Ca²⁺ channels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **310**:261-266.
- KIM K-S, YOON J-H, KIM JK, BAEK SJ, ELING TE, LEE WJ, RYU J-H, LEE JG, LEE J-H, YOO J-B. 2004. Cyclooxygenase inhibitors induce apoptosis in oral cavity cancer cells by increased expression of nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **325**:1298-1303.
- KISHIMOTO Y, MURATE M, SUGIYAMA T. 1996. *Hydra* regeneration from recombined ectodermal and endodermal tissues. I. Epibolic ectodermal spreading is driven by cell intercalation. *Journal of Cell Science*. **109**:763-772.
- KOLPIN DW, FURLONG ET, MEYER MT, THURMAN EM, ZAUGG SD, BARBER LB, BUXTON HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology*. **36**(6): 1202-1211.
- KOLPIN DW, SKOPEC M, MEYER MT, FURLONG ET, ZAUGG SD. 2004. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *The Science of the Total Environment*. **328**:119-130.
- KOPF W. 1997. Wirkung endokriner stoffe in biotest mit wasserorganismen. In:Stoffe mit endokriner wirkung in wasser, Bayerisches landesamt für wasserwirtschaft, Institut für Wasserforschung, Munich (Allemagne), Oldenbourg (cité dans EU RAR, 2002).

- KOSTROUCH Z, KOSTROUCHOVA M, LOVE W, JANNINI E, PIATIGORSKY J, RALL JE. 1998. Retinoic acid X receptor in the diploblast, *Tripedalia cystophora*. *Biochemistry*. **95**:13442-13447.
- KOUTSOUBA V, HEBERER T, FUHRMANN B, SCHMIDT-BAUMLER K, TSIPI D, HISKIA A. 2003. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*. **51**:69-75.
- KROIHER M, REIDLING JC, STEELE RE. 2000. A gene whose major transcript encodes only the substrate-binding domain of a protein-tyrosine kinase. *Gene*. **241**:317-324.
- KROIHER M, MILLER MA, STEELE RE. 2001. Deceiving appearances: signaling by “dead” and “fractured” receptor protein-tyrosine kinases. *Bioessays*. **23**:69-76.
- KUDO C, WADA K, MASUDA T, YONEMURA T, SHIBUYA A, FUJIMOTO Y, NAKAJIMA A, NIWA H, KAMISAKI Y. 2004. Nonylphenol induces the death of neural stem cells due to activation of the caspase cascade and regulation of the cell cycle. *Journal of Neurochemistry*. **88**:1416-1423.
- KUMPFMÜLLER G, RYBAKINE V, TAKAHASHI T, FUJISAWA T, BOSCH TCG. 1999. Identification of an astacin matrix metalloprotease as target gene for *Hydra* foot activator peptides. *Development Genes and Evolution*. **209**:601-607.
- KUZNETSOV S, LYANGUZOWA M, BOSCH TCG. 2001. Role of epithelial cells and programmed cell death in *Hydra* spermatogenesis. *Zoology*. **104**:25-31.
- KUZNETSOV SG, ANTON-ERXLEBEN F, BOSCH TCG. 2002. Epithelial interactions in *Hydra*: apoptosis interspecies grafts is induced by detachment from the extracellular matrix. *The Journal of Experimental Biology*. **205**:3809-3817.
- KUZNETSOV SG, BOSCH TCG. 2003. Self/nonself recognition in Cnidarian: contact to allogeneic tissue does not result in elimination of nonself cells in *Hydra vulgaris*. *Zoology*. **106**:109-116.
- KWAK H-I, BAE M-O, LEE M-H, LEE Y-S, LEE B-J, KANG K-S, CHAE C-H, SUNG H-J, SHIN J-S, KIM J-H, MAR W-C. 2001. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology & Chemistry*. **20**(4):787-795
- LAFONT R. 2000. The endocrinology of invertebrates. *Ecotoxicology*. **9**(1-2):41-57.
- LAHNSTEINER F, BERGER B, GRUBINGER F, WEISMANN T. 2005. The effects of 4-nonylphenol on semen quality, viability of gametes, fertilization success, and embryo and larvae survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*. **71**:297-306.
- LAVILLE N, AÏT-AÏSSA S, GOMEZ E, CASELLAS C, PORCHER JM. 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*. **196**:41-55.
- LeBLANC GA, MU X, RIDER CV. 2000. Embryotoxicity of alkylphenol degradation product 4-nonylphenol to the crustacean *Daphnia magna*. *Environmental Health Perspectives*. **108**:1133-1138.
- LI MH, WANG ZR. 2005. Effect of nonylphenol on plasma vitellogenin of male adult guppies (*Poecilia reticulata*). *Environmental Toxicology*. **20**:53-59.
- LIBER K, GANGL JA, CORRY TD, HEINIS LJ, STAY FS. 1999. Lethality and bioaccumulation of 4-nonylphenol in bluegill sunfish in littoral enclosures. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **18**(3):394-400.
- LOHMANN JU, ENDL I, BOSCH TCG. 1999. Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Developmental Biology*. **214**:211-214.
- LOHMANN I, MCGINNIS N, BODMER M, MCGINNIS W. 2002. The *Drosophila* Hox gene *Deformed* sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell*. **110**:457-466.

- LÖWENHEIM H. 2003. Regenerative medicine for diseases of the head and neck: principles of in vivo regeneration. *DNA and Cell Biology*. **22**(9):571-592.
- LUM KT, HUEBNER HJ, LI Y, PHILLIPS TD, RAUSHEL FM. 2003. Organophosphate nerve agent toxicity in *Hydra attenuata*. *Chemical Research in Toxicology*. **16**:953-957.
- LYON MK, KASS-SIMON G, HUFNAGEL LA. 1982. Ultrastructural analysis of nematocyte removal in *Hydra*. *Tissue and Cell*. **14**(3): 415-424.
- MADEN M. 1998. Retinoids as endogenous components of the regenerating limb and tail. *Wound Repair and Regeneration*. **6**:358-365.
- MADEN M. 2000. The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development. *Proceedings of the Nutrition Society*. **59**:65-73.
- MALI B, FRANK U. 2004. Hydroid TNF-receptor-associated factor (TRAF) and its splice variant: a role in development. *Molecular Immunology*. **41**:377-384.
- MARATHE MR, THOMAS GP. 1990. Current status of animal testing in reproductive toxicology. *Indian Journal of Pharmacology*. **22**:192-201.
- MARTINEZ DE, DIRKSEN M-L, BODE PM, JAMRICH M, STEELE RE, BODE H.R. 1997. *Budhead*, a fork Head/HNF-3 homologue, is expressed during axis formation and head specification in *Hydra*. *Developmental Biology*. **192**:523-536.
- MARTINEZ DE. 1998. Mortality patterns suggest lack of senescence in *Hydra*. *Experimental Gerontology*. **33**(3):217-225.
- MATOZZO V, DEPIERI M, MOSCHINO V, MARIN MG. 2003. Evaluation of 4-nonylphenol toxicity in the clam *Tapes philippinarum*. *Environmental Research*. **91**:179-185.
- McAVOY DC, SCHATOWITZ B, JACOB M, HAUKE A, ECKHOFF WS. 2002. Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **21**(7):1323-1329.
- MEINHARDT H, GIERER A. 2000. Pattern formation by local self-activation and lateral inhibition. *Bioessays*. **22**:753-760.
- MILAM CD, FARRIS JL, DWYER FJ, HARDESTY DK. 2005. Acute toxicity of six freshwater mussel species (glochidia) to six chemicals: implications for *Daphnids* and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (unionidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **48**:166-173.
- MILLER MA, TECHNAU U, SMITH KM, STEELE RE. 2000. Oocyte development in *Hydra* involves selection from competent precursor cells. *Developmental Biology*. **224**:326-338.
- MINOBE S, FEI K, YAN L, SARRAS MPJr, WERLE MJ. 2000. Identification and characterization of the epithelial polarity receptor "Frizzled" in *Hydra vulgaris*. *Development Genes and Evolution*. **210**:258-262.
- MIRE P, VENABLE S. 1999. Programmed cell death during longitudinal fission in a sea anemone. *Invertebrate Biology*. **118**:319-331.
- MITCHELL FM, HOLDWAY DA. 2000. The acute and chronic toxicity of the dispersants corexit 9527 and 9500, water accommodated fraction (WAF) of crude oil, and dispersant enhanced WAF (DEWAF) to *Hydra viridissima* (green *Hydra*). *Water Research*. **34**(1):343-348.
- MÜLLER WA. 1989. Diacylglycerol-induced multihead formation in *Hydra*. *Development*. **105**:309-316.
- MÜLLER WA. 1995a. Competition for factors and cellular resources as a principle of pattern formation in *Hydra*. I. Increase of the potentials for head and bud formation and rescue of the regeneration-deficient mutant *reg-16* by treatment with diacylglycerol and arachidonic acid. *Developmental Biology*. **167**:159-174.

- MÜLLER WA. 1995b. Competition for factors and cellular resources as a principle of pattern formation in *Hydra*. II. Assistance of foot formation by heads and buds and a new model of pattern control. *Developmental Biology*. **167**:175-189.
- MÜLLER WA. 1996a. Competition-based head versus foot decision in chimeric *Hydras*. *The International Journal of Developmental Biology*. **40**:1133-1139.
- MÜLLER WA. 1996b. Pattern formation in the immortal *Hydra*. *Trends in Genetics*. **12**(3):91-96.
- MÜLLER WA, BARTSCH C, BARTSCH H, MAIDONIS I, BAYER E. 1998. Low-molecular-weight hormonal factors that affect head formation in *Hydra*. *The International Journal of Developmental Biology*. **42**:825-828.
- MULLER S, SCHLATTER C. 1998. Oestrogenic potency of nonylphenol *in vivo*-a case study to evaluate the relevance of human non-occupational exposure. *Pure & Applied Chemistry*. **70**(9):1847-1853.
- MULTIGNER L, CATALA M, CORDIER S, DELAFORGE M, FENAUX P, GARNIER R, RICO-LATTES I, VASSEUR P. 2005. The INSERM expert review on glycol ethers: findings and recommendations. *Toxicology Letters*. **156**: 29-37.
- NEGISHI T, ISHII Y, KYUWA S, KURODA Y, YOSHIKAWA Y. 2003. Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience Letters*. **353**:99-102.
- NICE HE, THORNDYKE MC, MORRITT D, STEELE S, CRANE M. 2000. Development of *Crassostrea gigas* larvae is affected by 4-nonylphenol. *Marine Pollution Bulletin*. **40**(6):491-496.
- NORBERG-KING TJ. 1993. A linear interpolation method for sublethal toxicity: The inhibition concentration (ICp) approach. Ver 2.0. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 03-93. Environmental Research Laboratory, Duluth, MN, USA.
- OCDE. 1981. Alga growth inhibition test. In: Chemicals inspection and testing institute (ed) OECD guidelines for testing of chemicals.
- OCDE. 2004. Draft guidance document on reproductive toxicity testing and assessment. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment, N°43. Environment Directorate, Organisation for Economic Cooperation and Development, November 10.
- OEHLMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U. 2003. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure and Applied Chemistry*. **75**(11-12):2207-2218.
- OETKEN M, BACMANN J, SCHULTE-OEHLMANN U, OEHLMANN J. 2004. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. *International Review of Cytology*. **236**:1-44.
- OETKEN M, NENTWIG G, LÖFFLER D, TERNES T, OEHLMANN J. 2005. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **49**:353-361.
- O'HALLORAN S, LIBER K, GANGL JA, KNUTH ML. 1999. Effects of repeated exposure to 4-nonylphenol on the zooplankton community in littoral enclosures. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **18**(3):376-385.
- OKUMURA Y, KOYAMA J, TAKAKU H, SATOH H. 2001. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **41**:123-128.
- ORVOS DR, VERSTEEG DJ, INAUEN J, CAPDEVIELLE M, ROTHENSTEIN A, CUNNINGHAM V. 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **21**(7):1338-1349.
- OTTO JJ, CAMPBELL RD. 1977. Tissue economics of *hydra*: regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *Journal of Cell Science*. **28**:117-132.

- PACHURA S, CAMBON J-P, BLAISE C, VASSEUR P. 2005. 4-Nonylphenol induced toxicity and apoptosis in *Hydra attenuata*. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **24**(12): in Press.
- PARCOM. 1992. PARCOM recommendation 92/8 on nonylphenol-ethoxylates, OSPAR Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic, OSPAR Commission, London, 1p.
- PARDOS M, BENNINGHOFF C, GUEGUEN C, THOMAS R, DOBROWOLSKI J, DOMINIK J. 1999. Acute toxicity assessment of Polish (waste)water with a microplate-based *Hydra attenuata* assay: a comparison with the Microtox® test. *The Science of the Total Environment*. **243/244**:141-148.
- PASCOE D, CARROLL K, KARNTANUT W, WATTS MM. 2002. Toxicity of 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A to the freshwater cnidarian *Hydra vulgaris*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **43**:56-63.
- PASCOE D, KARNTANUT W, MULLER CT. 2003. Do pharmaceuticals affect freshwater invertebrates? A study with the cnidarian *Hydra vulgaris*. *Chemosphere*. **51**:521-528.
- PAULY B, STIENING B, SCHADE M, ALEXANDROVA O, ZOUBEK R, DAVID CN, BOTTGER A. 2003. Molecular cloning and cellular distribution of two 14-3-3 isoforms from *Hydra*: 14-3-3 proteins respond to starvation and bind to phosphorylated targets. *Experimental Cell Research*. **285**:15-26.
- PAYNE J, RAJAPAKSE N, WILKINS M, KORTENKAMP A. 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environmental Health Perspectives*. **108**:983-987.
- PICA-GRANADOS Y, TRUJILLO GD, HERNANDEZ HS. 2000. Bioassay standardization for water quality monitoring in Mexico. *Environmental Toxicology*. **15**:322-330.
- POLLINO C, HOLDWAY DA. 1999. Potential of two *Hydra* species as standard toxicity test animals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **43**:309-316.
- PORTER AG, JÄNICKE RU. 1999. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death & Differentiation*. **6**:99-104.
- PRESTON BL, SNELL TW, ROBERTSON TL, DINGMANN BJ. 2000. Use of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* in screening assay for potential endocrine disruptors. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **19**(12):2923-2928
- QUINIOU F, ALZIEU C. 1999. L'analyse des risques chimiques appliquées aux dragages. In : Alzieu C. Dragages et environnement marin: État des connaissances. eds. Ifremer. Plouzané, France, p127-147.
- RADIX P, SEVERIN G, SCHRAMM KW, KETTRUP A. 2002. Reproduction disturbances of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) for the screening of environmental endocrine disrupters. *Chemosphere*. **47**:1097-1101.
- REIDLING JC, MILLER MA, STEELE RE. 2000. Sweet Tooth, a novel receptor protein-tyrosine kinase with C-type lectin-like extracellular domains. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**(14):10323-10330.
- RENTZSH F, HOBMAYER B, HOLSTEIN TW. 2005. Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in *Hydra* gametogenesis. *Developmental Biology*. **278**:1-12.
- ROBERTSON JD, ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B. 2000. Review: Nuclear events in apoptosis. *Journal of Structural Biology*. **129**:346-358.
- RONCO A, SOBRERO C, GRASSL V, KAMINSKI L, MASSOLO L, MINA L. 2000. WaterTox Bioassay intercalibration network: results from Argentina. *Environmental Toxicology*. **15**:287-296.
- ROUTLEDGE EJ, SUMPTER JP. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry*. **272**(6):3280-3288.
- SABOURIN TD, FAULK RT, GOSS LB. 1985. The efficacy of three non-mammalian test systems in the identification of chemical teratogens. *Journal of Applied Toxicology*. **5**(4):227-233.

- SABIK H, GAGNÉ F, BLAISE C, MARCOGLIESE DJ, JEANNOT R. 2003. Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere*. **51**:349-356.
- SAKAZAKI H, UENO H, NAKAMURO K. 2002. Estrogen receptor alpha in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicology Letters*. **133**:221-229.
- SARKAR SA, SHARMA RP. 2002. Expression of c-Myc and other apoptosis-related genes in Swiss Webster mouse fetuses after maternal exposure to all *trans*-retinoic acid. *Reproductive Toxicology*. **16**:245-252.
- SARRAS MP Jr, ZHANG X, HUFF JK, ACCAVITTI MA, ST. JOHN PL, ABRAHAMSON DR. 1993. Extracellular matrix (mesoglea) of *Hydra vulgaris*. III. Formation and function during morphogenesis of *Hydra* cell aggregates. *Developmental Biology*. **157**:388-398.
- SARRAS MPJr, YAN L, GRENS A, ZHANG X, AGBAS A, HUFF JK, St.JOHN PL, ABRAHAMSON DR. 1994. Cloning and biological function of laminin in *Hydra vulgaris*. *Developmental Biology*. **164**:312-324.
- SCHEURLIN I, HOFFMEISTER SAH, SCHALLER HC. 1996. Presence and expression of G2 cyclins in the coelenterate *Hydra*. *Journal of Cell Science*. **109**:1063-1069.
- SCHILIRO DM, FORMAN BJ, JAVOIS LC. 1999. Interactions between the foot and bud patterning systems in *Hydra vulgaris*. *Developmental Biology*. **209**:399-408.
- SCHMID V, ONO SI, REBER-MULLER S. 1999. Cell-substrate interactions in Cnidaria. *Microscopy Research and Technique*. **44**:254-268.
- SCHMUDE KL, LIBER K, CORRY TD, STAY FS. 1999. Effects of 4-nonylphenol on benthic macroinvertebrates and insect emergence in littoral enclosures. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **18**(3):386-393.
- SCHWARTZ SS, HANN BJ, HEBERT PDN. 1983. The feeding ecology of *Hydra* and possible implications in the structuring of zooplankton communities. *The Biological Bulletin*. **164**:136-142
- SEIPP S, SCHMICH J, LEITZ T. 2001. Apoptosis – A death-inducing mechanism tightly linked with morphogenesis in *Hydractinia echinata* (Cnidaria, Hydrozoa). *Development*. **128**:4891-4898.
- SEGNER H, CAROLL K, FENSKE M, JANSSEN CR, MAACK G, PASCOE D, SCHAFERS C, VANDENBERGH GF, WATTS M, WENZEL A. 2003. Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **54**(3):302-314.
- SERVOS MR, MAGUIRE RJ, BENNIE DT, LEE HB, CURETON PM, DAVIDSON N, SUTCLIFFE R, RAWN DFK. 2003. An ecological risk assessment of nonylphenol and its ethoxylates in the aquatic environment. *Human and Ecological Risk Assessment*. **9**:569-587.
- SERVOS MR, BENNIE DT, BURNISON BK, JURKOVIC A, McINNIS R, NEHELI T, SCHNELL A, SETO P, SMYTH SA, TERNES TA. 2005. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. *The Science of the Total Environment*. **336**:155-170.
- SETZER RW, ROGERS JM. 1991. Assessing developmental hazard: the reability of the A/D ratio. *Teratology*. **46**(2):103-107.
- SHENK MA, GEE L, STEELE RE, BODE HR. 1993a. Expression of *Cnox-2*, a HOM/HOX gene, is suppressed during head formation in *Hydra*. *Developmental Biology*. **160**:108-118.
- SHENK M.A, BODE HR, STEELE RE. 1993b. Expression of *Cnox-2*, a HOM/HOX homeobox gene in *Hydra*, is correlated with axial pattern formation. *Development*. **117**:657-667.

- SHIMIZU H, SUGIYAMA T. 1993. Suppression of head regeneration by accelerated wound healing in *Hydra*. *Developmental Biology*. **160**:504-511.
- SHIMIZU H, SAWADA Y, SUGIYAMA T. 1993. Minimum tissue size required for *Hydra* regeneration. *Developmental Biology*. **155**:287-296.
- SHIMIZU H, BODE HR. 1995. Nematocyte differentiation in *Hydra*: commitment to nematocyte type occurs at the beginning of the pathway. *Developmental Biology*. **169**:136-150.
- SHIMIZU H. 2002. Feeding and wounding responses in *Hydra* suggest functional and structural polarization of the tentacle nervous system. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*. **131**:669-674.
- SHOSTAK S, ADAMS J. 1975. Morphogenetic gradients in multiple-graft *Hydra viridis*. I. The effects of colcemid and colchicine. *The Journal of Experimental Zoology*. **192**(1):43-56.
- SHOSTAK S. 1978. Tentacle number in cultured *Hydra viridis*. *The Biological Bulletin*. **155**:220-234.
- SHOSTAK S. 1979. Digestive cell and tentacle number in freshly detached buds of *Hydra viridis*. *International Journal of Invertebrate Reproduction*. **1**:167-178.
- SHOSTAK S. 1993. Cnidaria. In Reproductive biology of invertebrates (KG Adiyodi and RG Adiyodi, eds), Vol VI, Part A, Asexual propagation and reproductive strategies, pp 45-105. John Wiley, Chichester.
- SHOSTAK S. 2002. Cnidaria (Coelenterates). In: Encyclopedia of Life Science.
- SHURIN JB, DODSON SI. 1997. Sublethal toxic effects of cyanobacteria and nonylphenol on environmental sex determination and development in *Daphnia*. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **16**(6):1269-1276.
- SCHMID V, ONO SI, REBER-MULLER S. 1999. Cell-substrate interactions in Cnidaria. *Microscopy Research and Technique*. **44**:254-268.
- SMITH KM, GEE L, BLITZ IL, BODE HR. 1999. *CnOtx*, a member of the *Otx* gene family, has a role in cell movement in *Hydra*. *Developmental Biology*. **212**:392-404.
- SMITH KM, GEE L, BODE HR. 2000. *HyAlx*, an *aristaless*-related gene, is involved in tentacle formation in *Hydra*. *Development*. **127**:4743-4752.
- SMITH GD, WILBURN C, MCCARTHY RA. 2003. Methoprene photolytic compounds disrupt zebrafish development, producing phenocopies of mutants in the sonic hedgehog signalling pathway. *Marine Biotechnology*. **5**:201-212.
- SOHONI P, SUMPTER JP. 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology*. **158**:327-339.
- SONNENSCHN C, SOTO AM. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. **65**(1-6):143-150.
- SORENSEN TS, HOLMSTRUP M. 2005. A comparative analysis of the toxicity of eight common soil contaminants and their effects on drought tolerance in the collembolan *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **60**:132-139.
- STAKAHASHI T, MUNEOKA Y, LOHMANN J, LOPEZ DE HARO MS, SOLLEDER G, BOSCH TCG, DAVID CN, BODE HR, KOIZUMI O, SHIMIZU H, HATTA M, FUJISAWA SUGIYAMA T. 1997. Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in *Hydra*: LWamide and PWfamilies. *Developmental Biology*. **94**:1241-1246.
- STAPLES CA, WEEKS J, HALL JF, NAYLO CG. 1998. Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates. *Environmental Toxicology & Chemistry*. **17**(12): 2470-2480.

- STEELE RE. 2002. Developmental signaling in *Hydra* : what does it take to build a “simple” animal?. *Developmental Biology*. **248**:199-219.
- STEPHAN CE, MOUNT DI, HANSEN DJ, GENTILE JH, CHAPMAN GA, BRUNGS WA. 1985. Guidelines for deriving numerical National Water Quality Criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. PB85-227049. National Technical Information Service, Springfield, VA, USA.
- STIDWILL RP, CHRISTEN M. 1998. Alteration of fibronectin affinity during differentiation modulates the in vitro migration velocities of *Hydra* nematocytes. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. **41**:68-73.
- STURTEVANT FM, RUTHMANN RP, TURNER CL. 1951. Effect of colchicine on regeneration in *Pelmatohydra oligactis*. *Science*. **114**:241-242.
- SUGIYAMA T. 1994. Spontaneous loss of interstitial stem cells from *Hydra* tissue. *Developmental Biology*. **163**:302-308.
- TADDEI-FERRETTI C, MUSIO C. 2000. Photobehaviour of *Hydra* (Cnidaria, Hydrozoa) and correlated mechanisms: a case of extraocular photosensitivity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **55**:88-101.
- TAKAHASHI T., MUNEOKA Y., LOHMANN J., LOPEZ DE HARO M.S., SOLLEDER G., BOSCH T.C.G., DAVID C.N., BODE H.R., KOIZUMI O., SHIMIZU H, HATTA M, FUJISAWA T, SUGIYAMA T. 1997. Systematic isolation of peptide signal molecules regulating development in *Hydra*: LWamide and PWfamilies. *Developmental Biology*. **94**:1241-1246.
- TAKAHASHI T, KOIZUMI O, ARIURU Y, ROMANOVITCH A, BOSCH TCG, KOBAYAKAWA Y, MOHRI S, BODE HR, YUM S, HATTA M, FUJISAWA T. 2000. A novel neuropeptide, Hym-355, positively regulates neuron differentiation in *Hydra*. *Development*. **127**:997-1005.
- TAKAKU Y, HARIYAMA T, KURACHI M, TSUKAHARA Y. 1999. Ultrastructural observations of adherent cell pairs in *Hydra vulgaris*. *The Journal of Experimental Biology*. **202**:2239-2244.
- TAKAKU Y, HARIYAMA T, TSUKAHARA Y. 2000. Initial homotypic cell pair adhesion in regenerating *Hydra* facilitates subsequent adhesion of homotypic cells. *Naturwissenschaften*. **87**:177-179.
- TAKAKU Y, HARIYAMA T, FUJISAWA T. 2005. Motility of endodermal epithelial cells plays a major role in reorganizing the two epithelial layers in *Hydra*. *Mechanisms of Development*. **122**:109-122.
- TALORETE TPN, ISODA H, MAEKAWA T. 2001. Alkylphenolic compounds and their effect on the injury rate, survival and acetylcholinesterase activity of the rat neuronal cell line PC12. *Cytotechnology*. **36**:163-169.
- TAMMARIELLO RV. 1969. The action of colcemid in causing bud retention in *Hydra viridis*. PhD. Thesis in Biology, University of Pittsburgh, Pittsburgh.
- TANAKA Y, NAKANISHI J. 2002. Chronic effects of *p*-nonylphenol on survival and reproduction of *Daphnia galeata*: multigenerational life table experiment. *Environmental Toxicology*. **17**:487-492.
- TECHNAU U, HOLSTEIN WT. 1996. Phenotypic maturation of neurons and continuous precursor migration in the formation of the peduncle nerve net in *Hydra*. *Developmental Biology*. **177**:599-615.
- TECHNAU U, BODE HR. 1999. *HyBra1*, a *Brachyury* homologue, acts during head formation in *Hydra*. *Development*. **126**:999-1010.
- TECHNAU U, MILLER MA, BRIGE D, STEELE RE. 2003. Arrested apoptosis of nurse cells during *Hydra* oogenesis and embryogenesis. *Developmental Biology*. **260**(1):191-206.
- TEPSUPORN S, KALTENBACH JC, KUHNS WJ, BURGER MM, FERNANDEZ-BUSQUETS X. 2003. Apoptosis in *Microciona prolifera* allografts. *The Biological Bulletin*. **205**:199-201

- TERAGAWA CK, BODE HR. 1995. Migrating interstitial cells differentiate into neurons in *Hydra*. *Developmental Biology*. **171**:286-293.
- TERNES TA. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. **32**:3245-3260.
- TGD. 1996. Technical Guidance Document on Risk Assessment. In support of: Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II. Institute for Health and Consumer Protection, European chemicals bureau, United Kingdom.
- THOMSEN S, TILL A, WITTLIEB J, BEETZ C, KHALTURIN K, BOSCH TCG. 2004. Control of foot differentiation in *Hydra*: in vitro evidence that the NK-2 homeobox factor *CnNK-2* autoregulates its own expression and uses pÉdibine as target gene. *Mechanisms of Development*. **121**:195-204.
- THORNBERRY NA. 1998. Caspases: key mediators of apoptosis. *Chemistry & Biology*. **5**:97-103.
- THORPE KL, HUTCHINSON TH, HETHERIDGE MJ, SUMPTER JP, TYLER CR. 2000. Development of an in vivo screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology & Chemistry*. **19**(11):2812-2820.
- TIXIER C, SINGER HP, OELLERS S, MÜLLER SR. 2003. occurrence and fate of carbamazepine, clofibrac acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental Science & Technology*. **37**(6):1061-1068.
- TOLLEFSEN KE, MATHISEN R, STENERSEN J. 2002. Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*. **126**:14-22.
- TROTTIER S. 1996. Mise au point d'un test de dépistage des effets toxiques létaux et sublÉtaux (tÉratogÉnicité) avec le coelentÉré d'eau douce *Hydra attenuata*, Rapport ST-32, Centre St-Laurent, Environnement Canada, Montréal, Québec, H2Y 2 E7, 30p.
- TROTTIER S, BLAISE C, KUSUI T, JOHNSON EM. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*. **12**(3):265-271.
- TYLER CR, JOBLING S, SUMPTER JP. 1998. Endocrine disruption in wildlife, a critical review of the evidence. *Critical Reviews in Toxicology*. **28**:319-361.
- URA K, KAI T, SAKATA S, IGUCHI T, ARIZONO K. 2002. Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Health Science*. **48**(6):583-586.
- U.S. EPA 1975. Committee on methods for toxicity tests with aquatic organisms. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. EPA 660-3-75-009. U.S. Environmental Protection agency, Duluth, MN.
- U.S. EPA 2003. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol – Draft. EPA 822-R-03-029. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- VAAL M, VAN DER WAL JT, HERMENS J, HOEKSTRA J. 1997. Pattern analysis of the variation in the sensitivity of aquatic species to toxicants. *Chemosphere*. **53**(6):1291-1309.
- VAN DEN BELT K, VERHEYEN R, WITTERS H. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **56**:271-281.
- VAN DEN BELT K, BERCKMANS P, VANGENECHTEN C, VERHEYEN R, WITTERS H. 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17β-estradiol, estrone, 17α-ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquatic Toxicology*. **66**:183-195.

- VANDENBERGH GF, ADRIAENS D, VERSLYCKE T, JANSSEN CR. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **54**:216-222.
- WANG YH, POTOCHNY J, NEWMAN LM, JOHNSON EM, GIACOBBE R, ZHANG RW. 1991. Metabolism of ethylene glycol ethers in *Hydra* as it relates to expressed toxicity. *Teratology*. **43**(5): 463 (Résumé).
- WANG X, HAN X, HOU Y, YAO G, WANG Y. 2003. Effect of nonylphenol on apoptosis of Sertoli cells in vitro. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **70**:898-904.
- WARD TJ, BOERI RL. 1991. Chronic toxicity of nonylphenol to the mysid (*Mysidopsis bahia*). Study No. 8977-CMA. Prepared for the Chemical Manufacturers Association by Resource Analysts, Hampton, NH, USA
- WEBER LP, KIPARISSIS Y, HWANG GS, NIIMI AJ, JANZ DM, METCALFE CD. 2002. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **131**:51-59.
- WEIGEL S, KUHLMANN J, HÜHNERFUSS H. 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DETT in the North Sea. *The Science of the Total Environment*. **295**:131-141.
- WEINZIGER R, SALGADO LM, DAVID CN, BOSCH TCG. 1994. Ks1, an epithelial cell-specific gene, responds to early signals of head formation in *Hydra*. *Development*. **120**:2511-2517.
- WIENS M, KRASKO A, MÜLLER CI, MÜLLER WEG. 2000. Molecular evolution of apoptotic pathways: cloning of key domains from sponges (Bcl-2 homology domains and death domains) and their phylogenetic relationships. *Journal of Molecular Evolution*. **50**:520-531.
- WIENS M, BATEL R, KORZHEV M, MÜLLER WEG. 2003. Retinoid X receptor and retinoic acid response in the marine sponge *Suberites domuncula*. *The Journal of Experimental Biology*. **206**:3261-3271.
- WILBY OK. 1988. The *Hydra* regeneration assay. *Proceedings, Workshop Organized by Association Française de teratology*, Royaumont, France, 3 Juin, pp108-124.
- WHITE R, JOBLING S, HOATE SA, SUMPTER JP, PARKER MG. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*. **135**:175-182.
- WYLLIE AH. 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer and Metastasis Reviews*. **11**:95-103.
- YAO G, HOU Y. 2004. Nonylphenol induces thymocyte apoptosis through Fas/FasL pathway by mimicking estrogen in vivo. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **17**:19-27.
- YING GG, WILLIAMS B, KOOKANA R. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – A review. *Environment International*. **28**:215-226.
- YOKOTA H, SEKI M, MAEDA M, OSHIMA Y, TADOKORO H, HONJO T, KOBAYASHI K. 2001. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology & Chemistry*. **20**(11):2552-2560.
- YUM S, TAKAHASHI T, HATTA M, FUJISAWA T. 1998. The structure and expression of a prehormone of a neuropeptide, Hym-176 in *Hydra magnipapillata*. *FEBS Letters*. **439**:31-34.
- ZHANG X, HUFF JK, HUDSON BG, SARRAS MP Jr. 1990. A non-mammalian in vivo model for cellular and molecular analysis of glucose-mediated thickening of basement membranes. *Diabetologia*. **33**(11):704-707.
- ZHANG X, SARRAS MP Jr. 1994. Cell-extracellular matrix interactions under in vivo conditions during interstitial cell migration in *Hydra vulgaris*. *Development*. **120**:425-432.

ZHANG X, HUDSON BG, SARRAS MP Jr. 1994. *Hydra* cell aggregate development is blocked by selective fragments of fibronectin and type IV collagen. *Developmental Biology*. **164**:10-23.

ZHANG L, GIBBLE R, BAER KN. 2003. The effects of 4-nonylphenol and ethanol on acute toxicity, embryo development, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **55**:330-337.

ZERETZKE S, BERKING S. 2001. Pattern regulation properties of *Hydra* strain which produces additional heads along the body axis. *The International Journal of Developmental Biology*. **45**:431-439.

ZUCKERBRAUN HL, BABICH H, MAY R, SINENSKY MC. 1998. Triclosan: cytotoxicity, mode of action, and induction of apoptosis in human gingival cells in vitro. *European Journal of Oral Sciences*. **106**:628-636.

ANNEXES

Annexe 1. Les différents types cellulaires chez l'hydre (Greber et al, 1992).

Type cellulaire	Taille (µm)	Caractéristiques
Cellules endodermiques digestives	25-35	Les plus grandes, ont des vacuoles de différentes tailles.
Cellules ectodermiques	20-30	Très larges
Cellules glandulaires	15-25	Grand nombre de vacuoles de diamètre uniforme.
Cellules interstitielles	10-20	Grand nombre de nucleus
Nématocystes	?	Vacuole proéminente représentant la capsule du nématocyste.
Cellules nerveuses	>10	Ce sont les plus petites cellules

Annexe 2. Différents types de nématocystes chez l'hydre : caractéristiques et utilisation.

Type de nématocyste	Caractéristiques	Utilisation
Sténothèles	Long filament barbelés pénétrant et les plus larges, provenant d'une épaisse région basale portant elle aussi des crochets	Paralysent la proie
Desmodèmes	Long filament enroulé agrippant	Maintient de la proie
Holotriches	Long filament à crochets	But défensif
Atriches	/	Ancrent le polype au substrat

Annexe 3. Liste non exhaustive des peptides et neuropeptides localisés chez l'hydre.

Famille		Fonction	Localisation	Références
LW	7 neuropep	Motif C-terminal GLW-amide commun. Induction de la métamorphose chez les larves planula des hydrozoaires en polype. Contraction des muscles.		Yum et al., 1998 ; Grens et al., 1999
	Hym-176	Contraction des muscles ectodermiques de la région basale.		Yum et al., 1998
PW	Hym-33H	Motif L(I)PW en C terminal commun.		Takahashi et al., 2000 ;
	Hym-35	Inhibe la différenciation neuronale.		Bosch &
	Hym-37			Fujisawa, 2001
	Hym-310			
	Hym-355	Augmente la différenciation neuronale. Affecte le taux de différenciation des cellules sensorielles impliquées dans le mécanisme de l'homéostasie de la population de neurones.	Gène exprimé dans les neurones particulièrement dans les tentacules et autour de la bouche.	Takahashi et al., 2000
	Hym-323	Augmente la formation du pied en accroissant le potentiel d'activation du pied (ou baissant la valeur de position). Régule l'expression d'un gène d'une métalloprotéase « Foot activator-responsive metalloprotease 1 » ou Farm 1.	Cellules épithéliales de l'ectoderme et de l'endoderme de la colonne gastrique mais pas dans le disque basal.	Harafuji et al., 2001
	Hym-346	Isolé chez H. magnipapillata Séquence d'acides aminés de ce peptide est quasi identique à pedibin (excepté la glutamine supplémentaire en C-terminal), ils ont donc une fonction similaire Accroît le taux de régénération du pied en diminuant la valeur de position des cellules.		Takahashi et al., 1997 Grens et al., 1999

Annexe 4. Liste non exhaustive des gènes impliqués dans le développement de l'hydre.

Localisation du gène	Gène	Fonction	Références
Tête	Ks1	Permet l'accroissement de la transcription en réponse à l'activation de la protéine kinase C et permet ainsi la formation de la tête. Gène cible des signaux de régulation spécifiques de la tête. Régulé par des interactions complexes de facteurs inhibiteurs. Exprimé dans les cellules épithéliales de l'ectoderme des tentacules et dans environ 10% des cellules épithéliales de l'ectoderme de la région gastrique supérieure.	Lohmann et al., 1999 Endl et al., 1999
	Budhead (famille forkhead)	Activé lors de la formation de la tête (3-8 h après décapitation) et exprimé dans l'endoderme de l'hypostome.	Martinez et al., 1997
	Cnox-3	Exprimé dans le tissu de la tête. Impliqué dans la formation de tentacules. Homologue de labial	Martinez et al., 1997
	HNF-3	Rôle dans la formation de la tête.	Martinez et al., 1997
	HyBra1	Homologue de Brachyury chez les vertébrés. Exprimé très tôt dans l'endoderme de l'hypostome, associé à la formation de celui-ci. Exprimé tardivement durant l'embryogenèse.	Technau & Bode, 1999 Grens et al., 1995
	CnASH (Cnidarian Achaete- Scute Homolog)	Gène relatif chez la drosophile à la famille achaete-scute des facteurs de transcription bHLH (basic-helix-loop-helix). Exprimé dans les cellules interstitielles et les cellules de la voie de différenciation des nématocystes suggérant qu'il joue un rôle dans le devenir des cellules de cette lignée.	Martinez et al., 1997 Grens et al. 1995
	Hydra	Permet la formation des tentacules.	
	Cnox-2	Homologue du gène Deformed chez la drosophile. Empêche la formation de la tête dans la région gastrique et basale.	Shenk et al., 1993a,b Endl et al., 1999 Cartwright et al., 1999
Pied			

		Exprimé principalement dans la partie basale du tissu, dans la colonne gastrique et très peu dans la tête. Expression supprimée si la tête est formée et il sera sensible au changement de valeur de position.	
	CnNK-2	Gène homologue du gène homeobox NK-2. Exprimé dans les cellules épithéliales de l'endoderme de la partie basal, associé à la formation du pied. Distribué selon une graduation le long de la colonne gastrique avec un maximum au niveau basal juste au-dessus du pied et diminue juste au-dessus de la zone de bourgeonnement. Expression régulée en amont par Pédin et Pédibine.	Martinez et al., 1997 Grens et al., 1999 Thomsen et al., 2004
Tête et pied	HvPKC2	Activé lors de la régénération du pied et de la tête.	
Tête et bourgeon	prdl-a et prdl-b	prdl-b : marqueur pour la division synchronisée des nématoblastes. prdl-a : expression réduite à la lignée des cellules nerveuses de la région céphalique.	Gauchat et al., 1998
	HyAlx	Exprimé exclusivement dans la tête ou au niveau d'une tête en développement (bourgeon). Directement impliqué dans la spécification du tissu pour la formation des tentacules.	Smith et al., 2000
Tête et colonne gastrique	Cnotx	Homologue du gène otx chez les vertébrés ou arthropodes. Exprimé dans la zone des tentacules, fortement dans la colonne gastrique.	Bode, 2001
	goosecoid	Dont l'homologue chez les vertébrés gsc est exprimé dans la région organisatrice de la tête d'un embryon et joue un rôle dans l'initiation de la formation de l'axe chez Xenopus. Goosecoid, facteur de transcription, a un site à l'ADN similaire à Bicoid, le morphogène maternel responsable du développement antérieur chez l'embryon de la drosophile.	Broun et al., 1999 Chatterjee et al., 2001
	ras2		Müller, 1996a
Pied et colonne	shin guard	Récepteur tyrosine kinase. Exprimé dans l'ectoderme du pied et la colonne	Bridge et al., 2000

gastrique	gastrique, entre la zone de bourgeonnement et le disque basal. L'expression de ce gène est ainsi graduée. Chez un animal traité avec du lithium, la frontière supérieure de l'expression du gène est déplacée vers le haut de la colonne gastrique. Ceci montre que l'expression de ce gène est corrélée avec une gradation de la valeur de position.	
Tête, pied et bourgeon	Expression localisée dans les régions équivalentes à celles de <i>Xenopus</i> , soit la région de l'hypostome et la région basale. Ces régions sont précisément celles où les précurseurs des cellules nerveuses augmentent la différenciation des neurones. L'expression des transcrits <i>Noggin-like</i> est également détectée dans les bourgeons, chevauchant le site de différenciation cellulaire nerveuse, qui est nécessaire pour le développement du bourgeon. Ceci suppose que ces transcrits jouent un rôle important dans la différenciation perpétuelle neuronale.	Chatterjee et al., 2001
Bourgeon.	<i>msh</i>	A l'origine de l'initiation des bourgeons. Müller, 1996a

Annexe 5. Gammes de concentrations utilisées dans l'étude de la toxicité sur la survie des adultes (A) et sur le développement des tronçons gastriques (TG). Les concentrations sont ajustées selon la toxicité des molécules.

SUBSTANCES	Concentrations (mg/L)	Substances	Concentrations (mg/L)
2,4-D	0-0,001-0,01-0,1-1-10-100	EGMEA	0-0,001-0,01-0,1-1-10-100-500-1000-5000
5-Fluoro-uracile	0-0,001-0,01-0,1-1-10-100	Ethanol	0-0,001-0,01-0,1-1-2-5%
6-Aminonicotiamide	0-0,001-0,01-0,1-1-10-100	Fénofibrate	0-0,001-0,01-0,1-1-10-50-100-150 (A)*
13-Cis-retinoic acid	0-0,01- 0,1-1-10-100-1000-10000 µg/L	Fomesafen	0-0,001-0,01-0,1-1-10-100
Acébutolol	0-0,001-0,01-0,1-1-10-200	Fluoxétine	0-0,001-0,01-0,1-1-5-10-15-20-40-50-60-100
Acrylamide	0-0,01-0,1-1-10-50--60-70-80-90-100	Hydroxyurée	0-0,001-0,01-0,1-1-10-200
All-trans-retinoic acid	0-0,01- 0,1-1-10-100-1000-10000 µg/L		0-0,001-0,01-0,1-1-10-20-30-40 100 (A)*
Alpha-cyperméthrine	0-0,001-0,01-0,1-1-10-20-30-40- 50 60-70-80-90-100- 200-300-400-500-1000-5000-10000 (A)* 0-0,001-0,01-0,1-1-10-20-30-40- 50 60-70-80-90-100- 150-200-250-300-400-500-1000-5000-10000 (TG)*		0-0,001-0,01-0,1-1-2-4-5-6-8-10-15-100 (TG)*
Amoxicilline	0-0,001-0,01-0,1-1-10-54	Lithium carbonate	0-0,5-1-10-20-30-35-40-70-75-80-85-90-100 µg/mL (A)* 0-0,1-0,5-1-5-10-15-20-40-70-75-80-85-90-100 µg/mL (TG)*
Azetidine-2-carboxylique	0-10-50-100-200-300-400	Malathio	0-0,001-0,01-0,1-1-10-30-40-50-70-90-100
Bisphénol A	0-0,001-0,01-0,1-1-20	MALD	0-0,001-0,1-1-10-20 (TG)*
Bléomycine	0-0,001-0,01-0,1-1-10-100		0-1-3-4-5-6-7-10 %
Carbamazépine	0-0,001-0,01-0,1-1-10-50-100-150-200	Méthoprène	0-0,001-0,01-0,1-1-5-10-20-30-40-50-100
Chlorhexidine digluconate	0-0,01-0,1-1-5-10-12-15-18-20-50-100 (A)* 0-0,01-0,1-1-2-4-5-6-8-10-50-100 (TG)*		0-0,001-0,01-0,1-1-10-100
Colchicine	0-0,001-0,01-0,1-1-10-50-100-150-200-250-300-350-1000 (A)* 0-0,001-0,01-0,1-1-5-10-30-50-70-90-100-150-200-250-1000 (TG)	Parathion	0-0,001-0,003-0,005-0,007-0,01-0,05-0,1-0,2-0,4-0,5-0,6-0,8- 1-2-4-5-6-8-10-50
Cuivre (Cu ²⁺)	0-0,01-0,02-0,025-0,03-0,035-0,04-0,05-0,1-0,2-0,4-0,6-0,8-1	Peroxyd hy e	0-0,34-3,4-10-34-100-200-340 mM
Cycloheximide	0-0,001-0,01-0,05-0,1-0,25-0,5-0,8-1-10-20	Propranolol	0-0,001-0,01-0,1-1-10-20-30-40-50-60-80-100
Cytochalasine	0-0,001-0,01-0,1-1-2-3-4-6-8-10	SD	0-0,01-0,1-1-5-10-30-50-60-70-80-100-500
DEHP	0-0,001-0,01-0,1-1-10-50-100-1000-10000-50000	Sulfaméthoxazole	0-0,001-0,01-0,1-1-10-50-100-120-150-180-200
Deltaméthrine	0-0,01-0,1-1-10-13-16-20-22-26-30-50-60-80-100-150-200	TB	0-0,001-0,01-0,03-0,05-0,07-0,1-1-10-100
Dibutyl phthalate	0-0,001-0,01-0,1-1-10-20-40-60-80-100	Thalidomide	0-0,001-0,01-0,1-1-5-10-30-50-70-90-100
Diclofenac	0-0,001-0,01-0,1-1-1-2-4-5-6-8-10-100		0-0,001-0,003-0,005-0,007-0,009-0,01-0,1-1-10 (TG)*
Diflubenzuron	0-0,001-0,01-0,1-1-10-100-500-1000-1500(A)* 0-0,001-0,01-0,1-1-10-20-40-50-60-80-100 (TG)*	TGDME	L (A)* 0-1-10-12-14-15-16-18-20-100-1000-10000-20000 g/L (TG)*
DMSO/Acetone	0-0,02-0,1-1-2-3-3,5-4-4,5-5-10 %	Triclosan	0-0,001-0,01-0,1-0,3-0,5-0,6-0,8-1-10-100-200-400-600-800
EGME	0-0,001-0,01-0,1-0,5-1-5-10-50-100 %	Triton-X-100	0-0,001-0,003-0,005-0,007-0,009-0,01-0,1-1-10-50 %
		Zinc (Zn ²⁺)	0-0,2-0,5-1-1,2-1,5-1,8-2-5-10 (A)* 0-0,2-0,5-1-2-3-3,5-4-4,5 5-10 (TG)*

*: Gamme spécifique pour l'étude de la toxicité chez l'adulte ou le tronçon gastrique.

ANNEXE 6. LE MODÈLE HYDRE POUR L'ÉVALUATION DE L'IMPACT SUR LE DÉVELOPPEMENT¹⁷

(The Hydra model for assessing impact on development)

P. Vasseur[†], S. Pachura[†]

[†]Ecotoxicité, Santé Environnementale. CNRS UMR 7146. Université de Metz

Résumé. L'impact des pollutions d'origine anthropique sur le développement des invertébrés est encore assez peu exploré malgré les conséquences économiques et écologiques découlant des perturbations de ce processus physiologique. L'hydre d'eau douce, *Hydra attenuata*, comme les autres cnidaires, est un modèle classique pour les recherches en Biologie du Développement. Ses capacités de régénération méritent d'être mieux exploitées en Écotoxicologie pour la détection des potentialités toxiques des polluants hydriques et l'étude des mécanismes de toxicité. Les réponses obtenues dans le cadre du programme ENIMED n'ont pas mis en évidence de risque préoccupant des substances médicamenteuses étudiées, malgré des effets sur le développement de certaines molécules enregistrées pour des niveaux d'exposition supérieurs aux concentrations environnementales.

Mots clés : *Hydra attenuata* ; développement ; substances médicamenteuses.

Abstract. The impact of anthropogenic pollutants on invertebrate development is poorly explored despite economic and ecological consequences resulting from disturbance of this physiological process. The freshwater *Hydra attenuata*, like the other cnidarians, is a traditional model for research on Development. Its regeneration capacities deserve to be exploited in Ecotoxicology for toxicity assessment of aquatic pollutants and the study of their mechanisms of toxicity. Toxicity results obtained on the set of pharmaceutical compounds tested in the ENIMED Programme did not indicate unacceptable risk although effects of some chemicals on *Hydra* development were registered.

Keywords : *Hydra attenuata*; development; pharmaceutical compounds.

Introduction.

¹⁷ Soumis dans *Environnement, Risques & Santé*

La dynamique de croissance des populations peut être affectée par des facteurs agissant sur la survie, le développement, la maturation des juvéniles et la reproduction des individus. Cependant, l'évaluation des dangers des substances chimiques pour l'environnement donne priorité aux études de mortalité à court terme sur les poissons et les daphnies, modèles classiques en toxicologie aquatique [1, 2] et qui ont déjà montré leurs limites [3]. La reproduction des daphnies et la survie des poissons au stade embryo-larvaire ne sont étudiées qu'en deuxième étape de l'évaluation des risques, lorsque les résultats à court terme laissent augurer un problème [2]. Les perturbations du développement, les problèmes de maturation et de différenciation ne sont pas recherchés. La problématique des perturbateurs endocriniens qui mobilise actuellement la communauté scientifique internationale a souligné les lacunes en matière d'évaluation de la toxicité des substances chimiques et a impulsé un essor spectaculaire aux recherches sur les mécanismes de toxicité pouvant affecter la reproduction des vertébrés, mammifères, oiseaux, poissons, et amphibiens [4]. Mais, peu d'études portent encore sur le développement si l'on excepte les mammifères, et sur les invertébrés si l'on excepte les daphnies. Pourtant, les invertébrés représentent 30 phyla différents [5]; les systèmes endocrines qui règlent la reproduction et le développement sont très diversifiés et très mal connus, puisque les recherches sont focalisées sur les vertébrés (embranchement des cordés) qui ne représentent paradoxalement qu'un seul phylum du monde vivant [6].

Les anomalies du développement sont suffisamment lourdes de conséquences au plan écologique et économique pour justifier plus d'attention et d'efforts de la part des instances réglementaires et des chercheurs. Les déformités de la coquille des huîtres par le tributylétain (TBT) des peintures antisalissures qui ont frappé l'ostréiculture il y a une vingtaine d'années est la triste illustration des dégâts économiques pouvant résulter d'anomalies du développement [7]. Le déclin et l'extinction des populations locales des invertébrés marins, *Nucella lapillus*, illustre parallèlement les dommages écologiques consécutifs aux perturbations endocrines touchant la différenciation sexuelle, le développement et la maturation des invertébrés [8, 9]. Les problèmes liés au TBT sont à l'origine d'un test spécifique pour l'étude du développement embryonnaire des larves d'huîtres, qui détecte les anomalies avec une sensibilité vingt fois plus élevée que le test standard de reproduction des daphnies [10]. Des essais du même ordre demandent à être développés pour des applications en milieu dulçaquicole. C'est à ce titre qu'est étudié le modèle « Hydre », dont les capacités de régénération d'un organisme entier à partir d'une masse de cellules indifférenciées, ou de

tronçons gastriques (Figure 1) en ont fait un modèle de choix pour les recherches en Biologie du développement.

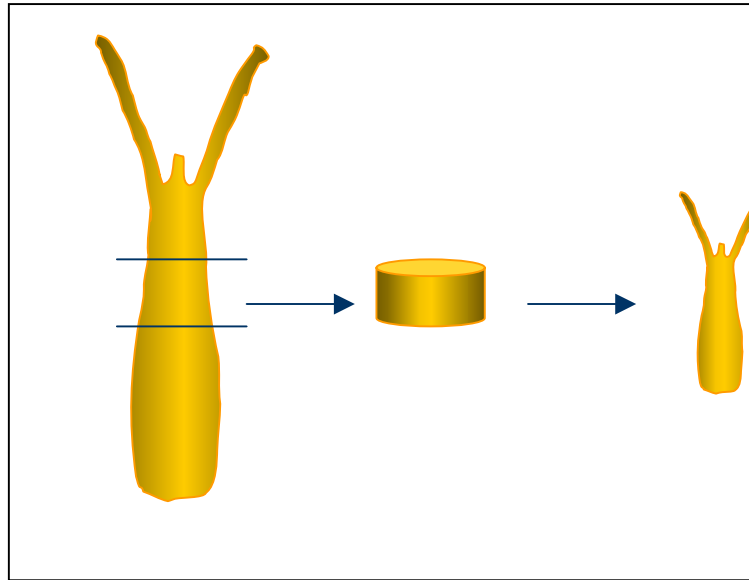


Figure 1. Développement d'une hydre adulte complète à partir d'une section gastrique. Cette dernière est isolée après élimination des zones apicale et basale.

Intérêt du modèle hydre en toxicologie du développement

L'hydre est un animal d'eau douce qui appartient au phylum des cnidaires. Un des intérêts du modèle hydre est sa position dans l'arbre de l'évolution ; les cnidaires figurent parmi les premiers individus dont les cellules se sont organisées en tissus et ils représentent une forme très primitive de l'organisation et de la physiologie des métazoïres [11]. Les cnidaires sont des organismes modèles pour élucider les mécanismes du développement mis en place chez les ancêtres des invertébrés et des vertébrés plus évolués [12]. Les mécanismes cellulaires à l'origine d'un dysfonctionnement de la régénération et de la différenciation chez l'hydre doivent donc pouvoir être transposés à d'autres organismes apparus plus tard au cours de l'évolution. L'hydre a d'ailleurs été assez tôt préconisée pour détecter le potentiel tératogène des médicaments en premier screening [13].

L'hydre peut être utilisée pour étudier les effets de toxicité aiguë des substances chimiques, qui se traduiront par des anomalies morphologiques touchant d'abord les

tentacules (extrémités bulbées, puis raccourcissement et disparition) et aboutissant au stade tulipe qui est un stade létal précédant la désintégration (Figure 2a). La régénération est étudiée à partir des tronçons gastriques qui donneront des tentacules, puis une hydre entière et viable après ouverture de la cavité digestive en haut de la tête (Figure 2b).

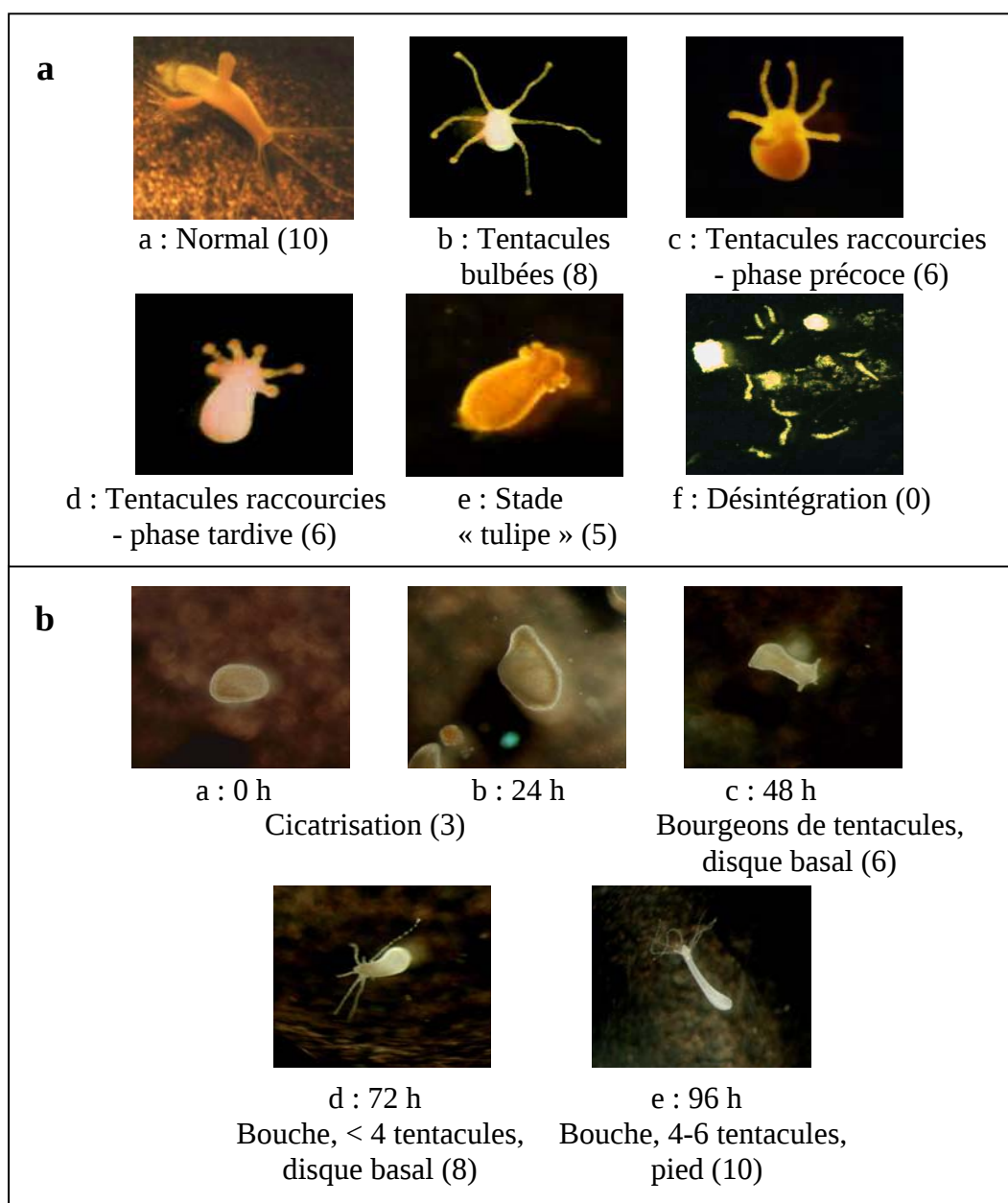


Figure 2. (a) Morphologies successives d'une hydre adulte placée dans un milieu toxique (d'après Wilby [14]). Evolution des stades à partir d'un état normal (a; score 10) jusqu'à la désintégration (f; score 0), en passant par le stade tentacules bulbées (b; score 8), tentacules raccourcies (c, d; score 6) et « tulipe » (e; score 5). **(b)** Développement d'un embryon (section gastrique), de la cicatrisation (a; score 3) jusqu'à la régénération complète d'une hydre adulte (e; score 10).

Résultats obtenus sur les substances médicamenteuses étudiées

Les résultats obtenus au cours du programme PNETOX (Programme national d'Ecotoxicologie) sur le jeu de substances médicamenteuses étudiées montrent que la régénération de l'hydre est perturbée à des concentrations inférieures à celles induisant la mortalité pour des substances telles que l'ibuprofène et le diclofénac, anti-inflammatoires (AINS) bloquant la synthèse des prostaglandines, la fluoxétine qui agit sur le système nerveux sympathique et le métabolisme de la sérotonine, le sulfaméthoxazole, inhibiteur de la synthèse de l'acide folique qui est l'un des précurseurs de la synthèse des acides nucléiques, et le propranolol, un β -bloquant (Figure 3).

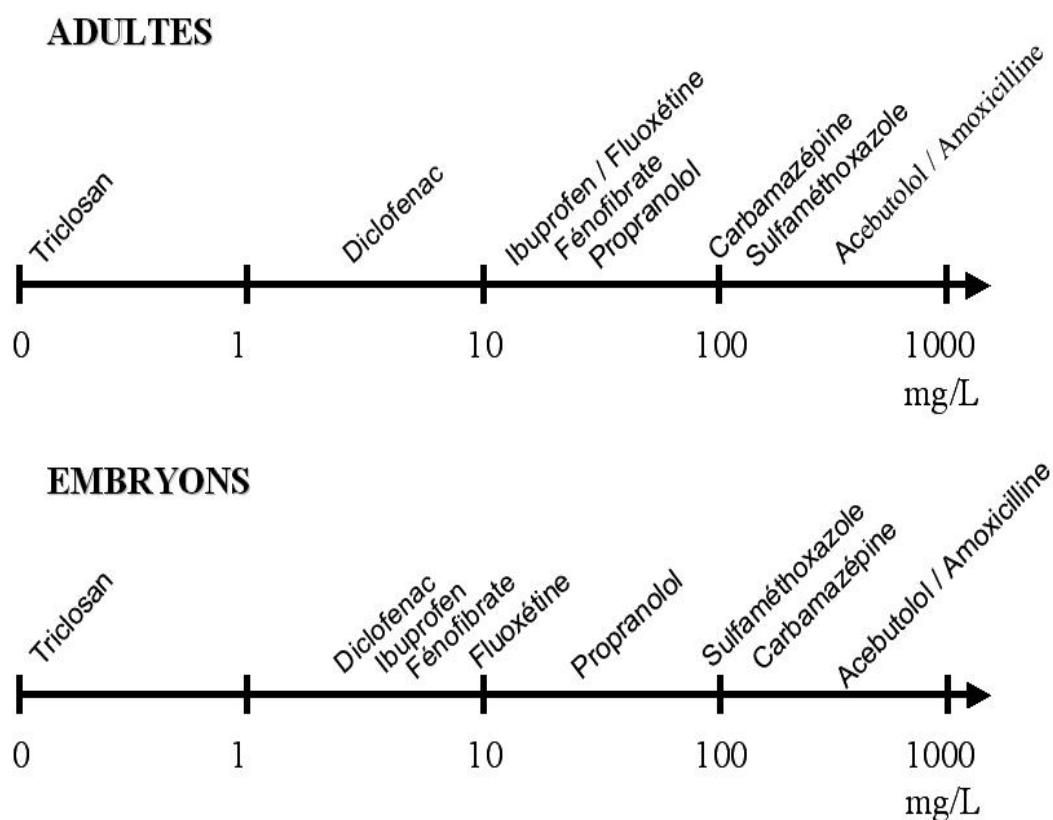


Figure 3. Toxicité de 10 substances médicamenteuses sur la survie et le développement de *Hydra attenuata*, exprimée par la CL_{50-96h} (concentration létale induisant 50% de mortalité après 96h d'exposition).

L'altération de la synthèse des constituants cellulaires et du fonctionnement du système nerveux central apparaissent donc des mécanismes susceptibles de perturber le développement de cet hydrozoaire. Mais la viabilité et le développement de l'hydre ne sont altérés que pour des concentrations de l'ordre du mg/L, soit largement supérieures aux concentrations retrouvées dans les eaux de surface.

La sensibilité de l'hydre est équivalente à celle des autres invertébrés d'eau douce en terme de toxicité aiguë; mais elle est inférieure à celle des céridaphnies pour quelques substances telles que le triclosan, le propranolol, et la carbamazépine qui inhibent la reproduction des daphnies à des concentrations très faibles.

Conclusion

Les résultats obtenus sur quelques-unes des substances à usage pharmaceutique retrouvées dans les eaux de surface, ne soulignent pas de danger à court terme pour les hydres. Il serait utile d'élargir la gamme des substances chimiques testées à d'autres catégories chimiques, comme des médicaments anticancéreux, des pesticides, des perturbateurs endocriniens,... afin de mieux cerner le domaine de sensibilité des hydres à court et à long terme. Des travaux récents ont révélé que l'hydre est sensible à la toxicité du nonylphénol (NP) connu pour ses propriétés oestrogéniques. Le NP provoque la désintégration de l'hydre à des concentrations représentatives des milieux pollués et active ses mécanismes apoptotiques [15].

L'hydre apparaît donc un modèle mécanistique de certains dysfonctionnements de la différenciation tissulaire, mais des études complémentaires sont nécessaires pour connaître ses performances en tant qu'un indicateur des anomalies pouvant affecter des organismes plus évolués.

Références

1. Furlong J. EC approach to environmental risk assessment of new substances. *Sci Total Environ* 1995 ; 171:275-279.
2. TGD. Technical Guidance Document on Risk Assessment. In support of: Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of European Parliament and the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Part II. Institute for Health and Consumer Protection, European chemicals bureau, United Kingdom. 1996.
3. Henschel KP, Wenzel A, Diedrich M, Flieger A. Environmental hazard assessment of pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1997 ; 25:220-225.

4. OCDE. Draft guidance document on reproductive toxicity testing and assessment. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on testing and assessment, N°43. Environment Directorate, Organisation for Economic Cooperation and Development, November 10, 2004.
5. Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U. Endocrine disruption in invertebrates. *Pure Appl. Chem.* 2003 ; 75(11-12):2207-2218.
6. Segner H, Carroll K, Fenske M, *et al.* Identification of endocrine-disrupting effects in aquatic vertebrates and invertebrates: report from the European IDEA project. *Ecotoxic Environ Saf.* 2003 ; 54(3):302-314.
7. Alzieu C, Thibaud Y, Héral M, Boutier B. Evaluation des risques dus à l'emploi des peintures anti-salissures dans les zones conchylicoles. *Rev. Trav. Inst. Pêch. Mar.* 1980 ; 44:306-348.
8. Bryan GW, Gibbs PE, Burt GR, Hummerstone LG. The effects of tributyltin TBT accumulation on adult dogwhelks, *Nucella lapillus*: long term field laboratory experiments. *J Mar Biol Asso U K.* 1987 ; 67:525-544.
9. Gibbs PE, Bryan GW, Pascoe PL, Burt GR. The use of the dogwhelk (*Nucella lapillus*) as an indicator of TBT contamination. *J Mar Biol Asso U K.* 1987 ; 67:507-524.
10. Quiniou F, Alzieu C. L'analyse des risques chimiques appliquée aux dragages. In : Alzieu C. Dragages et environnement marin: État des connaissances. eds. Ifremer. Plouzané, France, 1999 : 127-147.
11. Bosch TCG. Ancient signals: peptides and interpretation of positional information in ancestral metazoans. *Comp Biochem Physiol B.* 2003 ; 136:185-196.
12. Galliot B, Schmid V. Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 2002 ; 46:39-48.
13. Johnson EM, Gorman RM, Gabel BEG, George ME. The *Hydra attenuata* system for detection of teratogenic hazards. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1982 ; 2:263-276.
14. Wilby OK. The Hydra regeneration assay. Proceedings of workshop organised by Association Française de Teratologie, Royaumont, France, June, 3, 1988, pp 108-124
15. Pachura S, Cambon JP, Blaise C, Vasseur P. 4-Nonylphenol induced toxicity and apoptosis in *Hydra attenuata*. *Environ Toxicol Chem.* 2005 ; 24(12). In press.