

Eawag

INews

A photograph showing several zebrafish (Danio rerio) swimming in a clear tank. The fish are characterized by their yellowish-brown bodies with prominent horizontal blue and black stripes. They are scattered across the frame, some facing left and some facing right. The background is a plain, light-colored surface.

Poisson zèbre: un modèle animal pour l'écotoxicologie

Un test de toxicité moléculaire. Page 10

Des poissons zèbres sans récepteurs d'œstrogènes. Page 18

Effets du pétrole brut sur les embryons de poisson zèbre. Page 24



Rik Eggen, biologiste moléculaire, a dirigé le département de Toxicologie de l'environnement avant d'être nommé directeur adjoint de l'Eawag.

Poisson zèbre: une souris de laboratoire version aquatique

Lorsque le poisson zèbre (*Danio rerio*) a été décrit pour la première fois en 1822, rien ne laissait présager de la formidable carrière qui l'attendait. Ce poisson scintillant aux belles rayures bleues et blanches ne fait pas uniquement la joie des aquariophiles mais est également fort apprécié dans les laboratoires de recherche scientifique. Au tout début, il attira surtout les sympathies des chercheurs en sciences médicales et en biologie du développement en quête d'un modèle de vertébré. En effet, ses propriétés particulières en faisaient un sujet d'étude privilégié, notamment dans le domaine génétique: ce petit animal de 5 à 6 cm de long est particulièrement robuste, supporte très bien les conditions de captivité, est doté d'une progéniture abondante et se développe en à peine 24 heures de l'état d'œuf fécondé à celui de jeune larve.

Il y a huit ans environ, l'idée émergea à l'Eawag d'utiliser le poisson zèbre comme organisme modèle en écotoxicologie. A l'époque, diverses informations dans la presse scientifique et les médias alertaient l'opinion sur la présence dans l'environnement de substances chimiques à activité endocrinienne et l'on soupçonnait une implication de ces polluants dans l'apparition de plus en plus fréquente de malformations des organes sexuels chez les poissons. Des tests *in vitro* permettant assez facilement de mettre en évidence les perturbateurs endocriniens dans les échantillons d'eau existaient déjà. Toujours légitimement employées aujourd'hui, ces méthodes impliquent cependant des organismes unicellulaires (bactéries, levures), des cultures de cellules ou des composants cellulaires, et il manquait encore un organisme modèle complexe sur lequel il serait possible d'étudier les relations de cause à effet entre lesdits polluants et les anomalies génitales. Le poisson zèbre nous parut tout désigné pour cette fonction et c'est ainsi que nous avons commencé début 2001 à mettre en place une station adéquate d'étude et d'élevage des poissons. En collaboration avec Stephan Neuhauss, spécialiste de biologie du développement de l'Université de Zurich, et d'Helmut Segner, spécialiste de physiologie des poissons de l'Université de Berne, qui disposaient tous deux d'une grande expérience

de travail avec le poisson zèbre, nous avons alors abordé l'étude des mécanismes d'action des substances à activité hormonale dans le cadre d'un projet européen et du Programme national de recherche «Perturbateurs endocriniens». L'exposé d'une partie de nos résultats occupe le cœur de ce numéro d'Eawag news.

Une autre de nos activités prioritaires de recherche avec le poisson zèbre concerne l'élaboration de nouveaux tests de toxicité, ceci dans le double objectif de s'affranchir des animaux adultes de laboratoire et d'obtenir un système permettant une élucidation concomitante des mécanismes d'action toxique. Il a tout de suite semblé assez logique de se concentrer sur les effets moléculaires plutôt que sur des critères non spécifiques comme par exemple les altérations morphologiques ou les taux de mortalité. Le test MolDarT alors développé dans cet esprit à l'Eawag a déjà prouvé sa bonne applicabilité pratique et constitue un pas décisif sur cette voie. Modulable, ce système présente en outre l'avantage de pouvoir être à tout moment complété ou modifié en fonction de l'apparition de nouveaux biomarqueurs moléculaires.

Si le nombre d'équipes travaillant avec le poisson zèbre en écotoxicologie était encore assez limité il y a quelques années, la tendance est aujourd'hui nettement à la hausse. De plus, les laboratoires de biologie remplacent de plus en plus souvent les souris et rats de laboratoire par le *Danio zébré* pour leurs expérimentations. Il n'est donc pas surprenant que ce poisson soit parfois qualifié de «souris» aquatique. L'Eawag s'inscrit aussi dans cette tendance et continue de miser sur le poisson zèbre, notamment pour les travaux du nouveau centre d'écotoxicologie appliquée qu'elle gère avec l'EPF de Lausanne. Car une chose est sûre: les potentialités de ce modèle animal de laboratoire pour la recherche en toxicologie environnementale sont encore loin d'être totalement exploitées.

Sommaire

Article thématique

4 **Le poisson zèbre joue les modèles**



L'écotoxicologie s'intéresse de plus en plus au poisson zèbre. Parmi bien d'autres qualités, sa grande fertilité et sa rapidité de développement en font un organisme modèle particulièrement avantageux.

Recherches actuelles

8 **Des poissons bien soignés**

Près de 600 petits poissons zèbres évoluent dans les aquariums de l'Eawag. Comment se déroule leur journée? Deux techniciennes de l'Eawag nous l'expliquent.

10 **Un nouveau test de toxicité: le MolDarT**



Le MolDarT, un test de toxicité moléculaire basé sur l'exposition du poisson zèbre qui a été mis au point par l'Eawag, permet d'évaluer les polluants contenus dans les échantillons d'eau.

13 **Malformations chez les corégones du lac de Thoune**



L'Eawag participe à la recherche des causes des malformations gonadiques. On tente de savoir si des polluants peuvent y jouer un rôle déclenchant. Le MolDarT est utilisé pour la première fois.

16 **Implication des œstrogènes dans l'organogénèse**

Assurant de multiples fonctions dans l'organisme, les œstrogènes jouent-ils également un rôle dans le déterminisme sexuel des poissons et dans la formation de la ligne latérale?

18 **Des poissons zèbres sans récepteurs d'œstrogènes**

Les œstrogènes sont reconnus par des récepteurs spécifiques. Mais que se passe-t-il si l'on empêche expérimentalement la formation de ces récepteurs à œstrogènes?

20 **Quand les dioxines empruntent la voie des œstrogènes**



Les dioxines présentent la capacité d'interférer dans le système hormonal des organismes exposés qui, selon les circonstances, déclenchent soit des effets œstrogéniques soit anti-œstrogéniques.

24 **Le pétrole brut modifie l'activité génique**

L'environnement aquatique subit régulièrement des déversements accidentels de pétrole. Or le pétrole y est encore détectable des années plus tard. Des essais menés avec des puces à ADN en font la preuve.

27 **Analyse du protéome**

L'analyse protéomique permet de mettre en évidence les protéines dont la synthèse est réprimée ou stimulée sous l'effet de polluants donnés. Cette méthode a maintenant pu être implantée à l'Eawag.

Divers

30 **Publications**

34 **Forum**

Une spin-off de l'Eawag pour une gestion raisonnée des eaux de ruissellement

Un nouveau centre d'écotoxicologie appliquée

36 **Notes**

eawag
aquatic research

Editeur, Distribution: Eawag, Case postale 611, 8600 Dübendorf, Suisse, Tél. +41 (0)44 823 55 11, Fax +41 (0)44 823 53 75, www.eawag.ch

Rédaction: Martina Bauchrowitz, Eawag

Traductions: Laurence Frauenlob-Puech, D-Waldkirch

Conseiller linguistique: Fabrice Combes, F-Marseille

Copyright: reproduction possible après accord avec la rédaction.

Parution: irrégulièrement en français, allemand et anglais. Production chinoise en coopération avec INFOTERRA China National Focal Point.

Figures: Peter Nadler, Fällanden

Maquette: TBS Identity, Zürich

Graphisme: Peter Nadler, Fällanden

Impression: sur papier recyclé

Abonnements et changement d'adresse: les nouveaux abonné(e)s sont les bienvenu(e)s! eawag.news@eawag.ch

ISSN 1420-3928



Martina Bauchrowitz,
biologiste et rédactrice de
l'Eawag News.

Le poisson zèbre joue les modèles

Il y a un peu plus de huit ans, le département de toxicologie environnementale de l'Eawag s'est engagé dans la recherche sur et avec le poisson zèbre. Une équipe très active de chercheurs et chercheuses rassemblés autour du biologiste moléculaire Rik Eggen se consacre depuis à ce nouvel organisme modèle. Le temps est maintenant venu de leur donner la parole.

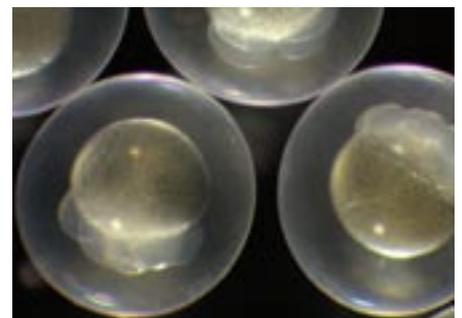
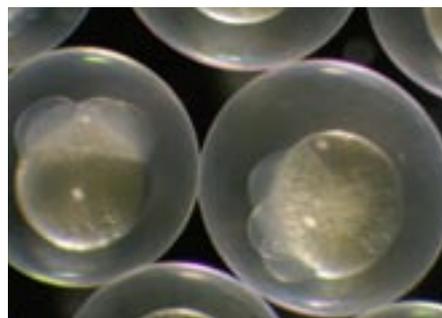
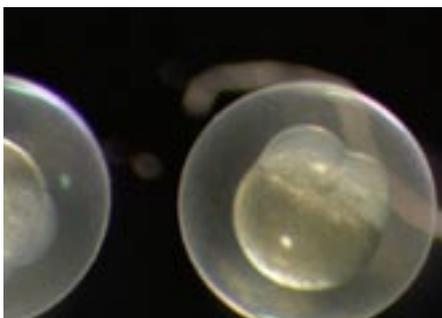
« J'avais depuis longtemps cette idée en tête. » C'est avec enthousiasme que Rik Eggen, ancien chef du département de toxicologie environnementale et actuel directeur adjoint de l'Eawag, raconte comment on en est venu à implanter et à développer l'utilisation du poisson zèbre à l'Eawag en tant que modèle animal pour les études écotoxicologiques. A la fin des années 1990, il s'était mis à la recherche d'un organisme modèle complexe d'un niveau d'organisation supérieur qui viendrait relayer les organismes unicellulaires (bactéries, levures, algues, etc.) ou les cultures cellulaires utilisés jusque là pour les expérimentations. Dans la littérature scientifique, il découvrit l'engouement croissant dont faisait l'objet le poisson zèbre dans le domaine de la recherche médicale et particulièrement de la biologie du développement. Ces petits animaux d'à peine 5 à 6 cm de long présentent de nombreux avantages, explique Rik Eggen. Caractérisés par un cycle biologique très court, ils atteignent la maturité sexuelle au bout de 3 à 4 mois seulement : les femelles pondent de grandes quantités d'œufs qui seront ensuite fécondés par les mâles : et les embryons transparents se développent entièrement en dehors du corps maternel (cf. photos), ce qui rend la détection de malformations particulièrement facile.

Les poissons zèbres sont amateurs de chaleur. En 2001, tout était enfin prêt : les premiers 20 poissons zèbres pouvaient entrer en stabulation. Aujourd'hui, les aquariums de l'Eawag en abritent près de 600 et, jour après jour, des œufs fécondés sont livrés aux

chercheurs pour leurs essais d'écotoxicologie. La technicienne Karin Rüfenacht fait partie de l'équipe depuis le début (voir article page 8). Le bien-être des poissons lui tient particulièrement à cœur et, s'il ne lui arrive pas fréquemment d'avoir à euthanasier l'un de ses protégés, c'est toujours, même au bout de plusieurs années, avec une grande tristesse qu'elle s'acquitte de cette tâche ingrate. Fort heureusement, les poissons zèbres sont des animaux peu exigeants et faciles à élever : leurs besoins en matière de qualité de l'eau, de nourriture et d'espace sont très modestes. La seule condition à respecter est une température élevée car, originaires des affluents du Gange qui s'écoulent en Inde, au Bangladesh et au Pakistan, ils ont besoin de chaleur. D'un point de vue taxonomique, le poisson zèbre (*Danio rerio*) fait partie de la famille des carpes (cyprinidés) qui compte plus de 400 espèces et constitue donc l'une des familles de poissons les plus abondamment représentées dans le monde.

Un nouveau test de toxicité. Jane Muncke a été la première doctorante de l'Eawag à travailler avec le poisson zèbre. Sa mission consistait à mettre au point avec sa directrice de thèse, Nina Schweigert, un test moléculaire de toxicité basé sur le poisson zèbre pour mettre en évidence les polluants contenus dans les eaux (voir article page 10). « Auparavant, on parlait tout simplement du principe que les effets des polluants tels qu'ils étaient révélés par les tests de toxicité sur organismes unicellulaires ou sur cultures de cellules se manifestaient de la même façon chez

Les cellules de l'œuf fécondé commencent à se diviser: stades 2, 4 et 8 cellules.





Photos: Steve Baskauf 2002, <http://bioimages.vanderbilt.edu/>

Stade blastula précoce (~2,3 heures après fécondation): les cellules se rassemblent au sommet du sac vitellin.

les vertébrés. Or rien ne prouve que ce soit le cas – en fait, c’est même plutôt improbable.» En réalité, deux aspects différents interviennent pour influencer l’action toxique des polluants chimiques. Tout d’abord, les processus d’absorption des composés sont beaucoup plus complexes chez les vertébrés que chez les organismes unicellulaires. Ensuite, les vertébrés sont en mesure de transformer les composés absorbés dans leur métabolisme. «Il était donc particulièrement important de développer un test de toxicité avec des vertébrés. Le fait que le nôtre ne fasse pas appel à des poissons adultes et permette en outre d’étudier les mécanismes d’action au niveau moléculaire le rend encore plus séduisant.»

Malformations chez les corégones du lac de Thoue – un travail de détective. C’est assez récemment, dans le cadre d’un projet concernant le lac de Thoue, qu’une occasion s’est présentée d’évaluer dans la pratique les potentialités du nouveau test de toxicité. «Le lac cache un secret. Personne ne sait pourquoi depuis quelques années autant de corégones présentent des malformations des organes génitaux», explique Anja Liedtke. Cette scientifique venue rejoindre les rangs de l’Eawag après avoir effectué une thèse à l’Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) de Leipzig cherche à savoir si les anomalies sont causées par des polluants et en particulier par des perturbateurs endocriniens (voir article page 13). Pour mener à bien ses recherches, elle recourt à divers tests de toxicité dont celui basé sur l’exposition du poisson zèbre.

Effets des perturbateurs endocriniens sur les poissons. Le problème de l’apparition d’anomalies au niveau des organes reproducteurs des poissons ne concerne cependant pas uniquement le lac de Thoue. Dans les années 1990, de plus en plus d’études ont fait état dans le monde entier de phénomènes de féminisation des poissons mâles. On a pensé qu’il pouvait exister un rapport entre ce phénomène nouveau et la détection de plus en plus fréquente de polluants à activité perturbatrice endocrinienne (cf. encadré)

Qu’appelle-t-on perturbateurs endocriniens?

Le terme de perturbateurs endocriniens désigne l’ensemble des substances capables d’interférer avec le système hormonal, en particulier sexuel, des animaux et des êtres humains. Parmi les quelque 100 000 composés chimiques qui sont actuellement sur le marché, seuls quelques uns ont été soumis à une étude de leurs effets endocriniens. Un certain nombre de perturbateurs endocriniens bien connus est cependant régulièrement mis en évidence dans le milieu aquatique. Il s’agit notamment d’œstrogènes naturels et de synthèse comme par exemple l’agent de la pilule contraceptive, de certains composés musqués entrant dans la composition des parfums synthétiques, de certains écrans UV contenus dans les crèmes solaires, d’antioxydants provenant des produits cosmétiques, de conservateurs alimentaires, de toute une série de produits chimiques industriels les plus variés et de dioxines (voir encadré particulier).

Les hormones stéroïdes de type œstrogène doivent être considérées comme les principales responsables des effets œstrogéniques pouvant se manifester chez les organismes aquatiques. Telle est l’une des conclusions de la plateforme de consensus «Perturbateurs endocriniens dans les eaux usées et dans le milieu aquatique» [2] qui fait le point sur l’état actuel des connaissances et sur les mesures à engager suite au programme de recherche PNR50 du Fonds national suisse «Perturbateurs endocriniens: Importance pour les êtres humains, les animaux et les écosystèmes». Ce groupe de travail rassemblant des représentants du monde de l’industrie, de l’administration, du milieu associatif et de la recherche plaide par ailleurs pour l’adoption d’objectifs de qualité en ce qui concerne l’activité œstrogénique dans les milieux aquatiques et en particulier dans les cours d’eau récepteurs d’effluents de stations d’épuration offrant un niveau de dilution limité.

dans l’environnement aquatique. «Il allait de soi qu’une relation de causalité ne pourrait être démontrée qu’en travaillant directement sur des poissons. Ce fut un argument de plus pour l’utilisation du poisson zèbre à l’Eawag», raconte Rik Eggen pour expliquer encore une fois le choix du nouvel organisme modèle. Les hormones sexuelles femelles et notamment les œstrogènes étaient alors soupçonnées d’être la cible privilégiée des perturbateurs endocriniens. C’est pourquoi son équipe s’est engagée dans le Programme national de recherche PNR50 intitulé «Perturbateurs endocriniens: Importance pour les être humains, les animaux et les écosystèmes» et auquel participent 26 groupes de recherche pour étudier les différents aspects de ce sujet à partir du poisson zèbre [1].

La différenciation sexuelle des poissons. Si l’on souhaite comprendre les raisons des anomalies au niveau des organes reproducteurs, il est tout d’abord nécessaire de bien comprendre les processus conduisant à une différenciation sexuelle normale. De

manière générale, on considérait dans la littérature que le poisson zèbre formait des organes sexuels femelles lorsque le taux d'œstrogènes dans le cerveau était élevé au cours d'une certaine phase de développement et que de faibles niveaux d'œstrogènes entraînaient à l'inverse la formation d'organes mâles. On supposait qu'un certain enzyme jouait un rôle clé dans la biosynthèse des œstrogènes. Evi Kallivretaki a consacré sa thèse de doctorat à la vérification de cette hypothèse. Ses résultats montrent que ce processus est autrement plus complexe qu'on ne le pensait et qu'il exige probablement l'action concomitante des hormones sexuelles et celle de divers autres facteurs finement coordonnés entre eux (voir article page 16).

Pas d'organe sensoriel de la ligne latérale sans récepteurs aux œstrogènes. Les œstrogènes ne peuvent en général assurer leurs fonctions régulatrices dans les différents organes que s'ils sont reconnus dans les cellules par des récepteurs spécifiques pour finalement déclencher l'expression de gènes particuliers. Mais que se passe-t-il si on neutralise ces récepteurs à œstrogènes dans la phase délicate de l'embryogénèse où se forment les organes sexuels? « Nous avons été particulièrement surpris de constater que les poissons zèbres privés de récepteurs œstrogéniques fonctionnels ne pouvaient plus nager que de façon circulaire et qu'ils avaient manifestement perdu le sens de l'orientation », raconte Mirjam Fröhlicher, doctorante qui se trouve actuellement en phase de rédaction de ses résultats. Elle a immédiatement pensé que l'aberration du comportement natatoire pouvait être due à une altération de la ligne latérale, organe qui confère aux poissons une sorte de toucher à distance et leur permet de s'orienter dans l'espace. Des observations détaillées à ce niveau ont effectivement confirmé ces soupçons : les poissons zèbres présentant un comportement natatoire circulaire se sont avérés privés de neuromastes, les unités sensorielles de la ligne latérale (voir article page 18). Le fait que les œstrogènes jouent un rôle important dans la mise en place de la ligne latérale a d'autre part été confirmé par une différente série d'essais dans laquelle des poissons zèbres dont l'expression d'un des deux gènes clés de la biosynthèse des œstrogènes avait été bloquée possédaient nettement moins de neuromastes que les témoins (voir article

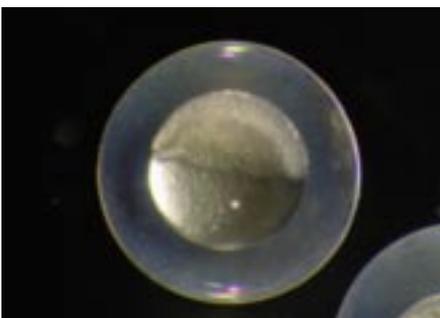
Les dioxines

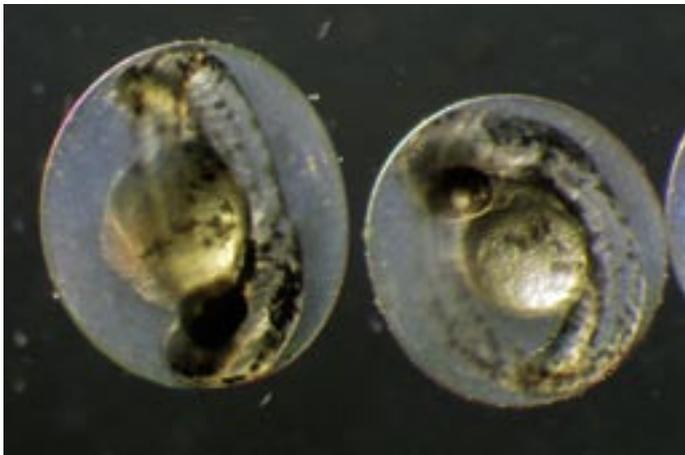
Sur le plan chimique, on distingue deux classes de dioxines : celles dérivant de la dibenzo-para-dioxine et celles possédant un squelette dibenzofurane. La molécule de loin la plus toxique de cette famille est la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-para-dioxine, tristement connue sous le nom de dioxine de Sévésco. C'est en effet dans cette ville du nord de l'Italie qu'en 1976 de grandes quantités de ce composé ont été libérées à partir du réacteur endommagé d'une usine de produits organochlorés. Les dioxines sont des produits secondaires involontaires de certains processus de combustion ou de synthèse chimique : mais elles peuvent aussi se former naturellement lors d'éruptions volcaniques ou de feux de forêt. Ces substances ont une durée de vie particulièrement longue, ce qui leur confère la propriété de s'accumuler dans l'environnement et les êtres vivants.

page 16). Dans l'ensemble, ces résultats montrent de manière éclatante que les œstrogènes n'interviennent pas uniquement au niveau du système reproducteur mais, comme certaines études l'avaient déjà indiqué, participent également au développement de certains organes sensoriels.

Effets des dioxines. Une autre manière de mieux cerner l'impact environnemental des perturbateurs endocriniens est de les mettre en contact direct avec un organisme d'étude, en l'occurrence le poisson zèbre. Dans ce contexte, on s'est notamment intéressé au cas des dioxines (cf. encadré) dont l'activité œstrogénique était relatée de manière controversée et contradictoire dans la littérature scientifique. « Les dioxines sont des substances extrêmement dangereuses capables d'intervenir dans le système hormonal dès les concentrations les plus faibles. Je voulais savoir ce qui se passait exactement au niveau moléculaire. » Ksenia Groh défend son point de vue avec énergie. Après ses études à l'université de Moscou, elle est venue préparer une thèse de doctorat

A gauche: stade gastrula précoce (~ 5,7 heures après fécondation); formation des trois feuilletts embryonnaires fondamentaux (ectoderme, endoderme et mésoderme) à partir desquels se formeront les organes. Au milieu: embryon de 24 heures; la corde dorsale – le précurseur de la colonne vertébrale – est déjà bien reconnaissable. A droite: embryons de 2 jours; les ébauches oculaires sont bien visibles.





Embryon de 3 jours juste avant éclosion.



Poisson de 3 jours juste après éclosion.

à l'Eawag, consacrée à l'action des dioxines sur un régulateur moléculaire particulièrement important du système hormonal. Il s'agit du gène clé de la biosynthèse des œstrogènes qui est principalement actif dans les tissus cérébraux des poissons et normalement contrôlé par les œstrogènes. Dans son étude, Ksenia Groh a pu trouver une explication pour le caractère contradictoire des résultats publiés à ce jour sur les dioxines. Un apport extérieur de dioxines peut en effet modifier l'expression du gène clé et de ce fait déstabiliser le système hormonal des poissons (voir article page 20).

Analyse génomique. Le fait que le génome du poisson zèbre ait été l'un des premiers des vertébrés à être entièrement séquencé est un avantage supplémentaire de ce modèle animal. Ainsi, tous les gènes de ce poisson sont connus, ce qui est une condition sine qua non de l'analyse génomique, explique Jules Kemadjou qui a déjà acquis une certaine expérience de ce type d'analyse sur le poisson zèbre dans le cadre d'une thèse de doctorat qu'il a effectuée à l'Université de Karlsruhe. Cette méthode repose sur l'utilisation de puces à ADN sur lesquelles sont fixés des milliers de gènes. A l'Eawag, Jules Kemadjou étudie maintenant l'impact du pétrole brut sur le poisson zèbre. A l'aide des puces à ADN, il cherche à savoir ce qui se produit au niveau moléculaire, c'est-à-dire quels sont les gènes qui sont activés ou réprimés lors d'une exposition à du pétrole brut (voir article page 24).

Analyse protéomique. « Le principe est similaire mais les deux méthodes sont fondamentalement différentes. » A l'aide d'un rapide croquis, Marc Suter, chimiste expert en spectrométrie de masse, explique les différences. Alors que l'analyse génomique s'appuie sur une observation de la totalité des gènes de l'organisme d'étude, c'est à son pool protéique que s'intéresse l'analyse protéomique qui permet de mettre en évidence les protéines dont la synthèse est stimulée ou réprimée dans une situation donnée. Bien que très complexe, l'analyse protéomique a fait des progrès considérables ces dernières années grâce notamment à des avancées au niveau analytique – la mise en évidence des

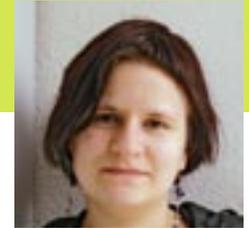
protéines se fait par exemple aujourd'hui par spectrométrie de masse. Marc Suter a récemment passé une année de recherche au Scripps Research Institute de La Jolla aux USA auprès de John Yates, l'un des meilleurs spécialistes mondiaux de l'analyse protéomique. Le but de cette année sabbatique, raconte Suter, était de se familiariser avec tous les aspects de la technique pour pouvoir ensuite l'appliquer à l'Eawag dans le cadre des recherches écotoxicologiques menées sur le poisson zèbre. Les premiers résultats obtenus dans les laboratoires de l'Eawag attestent tout le succès de cette entreprise qui a permis non seulement de pratiquer l'analyse protéomique, mais aussi de lui apporter des améliorations supplémentaires (voir article page 27).

Les pièces du puzzle s'assemblent. « Au cours des dernières années, nous avons beaucoup appris et résolu un certain nombre de questions fondamentales mais nous avons aussi fait quelques découvertes surprenantes. Et comme toujours dans le domaine scientifique, c'est sur un nouveau champ de recherches tout aussi passionnantes qu'elles ont débouché », résume Rik Eggen. Le poisson zèbre s'est en tout cas révélé être un modèle animal de tout premier choix et il continuera d'être utilisé à l'Eawag pour la recherche en écotoxicologie. Enfin, le savoir-faire acquis, qu'il s'agisse du nouveau test moléculaire ou des techniques d'analyse génomique et protéomique sera également mis à profit dans le nouveau centre d'écotoxicologie appliquée cogéré par l'Eawag et l'EPF de Lausanne (voir article page 35). ○ ○ ○

[1] www.nfp50.ch

[2] Plateforme de consensus (2008): Perturbateurs endocriniens dans les eaux usées et dans le milieu aquatique. Programme national de recherches 50. Document final. 16 p. www.nrp50.ch/uploads/media/finaldocumentwater_french.pdf

Des poissons bien soignés



Karin Rüfenacht et Kerstin Dannenhauer sont techniciennes au département de Toxicologie de l'environnement où elles sont responsables de l'élevage des poissons zèbres.

Près de 600 petits poissons zèbres (*Danio rerio*) sont élevés dans les aquariums de l'Eawag. Ils livrent les œufs fécondés dont les chercheurs ont besoin chaque jour pour leurs essais d'écotoxicologie.

8 heures 30. La lumière s'allume dans la salle d'élevage. C'est le signe qu'attendent les poissons zèbres pour entamer leur reproduction. Les femelles déposent leurs œufs dans un cristallisoir placé à cet effet au fond de l'aquarium et les mâles font de leur mieux pour en féconder le plus grand nombre possible. Pour cette activité, les poissons ont besoin d'un calme absolu, le moindre dérangement les pousserait à interrompre aussitôt la ponte et la fécondation. Un mâle peut féconder les œufs de deux femelles qui en pondent de 100 à 200 chacune.

10 heures. C'est maintenant que débute notre travail. Nous commençons par prélever les cristallisoirs contenant les œufs que nous récupérons à l'aide d'un tamis avant de les débarrasser des restes de nourriture et excréments. Les œufs fécondés, d'apparence translucide, sont ensuite séparés des œufs non fécondés restés blancs puis confiés aux chercheurs ayant prévu des essais dans la journée.

10 heures 15. Tous les deux ou trois mois, une partie des œufs fécondés est utilisée pour élever de nouveaux poissons zèbres. Un jour après fécondation, les œufs sont décolorés avec une solution diluée d'hypochlorite de sodium qui permet d'éliminer d'éventuels germes pathogènes fixés à leur surface. Ils sont ensuite placés par groupes de 15 à 20 dans des bacs de quarantaine où leur développement se poursuit. L'éclosion se produit à peine un jour plus tard mais les poissons sont maintenus dans les bacs pendant 14 jours supplémentaires au cours desquels ils sont nourris avec un aliment de démarrage pour jeunes alevins. Leur maturité sexuelle est atteinte au bout de 3 à 6 mois.

10 heures 30. Les poissons sont nourris tous les matins avec des nauplies d'Artémia fraîchement écloses ; ce sont des larves d'un petit crustacé Phyllopode. Pour leur production, nous préparons tous les matins un nouveau ballon d'œufs d'Artémia qui fourniront la nourriture du lendemain. Les artémies plus âgées – les crusta-

Les femelles de poisson zèbre pondent dans des cristallisoirs remplis de galets de verre.



Photos: Ruedi Keller, Zürich

Le plat préféré du poisson zèbre est la larve fraîchement éclosée d'Artémia, un petit crustacé.





Pour que les poissons ne manquent jamais de nourriture fraîche, un nouveau ballon d'œufs d'Artémia est préparé toutes les demi-journées.

cés périssent au bout d'à peine 40 heures et sont ensuite colonisés par des champignons – et les œufs non éclos seraient très indigestes pour les poissons zèbres dont ils pourraient dans le pire des cas entraîner la mort.

10 heures 45. Pendant et après la distribution de nourriture, nous examinons les poissons zèbres de très près: Présentent-ils des signes de maladie? Sont-ils tous indemnes ou certains sont-ils blessés suite à d'éventuelles luttes avec leurs congénères? Le bac contient-il même des poissons morts? Les individus suspects sont retirés du bassin et euthanasiés par application d'un anesthésiant sur-dosé. La maladie la plus grave pouvant affecter le *Danio zébré* est la tuberculose des poissons, reconnaissable à un gonflement de la partie abdominale, un hérissément des écailles et une protubérance des yeux. La tuberculose pisciaire étant particulièrement contagieuse, il peut s'avérer nécessaire d'euthanasier l'ensemble des poissons d'un bac – une tâche qui nous coûte particulièrement, nous qui en sommes un peu les « nounous ».

11 heures. Etant donné que nous devons rendre compte à l'office vétérinaire du canton de Zürich, nous dressons un procès-verbal très détaillé du nombre de poissons morts de cause naturelle ou

non, ainsi que du nombre de poissons utilisés pour les études expérimentales.

15 heures 30. Ce n'est que dans l'après-midi que nous ne revenons à la salle d'élevage. Les poissons zèbres reçoivent maintenant en plus de nauplies d'Artémia un cocktail vitaminé qui doit les fortifier. Comme le matin, un nouveau ballon d'œufs d'Artémia est préparé pour la distribution de larves fraîchement écloses du lendemain après-midi. Le week-end, les poissons sont généralement nourris avec moins de régularité.

16 heures. Des apports d'eau fraîche sont réalisés une fois par jour dans les bacs qui sont par ailleurs nettoyés à la main une fois par semaine. Les restes de nourriture et les excréments sont alors retirés et environ 20 % de l'eau est remplacée. Pour terminer, les cristallisoirs sont replacés au fond des aquariums en vue de la ponte du lendemain matin. Cette étape marque la fin de notre journée de laboratoire et c'est avec un dernier regard scrutateur que nous prenons congé de nos protégés.

22 heures 30. L'obscurité gagne la salle d'élevage et les poissons zèbres se préparent à passer la nuit. ○○○

Un nouveau test de toxicité : le MolDarT



Jane Muncke, spécialiste en sciences de l'environnement, a terminé fin 2006 une thèse menée sur ce sujet au département de Toxicologie de l'environnement.

De nombreux tests de toxicité utilisent des poissons adultes comme sujets d'étude et se servent de la mortalité comme seul critère d'évaluation des substances. Cette approche ne leur permet pas d'indiquer à quel niveau les organismes exposés sont agressés. Nous avons mis au point un nouveau test qui renseigne sur les effets toxiques au niveau moléculaire et ne nécessite pas l'exposition de sujets adultes.

Plus de cent mille produits chimiques à usage commercial sont actuellement enregistrés dans l'Union européenne [1]. La nouvelle réglementation européenne REACH (Registration, Evaluation and Autorisation of Chemicals [2]) entrée en vigueur le 1^{er} juin 2007 prévoit une évaluation toxicologique de ces substances qualifiées d'existantes et des substances nouvelles, natives ou intermédiaires dès lors qu'elles sont produites en quantités supérieures à 1 tonne par an. On estime à 30000 le nombre de substances concernées. L'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) propose un certain nombre de tests qui permettent d'évaluer la toxicité aiguë ou chronique des composés en exposant des poissons adultes à une eau polluée pendant respectivement 96 heures et 14 jours ou plus. Le seul critère toxicologique pris en compte est la mortalité, issue générale et intégrative de l'exposition qui dépend de la concentration et de la toxicité des composés testés. Ces essais *in vivo* sont très demandeurs de temps et posent des problèmes éthiques certains. D'autre part, s'ils permettent d'obtenir la dose létale, ils ne donnent aucune information sur le mode d'action des substances testées. Nous avons donc cherché à développer un test qui soit à la fois rapide et non dépendant de poissons adultes et qui permette en même temps d'étudier les effets de produits chimiques au niveau moléculaire.

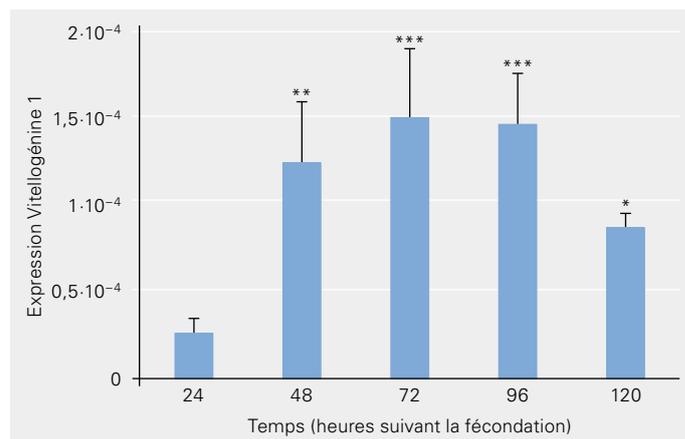
Notre idée de départ: combiner les avantages des tests *in vivo* et *in vitro*. Des efforts sont entrepris depuis plusieurs années pour identifier au niveau moléculaire les points d'impact des substances toxiques afin de mieux comprendre leurs mécanismes d'action [3]. Les tests utilisés pour ces études sont en général effectués *in vitro* (en éprouvette) sur des organismes unicellulaires (bactéries, levures), des cultures de cellules ou des composants cellulaires et non *in vivo* sur des organismes complexes. Ils permettent de détecter des effets biomoléculaires spécifiques comme par exemple le test YES (« Yeast Estrogen Screen » [4]) qui signale une activité œstrogène des polluants par un changement de couleur après exposition de levures génétiquement modifiées.

Les principaux avantages des tests *in vitro* sont la rapidité, l'emploi de faibles quantités de matériel vivant et le non recours

aux animaux de laboratoire. Leur inconvénient est d'être peu transposables au milieu biologique réel. Il faudrait en effet pour cela supposer que les effets observés chez les organismes unicellulaires se produisent également chez les vertébrés, alors que les processus complexes d'absorption de substances et leur transformation dans le métabolisme manquent totalement chez ces organismes simples et que ces deux processus sont justement ceux qui influent le plus fortement sur l'impact toxique des polluants sur les organismes supérieurs. L'idéal serait donc un système d'évaluation réunissant les avantages des tests *in vivo* classiques et des tests moléculaires *in vitro*.

Le poisson zèbre, un organisme modèle de choix. Le test DarT (Danio rerio teratogenicity assay) [5] est utilisé depuis plusieurs années en écotoxicologie pour déterminer la toxicité aiguë des substances chimiques. Contrairement aux autres essais biologiques réalisés avec des poissons, ce test ne recourt pas à des sujets adultes mais à des œufs et embryons. Le développement des œufs de poisson zèbre est très rapide puisque l'éclosion se

Fig. 1 : Expression naturelle du gène indicateur Vitellogénine 1 au cours du développement des embryons de poisson zèbre. Les valeurs suivies d'astérisques présentent une différence significative par rapport à celle obtenue au bout de 24 heures ; * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ et *** = $p < 0,001$.





Le poisson zèbre a besoin de chaleur. La température de la salle des aquariums est maintenue à 29°C.

produit au bout de 48 heures seulement après fécondation. Les embryons sont alors entièrement formés, différents types de tissus étant déjà reconnaissables et certains organes présentant déjà une différenciation bien avancée. Le test DarT permet de mettre en évidence des perturbations du développement comme par exemple un détachement prématuré de la queue du sac vitellin et d'étudier la mortalité chez les embryons exposés à des produits chimiques. Le protocole expérimental du test DarT est standardisé par une norme allemande (DIN) [6].

Depuis quelques décennies, l'emploi du poisson zèbre *Danio rerio* s'est par ailleurs généralisé dans le domaine des sciences de la vie où il s'est établi comme un modèle de tout premier ordre. Son génome est ainsi l'un des rares à avoir été totalement séquencé chez les vertébrés et de nombreuses méthodes de biologie moléculaire ont été développées spécialement à son effet. Le nouveau système d'évaluation développé à l'Eawag est basé sur le même principe que le DarT mais a été étendu aux effets moléculaires déjà détectables à des niveaux de toxicité subaigus. Il a été baptisé pour cela « test moléculaire de tératogénicité avec le *Danio rerio* » ou en plus court MolDarT [7, 8].

Comment le MolDarT fonctionne-t-il? Le MolDarT tire ses conclusions du comportement de gènes dont l'expression est stimulée ou réprimée par certaines substances chimiques. L'expression de ces gènes dits indicateurs est révélée par les ARNm qui interviennent lors de la synthèse des protéines à partir des gènes. Par comparaison avec des témoins non exposés, il est possible d'estimer si une exposition aux produits chimiques testés

a une influence sur la quantité d'ARNm et donc sur l'expression du gène indicateur.

Le test MolDarT est d'une pratique relativement simple: des œufs de poisson zèbre fraîchement fécondés sont maintenus par groupes d'une cinquantaine d'individus dans des boîtes de Pétri emplies d'eau polluée. Etant donné que le MolDarT se pratique dans un domaine de concentrations correspondant à des effets subaigus, les témoins et les sujets exposés ne se distinguent pas sur le plan morphologique et comportemental. Au bout de 120 heures ou 5 jours d'exposition, la totalité de l'ARNm est extrait des embryons et la quantité correspondant à chaque gène indicateur déterminée par PCR en temps réel. Pour compenser les erreurs dues aux pertes se produisant lors de l'isolement et du traitement de l'ARNm, une normalisation interne est effectuée en mettant en relation l'expression des gènes indicateurs avec celle d'un gène dit domestique, c'est-à-dire exprimé indépendamment du type de cellule, du stade de développement cellulaire et des influences extérieures, et donc non influençable par les polluants.

Le premier gène indicateur du MolDarT: celui de la vitellogénine.

Nous avons cherché à savoir si le gène Vitellogénine 1, un gène déjà très bien étudié, pouvait servir d'indicateur d'activité œstrogène dans le cadre du MolDarT. Ce gène codant pour une protéine vitelline voit son activité régulée par les œstrogènes endogènes. Il n'est normalement exprimé que chez les femelles adultes mais une induction a également pu être constatée chez les mâles lorsqu'ils entrent en contact avec des substances à activité œstrogène dans leur environnement [9].

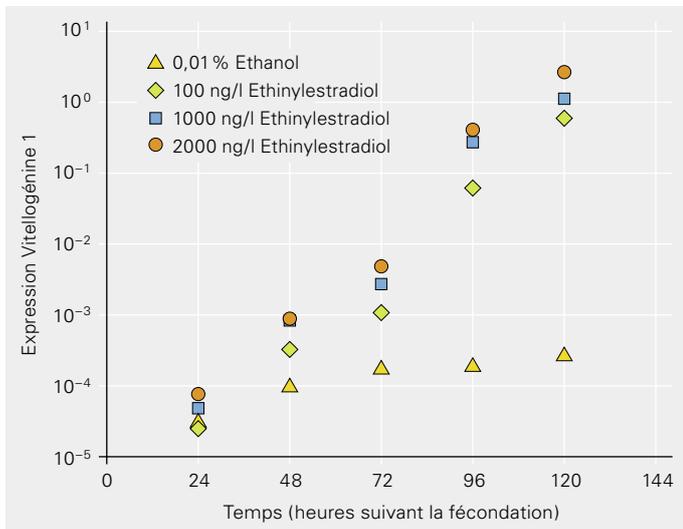


Fig. 2: Expression du gène indicateur Vitellogénine 1 dans des embryons de poisson zèbre exposés pendant des durées variables à différentes concentrations d'éthinylestradiol. L'écart-type ne dépasse pas 30 %.

Avant de procéder à de premiers essais d'exposition, nous avons vérifié que le gène de la vitellogénine était exprimé après fécondation dans les œufs et embryons de poisson zèbre non encore sexuellement différenciés.

Quatre heures après fécondation, aucun ARN messager de vitellogénine n'était encore détectable. On observe cependant au bout de 24 heures une augmentation de l'activité du gène de la vitellogénine qui reste à un niveau élevé entre les 48 et 120 heures qui suivent la fécondation (Fig. 1).

Les œstrogènes et autres perturbateurs endocriniens activent le gène de la vitellogénine. Comment l'expression du gène de la vitellogénine se comporte-t-elle lorsque les œufs de poisson zèbre entrent en contact avec des œstrogènes et autres perturbateurs endocriniens? Nous avons traité cette question à partir de substances à activité œstrogène dont la présence est fréquemment détectée dans le milieu aquatique.

Nos résultats montrent que l'éthinylestradiol, hormone synthétique utilisée dans la pilule contraceptive, stimule effectivement l'activité du gène de la vitellogénine et que son degré d'expression dépend aussi bien de la durée d'exposition que de la concentration de polluant (Fig. 2). Un comportement similaire est observé pour l'œstradiol, œstrogène naturel de l'organisme. Il s'avère d'autre part que la vitellogénine est induite par le bisphénol A, composé utilisé en grandes quantités pour la fabrication des plastiques de type polycarbonate. Le bisphénol A est l'un des produits chimiques les plus abondamment produits au monde.

L'activité œstrogène de l'éthinylestradiol, de l'œstradiol et du bisphénol A avait déjà été révélée par le test YES et se voit donc ici confirmée. Par contre, pour d'autres substances connues pour leurs effets endocriniens comme par exemple le fongicide cyproconazole, aucune induction du gène de la vitellogénine n'a pu être observée avec le MolDarT. Le cyproconazole, qui présentait une

activité dans le test YES, est probablement métabolisé par le poisson zèbre en des composés inactifs sur le plan endocrinien. Cet exemple montre qu'en tant que test *in vivo*, le MolDarT est mieux à même de rendre compte des conditions régnant dans la réalité que les tests *in vitro* tels que le YES.

Le MolDarT peut être étendu à volonté et adapté aux problématiques les plus spécifiques. Il est en principe possible d'étudier autant de gènes indicateurs qu'on le désire lors d'une même exposition. Le MolDarT peut ainsi être modifié pour tenir compte de nouveaux apports de la recherche ou pour répondre à des questions spécifiques. Jusqu'à présent, quatre modules ont été établis à l'Eawag (voir aussi l'article d'Anja Liedtke, p. 13) :

- ▶ Activité œstrogène (gène Vitellogénine 1).
- ▶ Immunotoxicité (gène de recombinaison RAG-1).
- ▶ Métallotoxicité (gène Métallothionéine 2).
- ▶ Toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques comme les dioxines (gène Cytochrome P450 1A1).

Le MolDarT permet de réaliser en peu de temps et de moyens un criblage ciblé de substances chimiques avec de faibles quantités de matériel cellulaire et surtout sans faire appel à des sujets adultes. Même si la pertinence écologique des gènes indicateurs étudiés jusqu'à présent reste encore à démontrer, le MolDarT présente donc tout le potentiel souhaitable pour pouvoir réaliser l'évaluation de la multitude de substances non encore testées demandée par la nouvelle réglementation européenne REACH sur les produits chimiques. De plus, le MolDarT peut être utilisé pour l'évaluation écotoxicologique d'échantillons pollués de composition inconnue.



- [1] <http://ecb.jrc.it/esis/>
- [2] http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm
- [3] Schweigert N. (2001) : Comment détecter l'effet des polluants sur les cours d'eau? Eawag News 51, 10–12.
- [4] Routledge E.J., Sumpter J.P. (1996) : Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 (3), 241–248.
- [5] Nagel R. (2002) : DarT: The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex-Alternativen zu Tierexperimenten* 19, 38–48.
- [6] DIN-Norm 38415-6 (2003) : DarT-Test: Suborganismische Testverfahren (Gruppe T), Teil 6: Giftigkeit gegenüber Fischen; Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser auf die Entwicklung von Fischeiern über Verdünnungsstufen (T 6).
- [7] Muncke J., Eggen R.I.L. (2006) : Vitellogenin 1 mRNA as an early molecular biomarker for endocrine disruption in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25 (10), 2734–2741.
- [8] Muncke J., Junghans M., Eggen R.I.L. (2007) : Testing estrogenicity of known and novel (xeno-)estrogens in the MolDarT using developing zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* 22 (2), 185–193.
- [9] Sumpter J.P., Jobling S. (1995) : Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103, 173–178.

Malformations chez les corégones du lac de Thoune



Anja Liedtke, biologiste, est chercheur au sein département de Toxicologie de l'environnement.

Pour une raison inconnue, d'étranges déformations des organes génitaux ont été observées depuis l'année 2000 chez les corégones du lac de Thoune. Des modifications d'ordre génétique, de maladies infectieuses ou de polluants toxiques sont entre autres considérés comme cause. L'Eawag teste actuellement l'hypothèse « polluants » en faisant appel pour la première fois à un essai biologique d'exposition de poissons zèbres développé dans ses laboratoires.

Le lac de Thoune renferme un secret. Une grande partie des corégones qui le peuplent présentent en effet des déformations inquiétantes des gonades (testicules, ovaires) (cf. encadré et Fig. 1). Depuis l'apparition des premiers symptômes chez les poissons, en 2000, ce phénomène unique en son genre a fait l'objet d'études poussées qui n'ont cependant pas encore permis d'en déceler la cause. L'une des hypothèses en cours suppose que les modifications gonadiques pourraient résulter de l'action de polluants présents seuls ou en mélange dans le milieu aquatique. Une identification des composés responsables a été tentée par voie d'analyse chimique mais cette approche s'est bientôt avérée insuffisante puisque ne permettant la détection que de substances déjà connues. Notre objectif est donc maintenant de tester

les effets d'échantillons prélevés dans différents compartiments du lac sur des organismes indicateurs afin de limiter les analyses chimiques aux seuls échantillons actifs. La méthode choisie fait appel pour la première fois au test MolDarT développé à l'Eawag et basé sur l'étude des effets au niveau moléculaire chez le poisson zèbre (voir également l'article de Jane Muncke, p. 10).

Un large éventail d'échantillons. Pour obtenir une vision complète de l'impact du lac de Thoune, nous avons effectué pendant deux ans (2005 et 2006) des prélèvements dans tous les compartiments avec lesquels les corégones entrent en contact au cours de leur cycle de vie :

- ▶ Les sédiments dans lesquels se développent les larves.
- ▶ Le plancton à la base de l'alimentation des corégones.
- ▶ L'eau, milieu omniprésent et habitat permanent des poissons.

Nous avons d'autre part analysé les tissus musculaires des corégones étant donné l'éventualité d'une accumulation des polluants absorbés.

Avant d'être soumis à un test biologique, tous les échantillons doivent subir un prétraitement spécifique qui consiste en général à en extraire les substances actives à l'aide de solvants organiques, ceci afin d'obtenir un extrait liquide à analyser.

Des apports de polluants dans le lac de Thoune. Deux événements par lesquels des polluants ont été apportés au lac de Thoune sont régulièrement cités dans la presse comme cause potentielle des modifications gonadiques: l'immersion de quantités importantes de munitions entre autres dans la Beatenbucht par l'armée suisse de 1920 à 1963 d'une part et le déversement des effluents traités du chantier de la ligne NLFA du Lötschberg pendant la construction de la voie dans la Kander, un affluent du lac, d'autre part.

Bien qu'il soit improbable que les apports très localisés aient une influence sur les corégones de l'ensemble du lac, nous avons également prélevé des échantillons dans les sédiments de la Beatenbucht et voulions analyser les eaux de la Kander en aval du point de déversement des effluents de chantier. Des échantillonneurs particuliers devaient pour cela être maintenus plusieurs mois dans la rivière afin de concentrer les polluants

Fig. 1 : Organes sexuels de corégones du lac de Thoune présentant différentes formes d'anomalies. (A) Ovaires normaux; (B) Ovaires asymétriques; (C) Hermaphrodisme: le même organe sexuel comporte à la fois des tissus ovariens et testiculaires; (D) Testicules normaux; (E) Testicules compartimentés; (F) Adhérence: testicule soudé à la paroi abdominale. Taille des gonades: env. $\frac{1}{3}$ de la longueur des individus, soit ici de 7 à 10 cm.



Photos: D. Bernet, Universität Bern

Des malformations multiples chez les corégones du lac de Thoune

Environ 40% des mâles et 26% des femelles du lac de Thoune présentent des anomalies au niveau des testicules ou des ovaires [1]. Une hypotrophie des gonades, une perte de leur disposition paire ou encore une adhérence avec la paroi abdominale sont fréquemment observées. Les testicules et moins souvent les ovaires peuvent présenter des étranglements pouvant aller jusqu'à une compartimentation totale. Des cas d'hermaphrodisme sont également observés : ils se caractérisent par la présence concomitante d'un testicule et d'un ovaire dans un même individu ou des deux types de tissus dans un même organe.

éventuellement véhiculés par les eaux. Les appareils ont malencontreusement été entraînés par le courant aussi bien en 2005 qu'en 2006, ce qui nous interdit toute conclusion sur ce site.

Premiers indices fournis par des levures exposées dans le cadre d'essais biologiques. Etant donné que les anomalies présentées par les corégones se limitent exclusivement aux organes génitaux, nous avons supposé une implication de substances à activité endocrinienne. Cette famille de composés comprend non seulement des hormones sexuelles naturelles telles que l'œstradiol et la testostérone ou de synthèse telles que l'éthinylestradiol utilisé à des fins contraceptives, mais aussi des substances non apparentées aux hormones sexuelles mais présentant une activité similaire telles que le bisphénol A ou les phtalates. La mise en œuvre d'une batterie de tests YES/YAS (Yeast Estrogen Screen/ Yeast Androgen Screen) recourant à des levures génétiquement modifiées permet de savoir si un échantillon contient des perturbateurs endocriniens.

Les essais biologiques n'ont pas révélé la présence de ce type de substances dans les échantillons d'eau et de tissus musculaires. Par contre, une activité œstrogénique a été observée avec les échantillons de plancton et les sédiments prélevés en 2006. De même, les extraits de sédiments collectés en 2005 ont livré des résultats frappants : en effet, même s'ils ne présentaient pas d'effets œstrogènes, ils ont provoqué la mort d'une grande partie

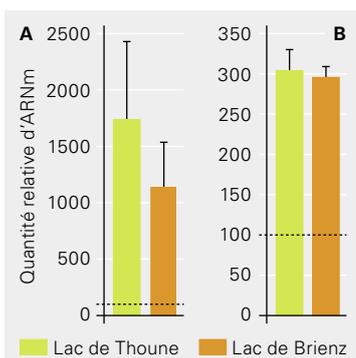


Fig. 2: Activités du gène de la vitellogénine indicateur d'activité œstrogène (A) et du gène du cytochrome P450-1A1 indicateur de dioxines (B) après exposition d'embryons de poissons zèbres à des extraits de plancton issus des lacs de Thoune et de Brienz. L'expression des gènes est indiquée par un pourcentage correspondant à la quantité relative d'ARNm par rapport aux témoins exposés aux solvants seuls (fixés à 100%, ligne horizontale).

des cellules de levure exposées, ce qui révèle une forte toxicité du substrat. Au vu de ces résultats, nous avons concentré les études suivantes sur les échantillons de plancton et de sédiments.

Analyse des échantillons de plancton avec le test MolDaT.

Les effets œstrogènes du plancton se manifesteraient-ils également dans un organisme complexe comme celui d'un poisson proche des corégones? Il est en effet pensable que les substances actives ne soient pas absorbées par les poissons ou qu'elles soient métabolisées avant de manifester leur toxicité. Nous avons utilisé le test moléculaire développé pour le poisson zèbre pour tenter de répondre à cette question.

Dans le test MolDaT, des œufs et larves de poisson zèbre sont exposés pendant 5 jours aux extraits de plancton avant qu'une recherche d'effets soit effectuée au niveau moléculaire. Dans notre cas, deux gènes marqueurs ont été étudiés : le gène de la vitellogénine qui est activé en présence de substances à activité œstrogène et un gène de la famille des cytochromes P450 (cyp1A1) dont l'expression est stimulée par les substances de type dioxine. Pour ces essais, une homogénéisation préalable a été effectuée sur le plancton collecté en 2005. Référence a été prise sur le plancton du lac de Brienz, voisin du lac de Thoune auquel il est relié par l'Aar. Les deux lacs sont exposés aux mêmes influences environnementales.

Les gènes indicateurs d'activité œstrogène et de dioxines ont tous deux été exprimés dans les larves de poisson zèbre après exposition aux échantillons de plancton. Plus surprenant a été le fait que ces deux gènes ont également été activés par les extraits planctoniques du lac de Brienz, notre lac de référence (Fig. 2). Ce résultat indique que les échantillons de plancton des deux lacs contiennent fort probablement des perturbateurs endocriniens et des composés de type dioxine mais que ces substances ne constituent pas le facteur déclenchant des malformations chez les corégones du lac de Thoune.

Quelle est la toxicité des sédiments? Pour tenter de répondre à cette question, des groupes de 15 œufs de poisson zèbre ont été placés une heure après fécondation en milieu saturé d'air sur les différents échantillons de sédiments [2]. Ce dispositif a été conçu pour simuler les conditions naturelles qui règnent lors du développement des poissons. Pour les témoins, nous avons utilisé d'une part du sable siliceux pur, d'autre part des sédiments du lac de Brienz.

Au bout de 48 heures, à la date naturelle d'éclosion, les embryons exposés ont été répartis en trois catégories : « éclos », « non éclos » et « morts » (Fig. 3). Les résultats obtenus avec le sable pur indiquent que les conditions du test de contact avec les sédiments n'étaient pas optimales puisque 35% des embryons ne survivent pas aux 48 heures d'exposition. Des taux de mortalité tout aussi élevés sont observés avec les sédiments des lacs de Thoune et de Brienz, ce qui semble indiquer que l'oxygénation du milieu était insuffisante.

Une conclusion importante peut cependant être tirée de notre expérience : les embryons exposés aux sédiments présentent un net retard de développement par rapport au sable siliceux. En effet, aucune larve n'a pu être détectée sur sédiment au bout

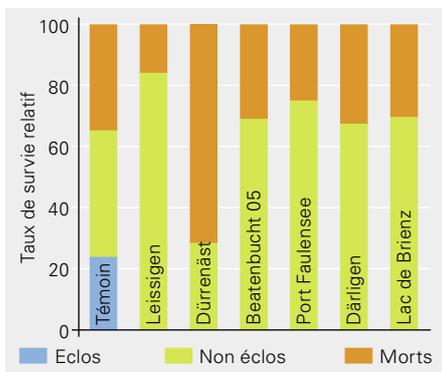


Fig. 3: Taux de survie ou d'éclosion d'œufs de poisson zèbre après 48 heures d'exposition à des sédiments prélevés en 2005 sur 5 sites du lac de Thoue. 100% = nombre d'embryons vivants au bout de 24 heures d'exposition.

de 48 heures, alors que 20% des œufs avaient éclos sur sable après la même période d'incubation. Les sédiments des lacs de Thoue et de Brienz renferment probablement des composés indésirables susceptibles de freiner le développement des poissons zèbres.

Une expression modifiée chez les larves de poisson zèbre exposées aux sédiments lacustres.

Les œufs de poisson zèbre non encore éclos au bout de 48 heures ont été laissés sur les sédiments quatre jours supplémentaires. Ensuite, comme dans les MolDarT, l'expression de gènes particuliers a été étudiée dans les larves survivantes (Fig. 4) [3]. Les gènes de la vitellogénine, indicateur d'activité œstrogène et du cytochrome P450 1A1, indicateur de dioxines, ont été à nouveau choisis comme gènes marqueurs en complément de trois autres gènes :

- ▶ le gène de l'hème oxygénase-1 qui est exprimé en situation de stress de quelque nature que ce soit ;
- ▶ le gène de recombinaison rag 1 (recombination activating gene 1) impliqué dans la mise en place du système immunitaire ;
- ▶ et le gène 2 de la métallothionéine qui joue un rôle dans l'auto-régulation des teneurs en métaux dans l'organisme.

Malencontreusement, seules 1 à 2 larves ont survécu aux 6 jours d'exposition aux échantillons de sédiments de 2005 dont une toxicité significative avait été révélée par le test sur levures. L'analyse moléculaire s'est donc avérée impossible à réaliser. Par contre, la mortalité a été plus faible sur les échantillons de 2006

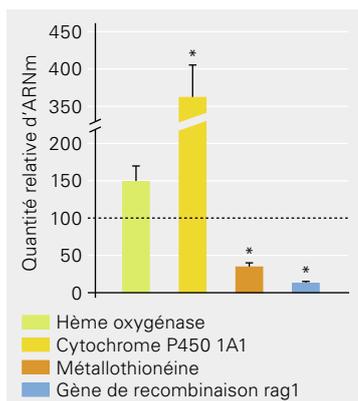


Fig. 4: Activités de 4 gènes marqueurs (détails dans le texte) après exposition *in vitro* d'embryons de poisson zèbre à des sédiments prélevés en 2006 dans la Beatenbucht (lac de Thoue). L'expression des gènes est indiquée par un pourcentage correspondant à la quantité relative d'ARNm par rapport aux témoins exposés aux solvants seuls (fixés à 100%, ligne horizontale). Astérisques : différences significatives.

et il a été possible de collecter suffisamment de matériel pour analyser l'expression des gènes. En 2006, nous avons concentré nos prélèvements sur la Beatenbucht où 5 sites différents avaient été choisis.

Nos résultats (Fig. 3) montrent que le gène de la vitellogénine n'a pas été activé et ne permettent donc pas de confirmer chez les poissons zèbres l'effet œstrogène observé chez les levures après exposition aux sédiments. De même, la transcription du gène de l'hème oxygénase-1 ne semble pas affectée par les échantillons. A l'inverse, nous avons observé une stimulation de l'expression du gène codant pour le cytochrome et une inhibition de la transcription des gènes de recombinaison et de la métallothionéine. Les sédiments semblent donc contenir des substances de type dioxine ainsi que des composés affectant les teneurs en métaux dans l'organisme et interférant dans le développement du système immunitaire des poissons.

Poursuite des travaux. Partant des effets constatés lors des essais biologiques, nous allons maintenant procéder à une caractérisation chimique des polluants impliqués. Pour ce faire, les extraits complexes d'échantillons vont être fractionnés, par exemple en fonction de la polarité et de la masse moléculaire des leurs composants, les fractions obtenues étant à leur tour contrôlées par des bioessais. La fraction produisant alors des effets sera ensuite soumise à une analyse plus poussée, le processus de purification étant répété jusqu'à obtention d'une substance unique ou d'un mélange limité de substances ayant le même effet que l'extrait de départ.

Même si les résultats alors obtenus ne prouvent pas irréfutablement que les polluants identifiés sont effectivement responsables des anomalies gonadiques observées chez les corégones, puisque les tests ont été effectués sur des levures et des poissons zèbres et non sur des corégones, les indices collectés seraient bien probants.

Ce projet est mené en commun par le Centre pour la médecine des poissons et des animaux sauvages (FIWI) de l'Université de Berne et l'Eawag. Il s'intègre dans le Programme national de recherche « Perturbateurs endocriniens : importance pour les êtres humains, les animaux et les écosystèmes » (PNR50) financé par le Fonds national suisse. Il bénéficie d'autre part du soutien de la pisciculture de Faulensee et de l'Inspection de la pêche du canton de Berne ainsi que du Laboratoire de protection des eaux et du sol du canton de Berne.

- [1] Bernet D., Wahli T., Kung C., Segner H. (2004) : Frequent and unexplained gonadal abnormalities in whitefish (central alpine *Coregonus* sp) from an alpine oligotrophic lake in Switzerland. *Diseases of Aquatic Organisms* 61, 137-148.
- [2] Hollert H., Keiter S., König N., Rudolf M., Ulrich M., Braunbeck T. (2003) : A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish embryos. *Journal of Soils & Sediments* 3 (3), 197-203.
- [3] Liedtke A., Muncke J., Rüfenacht K., Eggen R. (2008) : Molecular multi-effect screening of environmental pollutants using the MolDarT. *Environmental Toxicology* 23, 59-67.

Rôle des œstrogènes dans l'organogénèse

L'enzyme clé de la biosynthèse des œstrogènes est la cytochrome P450 aromatase. Elle en catalyse en effet la réaction décisive de transformation des androgènes en œstrogènes et contrôle donc le taux d'œstrogènes dans l'organisme. A partir de l'exemple du poisson zèbre, nous avons cherché à savoir si l'aromatase joue un rôle régulateur dans la formation des organes sexuels et de la ligne latérale.

Les œstrogènes sont des hormones stéroïdes présentes chez tous les vertébrés aquatiques et terrestres [1]. Alors que l'organisme comporte naturellement plusieurs types d'œstrogènes, c'est au 17β -œstradiol que sont attribuables la quasi-totalité des implications biologiques de cette famille de substances. Ainsi, les œstrogènes interviennent notamment dans le contrôle de la différenciation et maturation sexuelles ainsi que dans celui de la reproduction. Mais ils exercent aussi de multiples fonctions régulatrices dans le développement et la différenciation d'autres organes comme, par exemple, au niveau du système nerveux. Pour qu'ils puissent assurer correctement cette multitude de fonctions, leurs niveaux doivent être finement régulés, équilibrés et ajustés tout au long des différentes phases de la vie.

Les œstrogènes se forment à partir du cholestérol au terme d'une série complexe de transformations. Si divers enzymes interviennent dans ce processus biosynthétique, c'est la dernière étape, catalysée par la cytochrome P450 aromatase, au cours de laquelle les androgènes sont transformés en œstrogènes qui détermine finalement leur taux dans l'organisme [2]. Chez le poisson zèbre, deux gènes codent pour cette protéine, le gène *cyp19a1* d'expression majoritairement ovarienne et le gène *cyp19a2* principalement exprimé dans le cerveau. Ces deux gènes constituent une cible potentielle pour toute une série de polluants qui interfèrent de cette manière dans les processus œstrogéno-régulés et exercent alors une activité endocrinienne indirecte. En nous servant du poisson zèbre comme modèle animal, nous avons étudié le rôle de l'aromatase – et par là même des œstrogènes – dans le développement des organes sexuels et de la ligne latérale, organe mécanosensoriel spécifique des poissons [3].

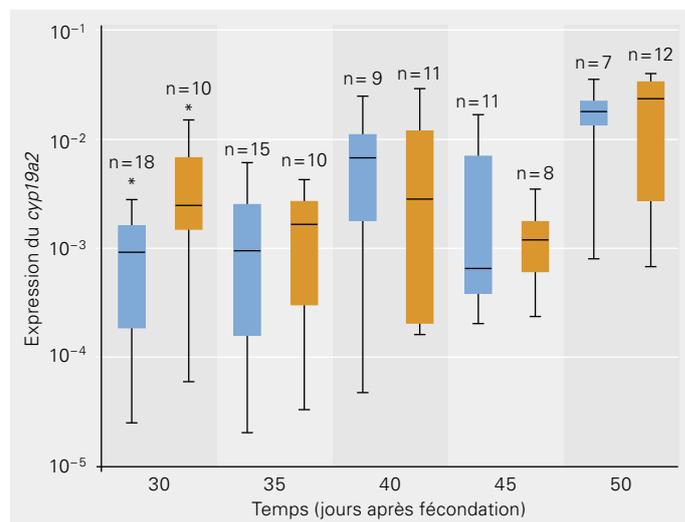
La différenciation sexuelle des gonades est-elle déterminée par *cyp19a2*? Le poisson zèbre est un gonochoriste indifférencié, c'est-à-dire qu'il naît femelle et dispose tout d'abord d'ovaires juvéniles non fonctionnels qui au cours de la maturation se transforment en gonades mâles ou femelles. Au début de notre étude, l'hypothèse la plus répandue était que la différenciation sexuelle des gonades dépendait de la concentration et de la distribution de l'aromatase exprimé dans le cerveau. Elle stipulait donc que plus la fréquence de lecture du gène *cyp19a2* était élevée, plus la te-



Rik Eggen, biologiste moléculaire, a dirigé le département de Toxicologie de l'environnement avant de prendre les fonctions de directeur adjoint de l'Eawag qu'il assume aujourd'hui.
Coauteurs: Evangelina Kallivretaki, Helmut Segner (Université de Berne).

neur des cellules cérébrales en aromatase était forte et donc plus le taux d'œstrogènes était élevé, ce qui conduisait à la formation de gonades femelles. Selon le même raisonnement, de faibles taux d'œstrogènes induisaient inversement la formation de gonades mâles. Nous avons cherché à vérifier le bien-fondé de cette théorie en étudiant des poissons zèbres se trouvant en phase de différenciation gonadique, soit entre le 30^{ème} et le 50^{ème} jour après fécondation. Nous avons prélevé les têtes pour quantifier l'expression de l'aromatase cérébrale à partir de la quantité de transcrits formés (ARNm) et pour caractériser la distribution de l'enzyme dans le cerveau. Les corps ont quant à eux été utilisés pour déterminer le statut sexuel des poissons. Ceux dont les gonades présentaient des parties testiculaires ou qui possédaient déjà des testicules pleinement développés ont été classés parmi

Fig. 1: Expression du gène *cyp19a2* dans le cerveau de jeunes poissons zèbres mâles (barres bleues) et femelles (barres orange). Les limites inférieures et supérieures des barres correspondent respectivement aux quantités minimales et maximales d'ARNm dosées, la ligne tracée à l'intérieur indiquant la moyenne (\pm écart-type). n = nombre de poissons dans chaque groupe d'appartenance sexuelle. * = différence significative de quantité d'ARNm entre les deux sexes au 30^{ème} jour après fécondation ($p < 0,012$).



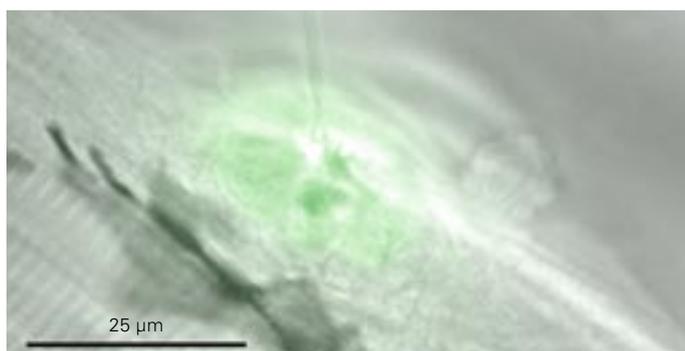
les mâles tandis que ceux disposant encore d'ovaires immatures étaient classés parmi les femelles. Jusqu'au 50^{ième} jour après fécondation environ, les gonades femelles juvéniles conservent la faculté de se transformer en testicules. Ce n'est qu'une fois la maturation des ovocytes amorcée que le sexe des poissons peut être déterminé avec certitude.

L'expression de *cyp19a2* est indépendante du sexe des poissons. Nous avons observé la présence de transcrits de l'aromatase dans la tête des poissons zèbres durant toute la durée de l'étude, leur teneur tendant à augmenter avec le temps. Cependant, tandis que les concentrations d'ARNm présentaient une disparité particulièrement importante au sein d'un même groupe sexuel, aucune corrélation entre les quantités de transcrits de l'aromatase et le sexe des poissons n'a été constatée (Fig. 1). Le gène *cyp19a2* est donc transcrit en continu tout au long de la différenciation sexuelle et son expression est indépendante du sexe des individus. Des observations similaires ont été faites avec les teneurs en protéines (résultats non illustrés). En outre, la répartition de l'aromatase dans les tissus cérébraux des poissons en développement était sensiblement la même chez les deux sexes. Selon le schéma déjà observé chez les poissons adultes, l'enzyme est principalement localisé dans certaines zones du cerveau (télencéphale et diencéphale) et dans l'hypophyse.

Nos résultats indiquent que, contrairement à l'idée première, la différenciation sexuelle du poisson zèbre n'est pas uniquement régulée par l'expression du gène *cyp19a2* et par le taux d'œstrogènes dans l'organisme. Ce processus paraît autrement plus complexe et semble nécessiter l'intervention minutieusement coordonnée de plusieurs gènes et probablement de divers autres facteurs. Partant de cette constatation, nous allons approfondir nos recherches sur le processus de différenciation sexuelle dans le cadre d'un projet financé par le Fonds national suisse.

Le développement de la ligne latérale est-il influencé par *cyp19a1*? Les œstrogènes n'interviennent pas uniquement au niveau de la différenciation sexuelle mais jouent également un rôle important dans le développement des organes sensoriels, ce qui a été notamment démontré chez les poissons. Notre observation

Cellules sensorielles ciliées d'un neuromaste. Superposition d'une image de microscopie optique et d'une photo prise au microscope à fluorescence après marquage des cellules ciliées avec un colorant fluorescent.



Mirjam Fröhlicher, Eawag

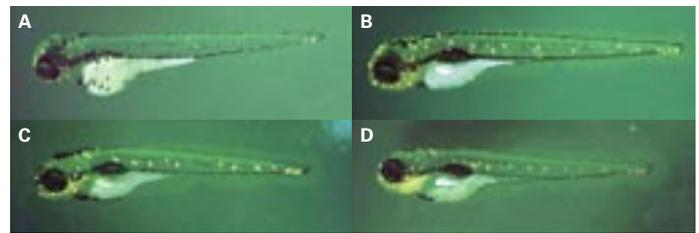


Fig. 2: Effet d'un morpholino «knock-down» sur le nombre de neuromastes dans la ligne latérale. A: embryon traité avec un morpholino anti-*cyp19a1*; B: embryon témoin non traité; C: embryon traité avec un morpholino témoin; D: embryon traité avec un morpholino anti-*cyp19a2*.

d'une expression du gène *cyp19a1* au niveau de la ligne latérale du poisson zèbre est en accord avec ces résultats. Cet organe mécanosensoriel est normalement visible sous la forme de faibles lignes autour des yeux et le long des flancs et permet aux poissons de localiser grâce aux variations de pression dans l'eau les mouvements se produisant dans leur environnement aqueux (voir aussi l'article de M. Fröhlicher, p. 18). Les récepteurs de la ligne latérale, appelés neuromastes, sont chacun constitués d'un groupe de cellules sensorielles, les cellules ciliées. Pour estimer si le gène *cyp19a1* est réellement impliqué dans le développement de la ligne latérale et de ses neuromastes, nous avons réprimé artificiellement son expression par la technique du « knock-down » (cf. encadré p. 18). Pour ce faire, des oligonucléotides antisens appelés morpholinos sont injectés dans des œufs de poissons zèbres dans lesquels ils viennent s'hybrider avec les transcrits du gène *cyp19a1*, bloquant donc la synthèse protéique et réprimant l'activité aromatasase dans les neuromastes.

Une répression de *cyp19a1* induit une réduction du nombre de neuromastes. Notre essai a révélé que les poissons « knock-down » présentaient nettement moins de neuromastes que leurs homologues non traités (Fig. 2A+B). De même, le nombre de neuromastes demeurait inchangé dans les sujets traités avec un morpholino témoin (Fig. 2C) ou formulé pour s'hybrider avec les transcrits de *cyp19a2* (Fig. 2D). Nous en concluons que l'aromatase codée par *cyp19a1* est effectivement impliquée dans le développement de la ligne latérale, ce qui constitue un fait nouveau et tout à fait surprenant. Cette constatation signifie en effet que les perturbateurs endocriniens abondamment présents dans l'environnement aquatique sont non seulement en mesure d'interférer dans le système reproducteur mais peuvent également perturber bien d'autres processus organogénétiques dans l'organisme. ○ ○ ○

- [1] Lange I.G., Hartel A., Meyer H.H.D. (2003): Evolution of oestrogen functions in vertebrates. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83, 219–226.
- [2] Cheshenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O., Eggen R.I.L. (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155, 31–62.
- [3] Kallivretaki E. (2006): Functional significance of aromatase in zebrafish during development. Dissertation, University of Bern, 156 pp.

Des poissons zèbres sans récepteurs d'œstrogènes



Mirjam Fröhlicher, biologiste, prépare une thèse de doctorat au sein du département de Toxicologie de l'environnement.

Les œstrogènes, hormones sexuelles femelles, ne peuvent agir qu'après avoir été reconnus par des récepteurs spécifiques. Mais quel serait l'effet d'une inhibition de la synthèse de ces récepteurs œstrogéniques ? Nous avons étudié cette question en pratiquant une inactivation génique sur le poisson zèbre. L'une des caractéristiques les plus marquantes des poissons ayant subi un tel « knock down » est leur comportement natatoire systématiquement circulaire. Ils s'avèrent en effet dépourvus des organes sensoriels de la ligne latérale nécessaires à leur orientation.

Une présence de perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire de polluants interférant avec le système hormonal, a été constatée dans les eaux du monde entier. Leur toxicité pour les organismes aquatiques se manifeste dès les concentrations les plus faibles en provoquant la synthèse de certaines protéines à la

place d'une hormone naturelle ou en perturbant l'activité d'une hormone endogène. La gravité des dommages dépend du stade de développement de l'organisme lorsqu'il entre en contact avec le perturbateur endocrinien. Si la perturbation intervient lors de l'embryogénèse, pendant la différenciation des organes génitaux et du cerveau, des dommages irrémédiables comme par exemple la féminisation de populations entières peuvent se produire [1].

Une grande partie des substances à activité endocrinienne, les xéno-œstrogènes, c'est-à-dire les substances qui ressemblent aux œstrogènes mais ne proviennent pas de l'organisme, sont reconnues par les récepteurs œstrogéniques (cf. Fig. 1, p. 20). Tout comme leurs homologues endogènes, les xéno-œstrogènes se fixent aux récepteurs et les activent. Le complexe activé se déplace alors dans le noyau des cellules où il se lie à des séquences spécifiques de l'ADN, les éléments de réponse aux œstrogènes situés au niveau des promoteurs de certains gènes dont l'expression est activée par ces complexes récepteur/ligand [2].

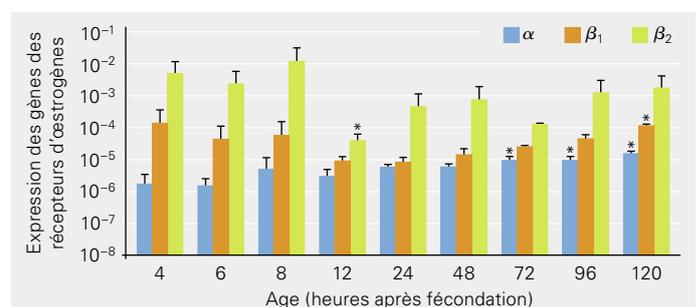
Mais que se passe-t-il suite à une inhibition artificielle de la formation des récepteurs aux œstrogènes et tout particulièrement au moment stratégique de l'embryogénèse ? Pour tenter de répondre à cette question, nous avons choisi de travailler sur des

Le « knock down »

La technologie du morpholino knock down est une technique permettant de bloquer la synthèse de certaines protéines spécifiques à partir de leur gène pour une durée déterminée. Cette inactivation temporaire ou « knock down » du gène est obtenue par injection d'un petit oligonucléotide de synthèse appelé morpholino antisens [3]. Celui-ci est injecté dans le sac vitellin de l'embryon de poisson zèbre au stade de quatre cellules et diffuse ensuite dans tout l'organisme. La séquence du morpholino est complémentaire de celle située au niveau du codon d'initiation du gène à inactiver, ce qui lui permet de s'hybrider avec les transcrits d'ARN messager et d'empêcher leur traduction en protéine. Au bout de cinq jours environ, l'organisme est en mesure de dégrader les oligonucléotides introduits et de reprendre la synthèse de la protéine concernée. Le « knock down » ne doit pas être confondu avec le « knock out » dans lequel la mutation est intégrée au génome et donc transmissible à la descendance.

Pour démontrer que les altérations morphologiques observées après injection du morpholino sont bien spécifiques, on fait appel à un morpholino control. Il s'agit d'un oligonucléotide standard qui ne dispose pas de séquence complémentaire dans l'organisme et ne s'hybride donc pas.

Fig. 1: Expression des trois gènes des récepteurs œstrogéniques α , β_1 et β_2 pendant l'embryogénèse de poissons zèbres. Les différences significatives sont indiquées par un astérisque ($p < 0,05$).



embryons de poisson zèbre. Notre étude s'intègre dans un projet plus vaste qui vise à élucider les aspects moléculaires du système hormonal œstrogénique pour acquérir une base de connaissances permettant de mieux évaluer les effets des polluants à activité endocrinienne (voir aussi les articles de Rik Eggen, p. 16 et de Ksenia Groh, p. 20).

Le récepteur d'œstrogènes β_2 est fortement exprimé lors de l'embryogénèse du poisson zèbre. Le poisson zèbre possède trois types de récepteurs œstrogéniques: α , β_1 et β_2 . Dans une étude préliminaire, nous avons tout d'abord déterminé lequel des trois récepteurs était le plus fortement exprimé lors de l'embryogénèse. Les résultats indiquent que le gène β_2 a été le plus lu pendant les 5 premiers jours après la fécondation puisqu'on a mesuré la plus grande quantité d'ARNm (Fig. 1). C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de réprimer le récepteur β_2 et de faire synthétiser à cet effet un morpholino spécifique anti- β_2 (cf. encadré sur la technique du « knock down »).

Nos résultats suggèrent d'autre part que la quantité d'ARNm de β_2 mesurée est plus importante dans les premières heures qui suivent la fécondation qu'après 12 heures (Fig. 1). Il ne s'agit cependant que de transcrits maternels. Les embryons eux-mêmes ne commencent à réaliser leur propre transcription qu'au bout de ces 12 heures à partir desquelles la concentration d'ARNm de β_2 endogène ne cesse d'augmenter.

Le « knock down » du récepteur d'œstrogène: réduction du taux d'éclosion et comportement natatoire circulaire. Quelles sont les concentrations de morpholino antisens les mieux adaptées pour éliminer le récepteur β_2 ? Nous avons démontré qu'elles se situaient entre 25 et 50 μ M. Dans ce domaine de concentrations, les modifications morphologiques étaient nettement visibles sans que les embryons ne soient trop affectés. A partir de 100 μ M, le morpholino s'avère toxique.

Les embryons de poisson zèbre ayant subi une injection de 25 ou de 50 μ M de morpholino présentaient un comportement natatoire anormal, suivant une trajectoire systématiquement circulaire. De plus, seuls 30 % des œufs exposés à 50 μ M avaient éclos au bout de 72 heures (Fig. 2).

Les poissons zèbres soumis au « knock down » sont dépourvus du sens de l'orientation. Nous avons supposé que l'ano-

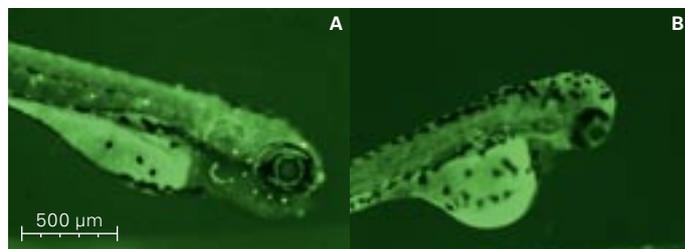


Fig. 3: Neuromastes de la ligne latérale chez le poisson zèbre après injection de morpholino témoin (A). Ils sont absents dans les poissons knock down (B). Concentration de morpholino: 25 μ M.

malie de comportement natatoire des poissons zèbres était due à des modifications de la ligne latérale, véritable système mécanosensoriel qui permet aux poissons de percevoir les vibrations de l'eau et leur permet donc de s'orienter. Le système de la ligne latérale est composé d'organes sensoriels, les neuromastes. Chacun d'eux est composé de cellules ciliées entourées de cellules support et reliées à leur base à des neurones qui réceptionnent les signaux. En temps normal, les poissons zèbres possèdent des neuromastes, aisément détectables après exposition à un colorant fluorescent, au niveau de la tête, autour des yeux et le long de la ligne latérale (Fig. 3 A). Cette image se modifie après le « knock down ». Les neuromastes sont alors soit totalement absents soit affectés dans leur fonctionnement au point de ne plus être détectables avec le colorant (Fig. 3 B).

Les récepteurs aux œstrogènes jouent un rôle important lors de l'organogénèse. Nos résultats révèlent le rôle important que joue le récepteur β_2 au cours de l'embryogénèse et indiquent que le rôle des œstrogènes ne se limite pas à la différenciation sexuelle et à la reproduction mais concerne également la morphogénèse en général. La relation œstrogène/récepteur influe aussi sur la formation ou le fonctionnement des neuromastes indispensables à un comportement natatoire normal chez les poissons. Notre prochain objectif consiste désormais à identifier les gènes réprimés ou stimulés suite au « knock down » pratiqué chez le poisson zèbre. ○ ○ ○

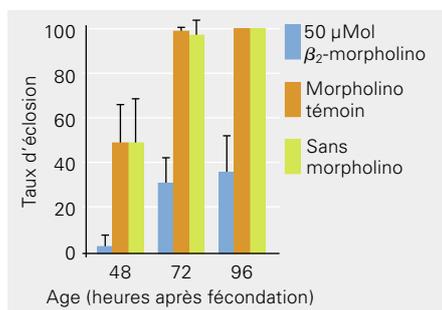


Fig. 2: Taux d'éclosion des poissons zèbres knock down (injection de 50 μ M de morpholino anti- β_2) au bout de 48 heures, 72 heures et 96 heures après fécondation comparé à celui de poissons non traités ou ayant subi une injection de morpholino control inapte à l'hybridation.

- [1] Jobling S. et al. (2006): Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives* 114 (1), 32–39.
- [2] Klinge C.M., Jernigan S.C., Mattingly K.A., Risinger K.E., Zhang J. (2004): Estrogen response element-dependent regulation of transcriptional activation of estrogen receptors α and β by coactivators and corepressors. *Journal of Molecular Endocrinology* 33 (2), 387–410.
- [3] Ekker S.C. (2000): Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach. *Yeast* 17 (4), 302–306.

Quand les dioxines empruntent la voie des œstrogènes



Ksenia Groh a soutenu sa thèse sur le sujet fin 2006 et effectue actuellement un stage post-doctoral au département de Toxicologie de l'environnement de l'Eawag.

Les dioxines sont des polluants très répandus qui, comme les œstrogènes, hormones sexuelles femelles, sont susceptibles d'interférer dans le système hormonal des espèces sauvages. Elles peuvent ainsi fortement perturber les fonctions de reproduction, par exemple chez les poissons. Pour améliorer notre capacité d'évaluation des risques pour l'environnement aquatique liés à ces polluants, nous avons cherché à savoir si l'expression d'un gène cible typiquement régulé par les œstrogènes pouvait être influencé par les dioxines.

Ces dernières années, de plus en plus d'observations ont fait état de troubles du développement et de la reproduction chez les poissons, sous la forme notamment de malformations gonadiques et de baisses de fertilité. Ces anomalies peuvent être du moins partiellement mises en relation avec la présence dans le milieu aquatique de perturbateurs endocriniens, c'est-à-dire de substances naturelles ou synthétiques capables de mimer ou de dérégler l'action des hormones naturelles.

Jusqu'à présent, près d'un millier de substances ont été identifiées comme perturbateur endocrinien avéré ou potentiel [1]. Parmi elles se trouvent des composés apparentés aux œstrogènes et aux dioxines. Toutes ces substances présentent un mode d'action classique assez similaire (Fig. 1). Une fois que le ligand s'est fixé au récepteur d'œstrogène ou de dioxine, le complexe activé vient s'amarrer sur de courts segments d'ADN

(les éléments de réponse aux œstrogènes ou aux dioxines) situés sur le promoteur de gènes cibles spécifiques et peut ainsi induire l'initiation de la transcription.

L'un des gènes cibles les plus importants dans ce contexte est le gène *cyp19* codant pour l'enzyme cytochrome P450 aromatasase qui catalyse la dernière étape de la biosynthèse des œstrogènes. Une perturbation de l'expression génique de l'aromatase peut entraîner une modification des taux de production d'œstrogènes, causer un déséquilibre entre les niveaux d'œstrogènes locaux et systémiques et donc perturber les processus biologiques contrôlés par les œstrogènes. Nous nous sommes par conséquent fixé pour objectif d'élucider les mécanismes moléculaires du contrôle transcriptionnel de ce gène clé, et en particulier de prédire les effets potentiels sur ce système des composés de type dioxine seuls ou accompagnés d'œstrogènes exogènes. Nous avons,

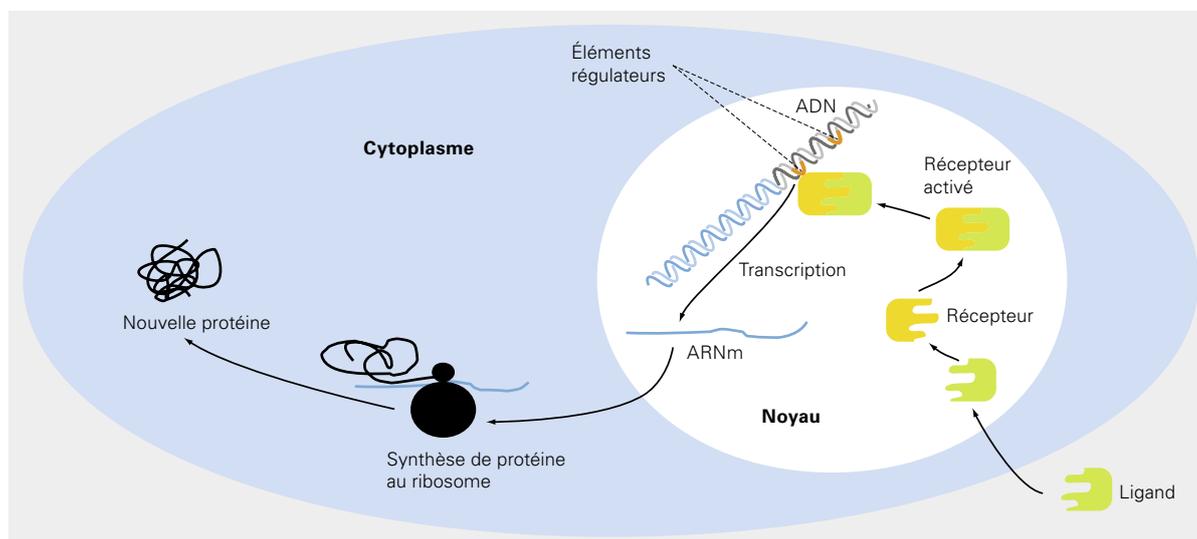


Fig. 1 : Mode d'action classique des substances apparentées aux œstrogènes et aux dioxines (schéma simplifié).

pour ce faire, étudié l'expression du gène de l'aromatase chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) choisi comme organisme modèle.

Le poisson zèbre possède deux gènes de l'aromatase. Comme de nombreux poissons téléostéens, le poisson zèbre possède deux gènes de l'aromatase, l'un, *cyp19a*, principalement exprimé dans les gonades, l'autre, *cyp19b*, d'expression majoritairement cérébrale. Ces deux gènes jouent ainsi un rôle primordial dans les mécanismes de développement et de reproduction des poissons. En particulier, l'aromatase cérébrale (*cyp19b*) est soupçonnée d'être impliquée dans la régulation des fonctions neuroendocriniennes des œstrogènes intervenant notamment dans le développement du cerveau et la programmation du comportement sexuel mâle. Par comparaison de séquences avec d'autres promoteurs, trois éléments susceptibles de lier les complexes activés des récepteurs aux œstrogènes ou aux dioxines et pouvant donc intervenir dans la régulation de l'expression génique ont pu être identifiés dans le promoteur de l'aromatase (Fig. 1). Il a été récemment démontré que l'un de ces sites agissait réellement en tant qu'élément de réponse aux œstrogènes [2]. Par contre, la fonctionnalité des deux autres sites, éléments de réponse potentiels aux dioxines, n'a pas encore été prouvée [3, 4].

Nous avons donc formulé deux questions spécifiques de recherche :

- Les deux éléments de réponse potentiels aux dioxines identifiés dans le promoteur de l'aromatase cérébrale sont-ils fonctionnels et la régulation de ce gène suit-elle donc la voie classique représentée dans la figure 1 ?
- Les dioxines sont-elles en mesure de modifier l'expression génique de l'aromatase en perturbant l'action des œstrogènes par interférences de signaux entre les récepteurs ?

Combiner les tests *in vivo* et *in vitro*. Pour tenter de répondre à ces questions, nous avons utilisé une combinaison d'essais *in vivo* d'exposition d'embryons de poisson zèbre et de tests *in vitro* recourant à des constructions comportant des gènes rapporteurs. Pour les essais d'exposition, des embryons de poisson zèbre ont été maintenus du 17^{ième} au 20^{ième} jour après fécondation dans un milieu contenant des substances apparentées aux œstrogènes et/ou aux dioxines. A la fin de l'exposition, la totalité de l'ARN messager a été isolée d'une partie des embryons tandis que les autres subissaient un traitement en vue du dosage des protéines.

Comme système d'étude *in vitro*, nous avons utilisé une lignée de cellules gliales humaines étant donné que c'est dans ce type de cellules que le gène de l'aromatase cérébrale est principalement exprimé [2]. Les cellules gliales sont des cellules spéciales du cerveau chargées d'assurer le soutien et l'alimentation des neurones. Pour notre étude, les cellules ont été transfectées avec différentes combinaisons des constructions ADN suivantes :

- Vecteurs rapporteurs : le gène de la luciférase a été choisi comme gène rapporteur et placé sous le contrôle d'un promoteur de l'aromatase cérébrale sous sa forme soit sauvage, soit privée d'éléments potentiels de réponse aux dioxines. Lorsque le promoteur est activé, les cellules transfectées synthétisent de la luciférase dans une quantité proportionnelle à l'intensité de

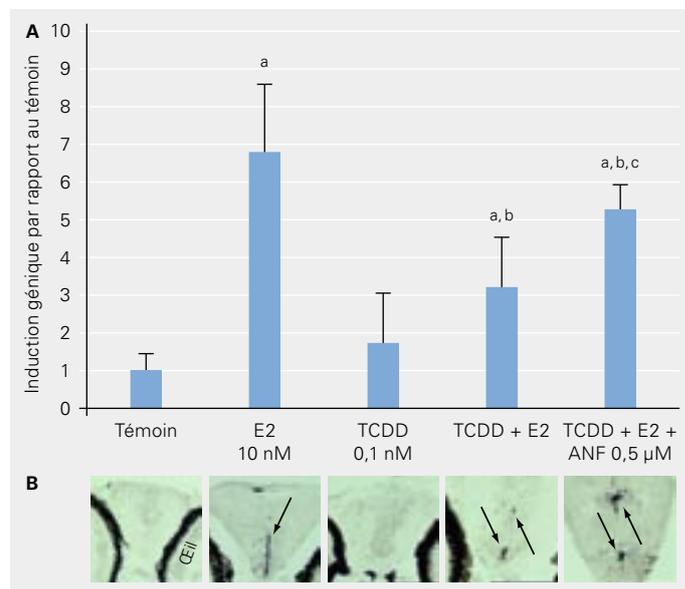


Fig. 2: Effets d'une exposition d'embryons de poisson zèbre à des ligands des récepteurs aux œstrogènes et aux dioxines sur l'expression de l'aromatase cérébrale.

A : Quantités d'ARNm d'aromatase. Les résultats correspondent à la moyenne de trois essais indépendants comprenant une répétition chacun \pm écart-type par rapport au témoin solvant. a = différence significative par rapport au témoin ; b = différence significative par rapport à l'exposition à l'E2 ; c = différence significative par rapport à l'exposition simultanée à l'E2 et à la TCDD ; $p < 0,05$ dans tous les cas.

B : Mise en évidence de l'aromatase dans le cerveau par marquage avec des anticorps. Les cellules gliales immunoréactives sont indiquées par des flèches.

la stimulation. La protéine peut ensuite être détectée grâce à sa luminescence.

- Vecteurs d'expression : pour pouvoir estimer si les promoteurs des vecteurs rapporteurs sont activés par les œstrogènes ou les dioxines par le biais de leurs récepteurs respectifs, il est indispensable que tous les éléments susceptibles d'intervenir soient bien présents dans les cellules. C'est pourquoi l'introduction des vecteurs rapporteurs est accompagnée de la transfection de vecteurs d'expression portant les séquences codant pour les protéines des récepteurs de poisson zèbre exprimées constitutivement.

Au bout de 48 heures d'exposition aux œstrogènes ou aux dioxines, les cellules gliales ainsi modifiées ont été lysées en vue du dosage de la luciférase.

Les éléments de réponse aux dioxines du promoteur de l'aromatase cérébrale ne sont pas fonctionnels.

Dans notre premier essai, des larves de poisson zèbre en cours de développement ont été exposées à la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), un ligand prototypique du récepteur aux dioxines considéré comme l'activateur le plus puissant de la voie de transduction de ce système récepteur. Nous n'avons cependant observé d'effet significatif ni sur les quantités d'ARNm de l'aromatase (Fig. 2A), ni sur les teneurs en protéines (Fig. 2B), ce qui semble indiquer que la TCDD n'a aucune influence sur l'expression de l'aromatase cérébrale.

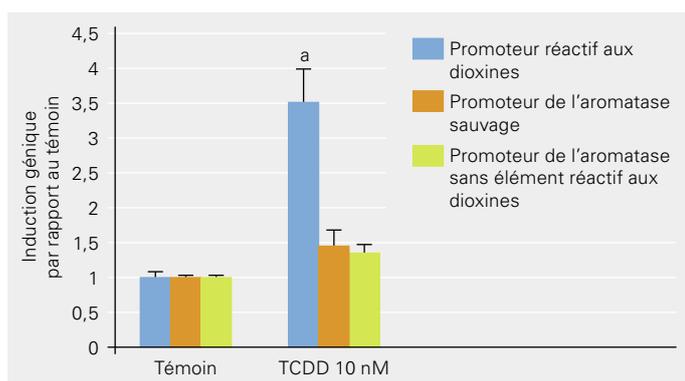
Nous avons étudié *in vitro* les réactions du promoteur de l'aromatase, sous sa forme sauvage ou mutée sans éléments de réponse aux dioxines, à une exposition à la TCDD. Pour ce faire, les cellules gliales ont été cotransfectées avec des vecteurs d'expression portant les séquences de protéines formant le complexe récepteur des dioxines. L'activité des deux formes du promoteur de l'aromatase est restée inchangée alors que le promoteur témoin porteur d'un élément fonctionnel de réponse aux dioxines a été activé dans les mêmes conditions (Fig. 3). En outre nous avons pu montrer que d'autres fragments d'ADN contenant des éléments de réponse aux dioxines similaires à ceux identifiés sur le promoteur de l'aromatase cérébrale étaient également dans l'impossibilité de lier le complexe récepteur des dioxines activé (données non illustrées).

Ces observations nous permettent de conclure que les deux éléments de réponse aux dioxines identifiés sur le promoteur de l'aromatase cérébrale du poisson zèbre ne sont pas fonctionnels et que les dioxines n'influent donc pas sur ce gène par la voie classique de transduction de signaux impliquant le récepteur aux dioxines.

Interférence de signaux entre récepteurs: l'activité anti-œstrogénique de la TCDD. Nous avons ensuite cherché à savoir si des phénomènes d'interférence de signaux entre récepteurs aux œstrogènes et aux dioxines pouvaient influencer l'expression de l'aromatase cérébrale chez le poisson zèbre. Nous avons pu constater que les dioxines pouvaient avoir un effet soit œstrogénique soit anti-œstrogénique selon, respectivement, que des œstrogènes étaient absents ou présents dans le milieu.

Conformément à d'autres études [2], nous avons observé une forte induction de l'expression de l'aromatase cérébrale par l'œstrogène naturel 17 β -œstradiol (E2), se traduisant par des teneurs

Fig. 3: Réaction du promoteur de l'aromatase cérébrale avec ou sans éléments potentiels de réponse aux dioxines à un traitement avec de la TCDD. Un vecteur porteur d'un promoteur de truite arc-en-ciel comportant un élément de réponse fonctionnel aux dioxines a été utilisé comme témoin positif. Des vecteurs rapporteurs et des vecteurs d'expression codant pour les protéines du complexe récepteur des dioxines du poisson zèbre ont été transfectés simultanément dans les cellules gliales. Les résultats correspondent aux moyennes de trois essais indépendants comportant chacun deux répétitions \pm écart-type par rapport au témoin solvant. a = différence significative par rapport au témoin solvant; $p < 0,01$ dans tous les cas.



accrues en ARNm et en protéines dans les embryons de poisson zèbre (Fig. 2A + B). Une activation du promoteur de ce gène par E2 a également été observée *in vitro* mais uniquement lorsque les cellules renfermaient à la fois des récepteurs aux œstrogènes et des complexes récepteurs des dioxines (Fig. 4A). Une double exposition à l'E2 et à la TCDD, toujours en présence des deux types de récepteurs, a quant à elle conduit à une réduction de l'expression de l'aromatase cérébrale induite par E2. Cet effet anti-œstrogénique a été observé aussi bien *in vivo* (Fig. 2) qu'*in vitro* (Fig. 4A). De plus, le promoteur de l'aromatase sans les éléments potentiels de réponse aux dioxines et le promoteur témoin porteur d'un seul élément de réponse aux œstrogènes présentaient le même mode d'expression que le promoteur de l'aromatase cérébrale sauvage. Il semble donc que la répression de l'expression génique se produise indépendamment des éléments potentiels de réponse aux dioxines identifiés sur le promoteur de l'aromatase cérébrale.

L'effet anti-œstrogénique de la TCDD peut être atténué (*in vivo*, Fig. 2A + B) ou complètement annulé (*in vitro*, Fig. 4A) par des apports d' α -naphthoflavone (ANF), un antagoniste du récepteur des dioxines. On appelle antagoniste une substance qui se lie au récepteur sans l'activer et donc le bloque. Ces observations suggèrent que le récepteur des dioxines est impliqué dans le processus d'inhibition de l'expression génique de l'aromatase par la TCDD.

L'E2 produit dans le cerveau par l'aromatase est un facteur neurotrophique et neuroprotecteur important. On peut donc penser qu'une exposition à la TCDD réprime l'expression de l'aromatase normalement induite par E2 afin que moins d'œstrogènes soient produits dans le cerveau entraînant un dysfonctionnement du système neuroendocrinien dans son ensemble.

Interférence de signaux entre récepteurs: l'activité œstrogénique de la TCDD. Nous avons observé après exposition à la TCDD une légère stimulation de l'activité du promoteur de l'aromatase cérébrale du poisson zèbre dans les cellules gliales comportant le matériel génétique nécessaire à la synthèse du récepteur aux œstrogènes et des protéines du complexe récepteur des dioxines (Fig. 4B). Un blocage de cet effet a pu être obtenu par un apport d'ICI 182,780 (ICI), antagoniste du récepteur aux œstrogènes ou d'ANF, antagoniste du récepteur aux dioxines, ce qui suggère une implication de ces deux types de récepteurs dans le processus observé (Fig. 4B).

Le fait que seul l'élément de réponse aux œstrogènes porté par le promoteur est impliqué dans les processus d'interaction avec le récepteur aux œstrogènes ou le récepteur aux dioxines a été confirmé par des essais menés avec le promoteur mutant privé des deux éléments de réponse potentiels aux dioxines et le promoteur témoin porteur d'un unique élément de réponse aux œstrogènes. Les deux types de constructions livrent en effet le même genre de réaction que le vecteur contenant le promoteur sauvage de l'aromatase du poisson zèbre après exposition des cellules gliales aux ligands des récepteurs aux œstrogènes et aux dioxines (Fig. 4B).

Des études récentes ont montré qu'une fois activés, les récepteurs aux dioxines de cellules humaines pouvaient s'associer

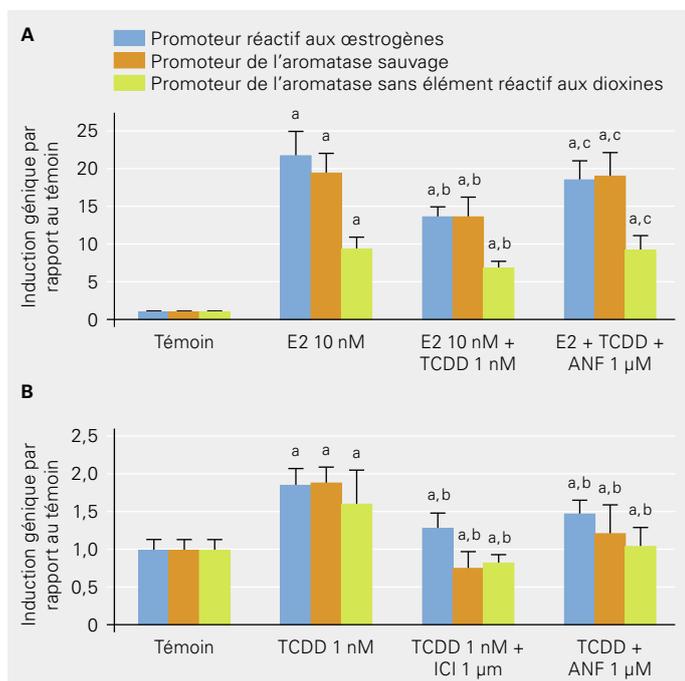
directement avec les récepteurs aux œstrogènes libres et provoquer une activation génique en venant s'amarrer sur les éléments de réponse aux œstrogènes [5]. Nos résultats semblent indiquer que ce genre d'interactions entre récepteurs aux dioxines et récepteurs aux œstrogènes existe également chez le poisson.

Mais il convient ici de rester prudent : la légère activité œstrogénique de la TCDD a été observée uniquement *in vitro* et en l'absence totale de ligands du récepteur aux œstrogènes. Il est donc pensable que l'absence d'activation de l'expression génique de l'aromatase cérébrale par la TCDD que nous avons observée *in vivo* (Fig. 2A) s'explique par la présence d'œstrogènes endogènes dans les cellules qui empêchent l'action œstrogénique potentielle des dioxines. Il n'est cependant pas exclu que le mode d'action œstrogénique de la TCDD empruntant la voie du récepteur aux œstrogènes puisse réellement fonctionner *in vivo* dans certaines phases de développement ou types de cellules caractérisés par une absence ou de très faibles niveaux d'œstrogènes endogènes.

L'équilibre délicat des œstrogènes endogènes est menacé par les substances exogènes apparentées aux œstrogènes et aux dioxines.

Notre analyse de la régulation génique de l'aro-

Fig. 4: Réaction du promoteur de l'aromatase cérébrale avec ou sans éléments potentiels de réponse aux dioxines à un traitement avec des ligands des récepteurs aux œstrogènes et aux dioxines. Un vecteur comportant un unique élément de réponse aux œstrogènes dans le promoteur a également été utilisé. Des vecteurs rapporteurs et des vecteurs d'expression codant pour les protéines du complexe récepteur des dioxines du poisson zèbre ont été transfectés simultanément dans les cellules gliales. a = différence significative par rapport au témoin solvant dans (A) et (B); b = différence significative par rapport au traitement avec l'E2 (A) et la TCDD (B); c = différence significative par rapport au traitement simultané avec l'E2 et la TCDD; $p < 0,01$ dans tous les cas.



matase cérébrale du poisson zèbre montre que les perturbateurs endocriniens apparentés aux œstrogènes et aux dioxines peuvent interférer dans l'expression de ce gène de différentes façons [6] et conduit aux conclusions suivantes :

- Les substances à activité endocrinienne de type œstrogène capables de se lier au récepteur aux œstrogènes et l'activer, peuvent perturber le fonctionnement de l'aromatase cérébrale du poisson zèbre en provoquant une activation non programmée de son expression.

- Les deux éléments de réponse aux dioxines identifiés sur le promoteur du gène de l'aromatase ne sont pas fonctionnels, suite probablement à une mauvaise adéquation de leur séquence avec la séquence fondamentale de ce type d'élément. Il est donc peu probable que les perturbateurs endocriniens de type dioxine influent sur l'expression de l'aromatase cérébrale par la voie classique passant par le complexe récepteur des dioxines et l'élément de réponse aux dioxines. Cet exemple illustre bien toute l'importance d'une vérification directe de la fonctionnalité des sites de régulation transcriptionnelle identifiés par comparaison de séquences.

- Les dioxines peuvent influencer l'expression de gènes dont le promoteur comporte un élément fonctionnel de réponse aux œstrogènes. Selon que des ligands potentiels des récepteurs aux œstrogènes sont absents ou présents dans le milieu, leur action peut être de nature œstrogénique (induisant une stimulation du récepteur à œstrogènes et une activation de l'expression génique par le biais de l'élément de réponse aux œstrogènes) ou au contraire anti-œstrogénique (induisant une atténuation de l'activité génique normalement induite par E2). L'action des dioxines peut donc différer en fonction des stades de développement ou des organes touchés s'ils présentent des taux d'œstrogènes différents. De même, leurs effets dans l'environnement peuvent être très variables selon que des substances œstrogéniques sont également présentes ou non dans le milieu aquatique. ○○○

- [1] IEH (2005) : Chemicals purported to be endocrine disrupters: A compilation of published lists. Web Report W20, Leicester, UK, MRC Institute of Environment and Health. Available at <http://www.silsoe.cranfield.ac.uk/ieh/pdf/w20.pdf>
- [2] Menuet A., Pellegrini E., Brion F., Gueguen M. M., Anglade I., Pakdel F., Kah O. (2005) : Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *Journal of Comparative Neurology* 485, 304–320.
- [3] Kazeto Y., Ijiri S., Place A.R., Zohar Y., Trant, J.M. (2001) : The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288, 503–508.
- [4] Kazeto Y., Place A.R., Trant J.M. (2004) : Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25–34.
- [5] Ohtake F., Takeyama K.-i., Matsumoto T., Kitagawa H., Yamamoto Y., Nohara K., Tohyama C., Krust A., Mimura J., Chambon P., Yanagisawa J., Fujii-Kuriyama Y., Kato S. (2003) : Modulation of estrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- [6] Cheshenko K., Brion F., Le Page Y., Hinfray N., Pakdel F., Kah O., Segner H., Eggen R.I.L. (2007) : Expression of zebrafish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicological Sciences* 96, 255–267.

Effets du pétrole brut sur les embryons de poisson zèbre



Jules Kemadjou, biologiste, est chercheur au sein du département de Toxicologie de l'environnement de l'Eawag.

Notre époque est marquée par les fléaux récurrents que sont les marées noires. Dans la plupart des cas, elles causent des dommages aigus désastreux sur les organismes aquatiques. Mais même des dizaines d'années plus tard, le pétrole ou ses composants hydrosolubles sont encore détectables dans l'environnement. Nous nous sommes donc fixé pour objectif la caractérisation des effets du pétrole sur la faune piscicole dans des conditions de pollution subaiguë. A partir du poisson zèbre utilisé comme organisme modèle, nous avons pu identifier une centaine de gènes dont l'expression était modifiée par une exposition au pétrole brut.

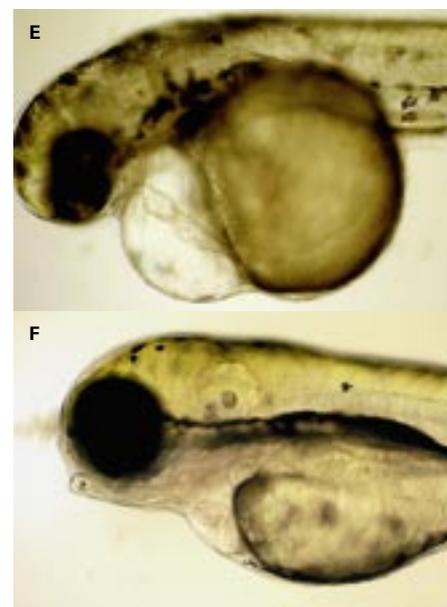
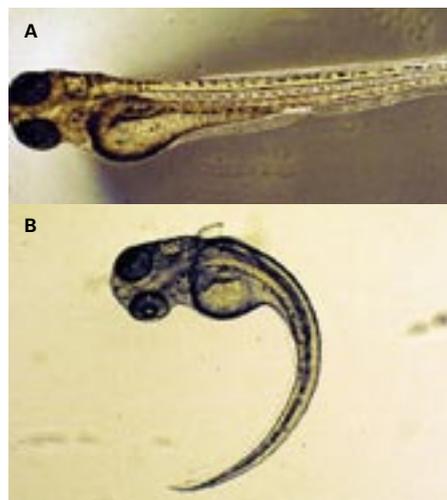
La dernière marée noire ne remonte pas à bien longtemps. Fin 2007, près de 200 000 litres de pétrole se déversaient dans la baie de San Francisco suite à la collision d'un pétrolier avec un pilier de pont. La nappe a été classée comme moyennement importante dans la longue liste des déversements pétroliers accidentels. Même si cette marée noire est loin d'atteindre l'ampleur de celle de l'Exxon Valdez qui toucha l'Alaska en 1989 – 41 millions de litres se déversèrent alors dans l'océan – chaque pollution pétrolière aiguë représente une menace pour la vie sauvage.

La majeure partie des résidus pétroliers contenus dans l'eau de mer ne provient cependant pas de pollutions aiguës mais d'apports diffus d'origine naturelle ou anthropique [1] et constitue donc un risque chronique pour l'environnement aquatique. Dans le but d'étudier les effets du pétrole brut sur les poissons, nous

avons décidé de recourir au poisson zèbre comme organisme modèle. Nous avons porté une attention plus particulière aux effets sur le développement qui ont été peu étudiés jusqu'à présent. Étant donné que la plupart des études menées jusqu'ici sur le poisson zèbre se concentraient sur les aspects morphologiques des dommages dont la spécificité limitée ne permet généralement pas d'en identifier la cause précise, nous avons choisi une approche plus fine, la toxicogénomique, qui permet d'identifier les gènes subissant une régulation positive ou négative lors d'une exposition aux polluants [2].

Altérations morphologiques causées par le pétrole brut pendant l'embryogénèse. Nous avons choisi de mener nos études avec du pétrole brut de Norvège, ce pays étant un important

Fig. 1 : Altérations morphologiques après exposition à du pétrole brut ou à sa fraction aqueuse : A : Témoin non exposé, B : Courbure de la queue, C : Inflexion de la queue, D : Œdème et inflexion de la queue, E : Hypertrophie du muscle cardiaque, F : Témoin non exposé au cœur non affecté.



producteur européen. Etant donné que certains composés pétroliers se dissolvent dans l'eau en conditions réelles, nous avons également travaillé avec une fraction adaptée à l'eau (WAF: water accommodated fraction) [3].

Nous avons tout d'abord déterminé le domaine des concentrations convenant à nos essais. Sans être létales elles devaient en effet causer des altérations morphologiques visibles chez au moins 40 % des embryons exposés. Pour ce faire, nous avons testé le pétrole dans des dilutions allant de 0 à 1000 parties par million (ppm) et la fraction aqueuse dans des concentrations comprises entre 0 et 100 %.

Les effets recherchés ont été obtenus avec des valeurs de 30 % pour l'extrait aqueux et comprises entre 100 et 1000 ppm pour le pétrole brut, une intensité nettement moindre étant observée à 100 ppm. Les principaux signes morphologiques observés dans ces conditions étaient une élongation du cœur, la présence d'œdèmes, une incurvation dorsale de l'axe du corps et une courbure de la queue (Fig. 1). Les embryons témoins présentaient quant à eux un développement normal.

Forte modification de l'expression génique au cours du développement de poissons zèbres exposés au pétrole.

Sur la base de ces résultats préliminaires, nous avons ensuite effectué les essais de toxicogénomique avec des poissons zèbres à différents stades de développement :

- ▶ Des embryons âgés de 4 heures, en début de gastrulation (c. à d. mise en place de tissus fondamentaux) ;
- ▶ Des embryons âgés de 24 heures, stade auquel la plupart des organes sont déjà ébauchés ;
- ▶ Des poissons âgés de 96 heures, juste après éclosion.

Les poissons zèbres ont été exposés au pétrole brut et à son extrait aqueux pendant une durée de 24 heures dans tous les cas, c'est-à-dire de la 4^{ème} à la 28^{ème} heure après fécondation pour le premier groupe, de la 24^{ème} à la 48^{ème} heure pour le second et de 96^{ème} à la 120^{ème} heure pour le troisième. A l'aide d'une méthode faisant appel à des puces à ADN (voir encadré), nous avons pu identifier des centaines de gènes dont l'expression était significativement



Un examen microscopique des poissons zèbres permet de détecter les anomalies éventuelles.

ment modifiée par rapport aux témoins après une exposition à 100 ou 1000 ppm de pétrole brut (Tableau). Fait marquant, le nombre de gènes affectés était sensiblement le même à 100 ppm qu'à 1000, ce qui semble indiquer que notre test permet de détecter des réactions à des contaminations de concentration inférieure à celles entraînant des altérations morphologiques aiguës.

L'extrait aqueux a par contre influencé beaucoup moins de gènes que le pétrole brut (Tableau). Ce phénomène pourrait s'expliquer par des effets de synergie entre composés présents dans le pétrole brut mais non dans l'extrait aqueux, conduisant à un renforcement de la toxicité. D'autre part, le nombre de gènes affectés était d'environ 40 dans les œufs non éclos pour atteindre la valeur de 230 juste après éclosion (Tableau), ce qui s'explique probablement par les différences d'avancement de l'organogénèse entre ces deux stades de développement.

Nombre de gènes influencés par le pétrole brut ou sa fraction aqueuse.

		Age des embryons pendant l'exposition		
		4-28 heures après fécondation	28-48 heures après fécondation	96-120 heures après fécondation
100 ppm de pétrole brut	Total de gènes affectés	634	639	719
	activés	326	353	387
	réprimés	308	286	332
1000 ppm de pétrole brut	Total de gènes affectés	564	752	983
	activés	315	533	428
	réprimés	249	219	555
Extrait aqueux à 30 %	Total de gènes affectés	46	40	230
	activés	9	9	86
	réprimés	37	31	144
Nombre de gènes affectés aussi bien par le pétrole brut que par sa fraction aqueuse		7	16	3

Effets sur les gènes spécifiquement exprimés pendant l'embryogénèse ou dans les mécanismes de défense cellulaire.

Dans un souci de recherche de biomarqueurs adéquats, nous avons concentré nos efforts sur les quelques gènes affectés à la fois par le pétrole brut et par son extrait aqueux. Il s'agit de 7 gènes au début de l'embryogénèse, de 16 gènes dans les embryons âgés de 24 à 48 heures et de 3 gènes chez les poissons fraîchement éclos. La faible similitude entre les profils d'expression observés aux différents stades de développement est une indication supplémentaire de la grande spécificité des effets toxicogénomiques.

Parmi les gènes influencés, nous avons identifié ceux qui étaient impliqués de manière spécifique dans le développement embryonnaire ou dans les processus de défense contre les polluants. Ainsi, l'un des gènes activés code pour une protéine très importante pour la formation des cellules sanguines. Des quantités accrues de transcrits ont également été mesurées pour le gène *Cyp1a1* codant pour un membre de la superfamille des

enzymes du cytochrome P450 qui est principalement impliquée dans les mécanismes de défense cellulaire.

Les embryons de poisson zèbre: un modèle de choix pour l'évaluation des polluants. Nos études montrent que les embryons de poisson zèbre constituent un modèle animal de grande sensibilité pour le suivi des effets toxicogénomiques des composés chimiques [4]. Bien que les lignées de cellules de vertébrés et autres systèmes *in vitro* soient très utiles pour l'évaluation toxicologique des polluants et médicaments, ils ne peuvent totalement remplacer l'expérimentation animale. Les embryons de poisson zèbre constituent un modèle de vertébré peu onéreux et éthiquement acceptable qui trouvera très certainement un large champ d'application non seulement pour l'évaluation toxicologique de la multitude de substances concernées par le programme REACH de l'UE mais aussi pour déterminer l'embryotoxicité de nouveaux principes actifs dans les premières étapes de développement des produits pharmaceutiques. De plus, les embryons de poisson zèbre sont particulièrement bien adaptés à l'étude des effets toxiques des polluants pendant la différenciation cellulaire et la morphogénèse, ce qui n'est évidemment pas le cas des cultures de cellules et autres systèmes *in vitro*.

Pour obtenir une vision plus complète de la toxicité du pétrole brut, nous prévoyons maintenant d'étudier les profils protéomiques du poisson zèbre au cours de ses premiers stades de développement. L'analyse protéomique d'un organisme permet de détecter les variations subtiles des niveaux de protéines se produisant sous l'effet de certains facteurs de stress environnementaux. Elle livre donc des informations sur les mécanismes à la base des phénomènes de toxicité et peut de ce fait aider à la découverte de nouveaux biomarqueurs généraux d'exposition pouvant servir d'outils moléculaires d'évaluation. ○ ○ ○

Analyse toxicogénomique basée sur les puces à ADN

On entend par puce à ADN ou microréseau, un ensemble de segments d'ADN immobilisés sous forme de spots microscopiques sur un support solide à des positions déterminées, ces différents spots d'ADN correspondant en général à différents gènes particuliers. Les puces à ADN permettent d'observer simultanément l'expression de milliers de gènes. Les microréseaux d'ADN utilisés dans notre étude comprennent ainsi la totalité du génome du poisson zèbre.

Après exposition aux polluants, la totalité de l'ARN messenger (ARNm = produit de la transcription) des poissons zèbres est isolé. On obtient ainsi les transcrits de tous les gènes actifs pendant l'exposition. En parallèle, l'ARNm de poissons non exposés est également isolé. Les deux fractions d'ARNm sont ensuite traduites en ADN complémentaire (ADNc) par l'action de l'enzyme transcriptase inverse puis les brins d'ADNc sont marqués avec un colorant fluorescent rouge pour les embryons exposés ou vert pour les embryons témoins. Ces échantillons fluorescents sont ensuite mélangés et hybridés avec une même puce à ADN qui sera alors lue par un scanner de fluorescence pour savoir sur quels spots les brins marqués se sont fixés. La fluorescence est provoquée par excitation avec deux faisceaux laser de longueur d'onde donnée et les gènes dont l'expression a été réprimée ou induite sont identifiés par l'analyse du rapport entre les intensités relatives des deux fluorophores.

- [1] National Research Council (2002) : Most oil enters sea from nonaccidents – Environment. Science News. Science Service, Inc.
- [2] Voelker D., Vess C., Tillmann M., Nagel R., Otto G.W., Geisler R., Schirmer K., Scholz S. (2007) : Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology* 81, 355–364.
- [3] Smith L., Galloway T. (2006) : Preparation of water accommodated fraction. School of Earth, Ocean and Environmental Sciences, University of Plymouth.
- [4] Braunbeck T., Boettcher M., Hollert H., Kosmehl T., Lammer E., Leist E., Rudolf M., Seitz N. (2005) : Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species – an update. *Altex* 22 (2), 87–102.

Les profils protéiques révélateurs de polluants



Marc Suter, chimiste et directeur d'équipe dans le département de Toxicologie de l'environnement de l'Eawag.

Coauteurs : Ksenia Groh, Victor Nesatyy.

L'analyse protéomique est une méthode prometteuse dont l'intérêt ne se limite pas au domaine de la recherche médicale. Elle est également utilisée depuis près de 30 ans en écotoxicologie. Elle permet de mettre en évidence parmi les protéines celles dont la synthèse est stimulée ou au contraire réprimée lorsque des organismes sont soumis à l'action de polluants. A l'Eawag, la méthode vient d'être mise au point pour le poisson zèbre.

Les poissons n'ont en général qu'une possibilité très limitée d'échapper aux dégradations chimiques ou physiques de leur environnement. Aussi sont-ils souvent considérés comme des indicateurs potentiels de l'état des cours d'eau. Lorsqu'ils sont confrontés à un stress chimique, leur organisme déclenche un mécanisme de défense qui implique l'expression de gènes spécifiques et la synthèse des protéines correspondantes. C'est ainsi par exemple que de la métallothionéine est synthétisée suite à une pollution de l'eau par des métaux lourds ou que la synthèse de certaines protéines de la famille du cytochrome P450 est stimulée sous l'effet de polluants organiques.

Si l'on souhaite étudier les réactions des poissons à certaines modifications de leur environnement, on peut recourir à ce que l'on appelle une analyse protéomique. Cette technique consiste à examiner le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'une cellule, d'un tissu ou d'un organisme, à la recherche de celles dont la synthèse est stimulée (protéines induites) ou réprimée (protéines supprimées). Il s'agit d'une méthode intéressante et complexe à la fois (cf. encadré) qui, si elle a connu un fort développement ces dernières années, comporte encore des aspects non résolus [1]. Notre objectif était d'une part de la perfectionner, d'autre part de l'implanter à l'Eawag pour la recherche en écotoxicologie. Nos efforts se sont concentrés sur le poisson zèbre car son génome entièrement séquencé autorise théoriquement l'identification de la totalité de ses protéines.

Le problème de l'identification des protéines. L'une des principales difficultés de l'analyse protéomique était que seul un petit nombre des protéines dont la synthèse était influencée par les polluants pouvait réellement être identifié. En effet, les protéines synthétisées en réaction à un stress chimique sont souvent présentes en quantités si infimes qu'elles sont masquées par des protéines d'emploi plus général, comme les protéines structurelles, qui sont en concentrations beaucoup plus fortes.

Lors de nos essais avec le poisson zèbre, il s'est avéré qu'une grande partie des 900 protéines identifiées appartenait à la famille des vitellogénines, des protéines du vitellus. Il paraissait alors vraisemblable que d'autres protéines importantes n'avaient pas pu être détectées car leur signal trop faible était masqué par

ces protéines majoritaires. Nous avons par conséquent cherché à savoir s'il était possible d'accroître la part de protéines identifiables en procédant à une ablation de la vésicule vitelline des larves avant l'extraction des protéines puisque c'est dans cet organe hérité de la mère que se concentre la majeure partie des

Principe de l'analyse protéomique

L'analyse protéomique permet de caractériser toutes les protéines présentes dans un type de cellule, un tissu ou un organisme donné à un moment donné et dans des conditions données. Dans notre laboratoire, nous nous intéressons au profil protéique de poissons zèbres exposés ou non à des polluants. Pour déterminer ces protéomes, les protéines sont extraites des poissons, séparées et séquencées après une certaine durée d'incubation. L'identification des protéines faisait autrefois appel à la technique d'électrophorèse bidimensionnelle ; on prélevait les différents spots d'intérêt sur le gel d'électrophorèse et procédait ensuite au séquençage des protéines qu'ils contenaient. Cette méthode ne permettait cependant d'identifier qu'entre 50 et 100 protéines différentes. On utilise aujourd'hui ce que l'on appelle la technologie d'identification multidimensionnelle des protéines ou MudPIT (pour « multidimensional protein identification technology ») [2] qui combine chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse. Dans cette technique, les protéines sont tout d'abord soumises à une hydrolyse enzymatique par la trypsine. Les peptides ainsi formés sont ensuite séparés par chromatographie en phase liquide par passage sur deux colonnes successives et élution avec des concentrations salines croissantes (NH_4Ac) pour les détacher l'un après l'autre des colonnes (Fig. 1). Les séquences d'acides aminés des différents peptides sont enfin déterminées par spectrométrie de masse, puis comparées à celles stockées dans la banque de données du poisson zèbre, ce qui permet d'identifier les protéines auxquelles ils appartiennent. Entre 8 et 10 analyses MudPIT sont nécessaires pour identifier 95 % des protéines déterminables (Fig. 2A).

vitellogénines. Notre intervention s'est avérée efficace: après ablation, la liste des protéines identifiées ne comportait presque plus de vitellogénines et le nombre de protéines détectées était passé de 800 à 1200.

En procédant à un fractionnement biologique de l'extrait, il nous a d'autre part été possible d'augmenter encore le nombre de protéines identifiées jusqu'à atteindre une valeur de 2700. Nous avons pour cela séparé les protéines membranaires, nucléiques et cytoplasmiques à l'aide d'un kit d'extraction du commerce avant d'analyser les fractions séparément (Fig. 2B).

Accroître la reproductibilité et réduire la durée des analyses.

L'analyse protéomique posait cependant un autre type de problèmes: les résultats étaient peu reproductibles et l'identification des protéines induites ou supprimées par les polluants était extrêmement demandeuse de temps. Ainsi, près de 10 analyses MudPIT (cf. encadré) étaient nécessaires pour identifier 95 % des protéines déterminables [3]. Etant donné qu'une telle analyse dure 24 heures, il fallait donc au moins 10 jours pour étudier un échantillon. Mais la durée des analyses n'était pas le seul élément gênant. Il arrivait fréquemment que 10 essais répétés livrent des résultats extrêmement divergents (Fig. 2A). Nous avons donc cherché un moyen d'améliorer la méthode sur ces deux points.

Les analyses MudPIT classiques ne tiennent compte que des peptides à charge double ou triple qui sont fréquents après digestion de l'extrait protéique à la trypsine. Jusqu'à présent, les molécules à charge unique étaient totalement exclues de la détermination des séquences car jugées de peu d'intérêt puisque la majorité d'entre elles s'apparentent aux non peptides. Or nos essais viennent de révéler qu'il était tout à fait intéressant et judicieux de considérer les ions monovalents dans notre méthode. La figure 3 montre à partir de l'exemple d'un peptide de la chaîne lourde de la myosine (protéine motrice des fibres musculaires) que les molécules à charge unique et double donnent des signaux significatifs tandis que l'ion trivalent n'est pas détectable sans zoom à 374,3 m/z (m/z = rapport de la masse d'une molécule sur sa charge). Pour pouvoir déterminer la séquence d'un peptide aussi précisément que possible, il faut que son signal se distingue

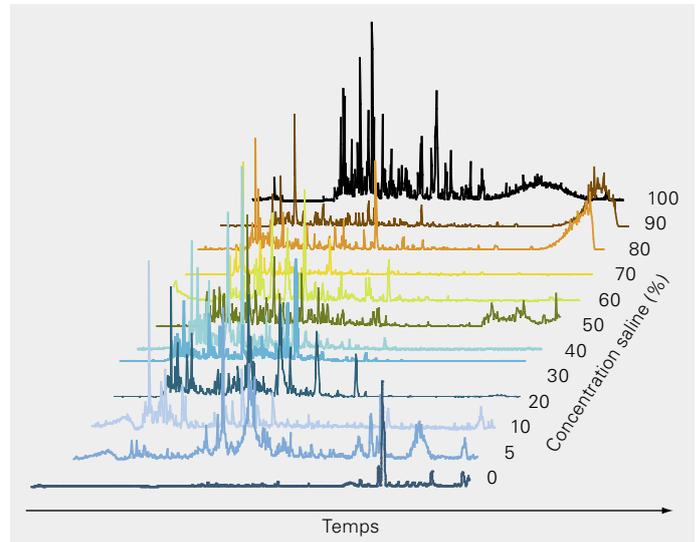


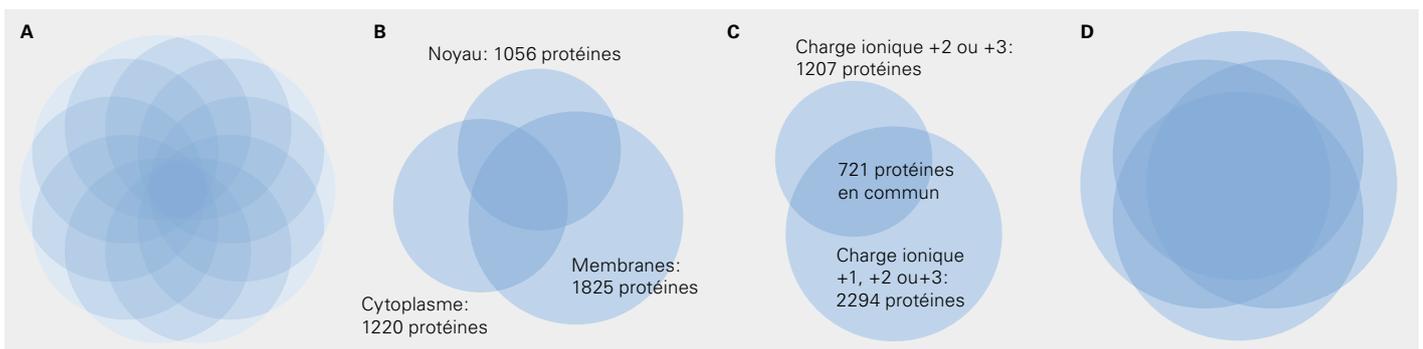
Fig. 1 : Les peptides sont séparés par passage sur deux colonnes successives de chromatographie en phase liquide puis décrochés un à un par une solution saline de concentration croissante.

clairement du bruit chimique. C'est pourquoi le nombre de protéines identifiées était beaucoup plus faible lorsque seuls les ions di et trivalents étaient pris en compte que lorsque les peptides à charge unique entraient également en considération (Fig. 2C).

Dans l'ensemble, la prise en compte des peptides à charge unique s'est avérée très profitable à notre analyse. Il a été non seulement possible d'accroître sensiblement la reproductibilité des résultats mais aussi de réduire à 3 ou 4 le nombre de répétitions des mesures nécessaire pour identifier 95 % des protéines déterminables (Fig. 2 D). De ce fait, la durée d'analyse d'un échantillon a pu être réduite à 3 ou 4 jours au lieu de 10.

Premiers essais avec la méthode optimisée. La mise en place de la nouvelle méthodologie analytique pour les protéines a été un processus ardu mais c'est avec succès que son implantation est en passe d'être achevée à l'Eawag. Cette technologie est

Fig. 2: Nombre de protéines pouvant être identifiées par analyse protéomique. Chaque cercle plein correspond à une analyse MudPIT. Plus le recouvrement des cercles est important, plus la reproductibilité est forte. A: La caractérisation du protéome nécessite en moyenne de 8 à 10 analyses MudPIT. B: Le fractionnement biologique permet l'identification d'un nombre plus important de protéines. C: La prise en compte des peptides à charge unique fait augmenter le nombre de protéines identifiées. D: Avec notre nouvelle méthodologie, la caractérisation du protéome ne demande plus que 3 ou 4 analyses MudPIT.





Le chercheur de l'Eawag Victor Nesatyy au spectromètre de masse.

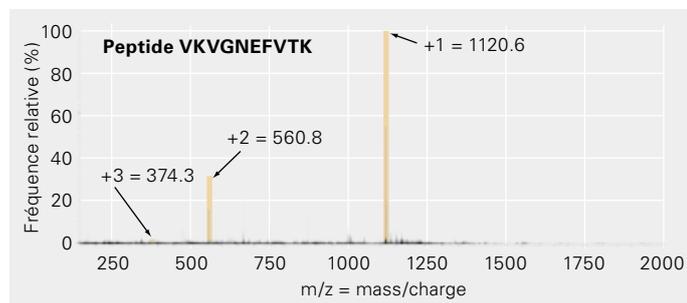
particulièrement intéressante pour notre recherche en écotoxicologie étant donné qu'elle livre d'une part des informations sur les mécanismes d'action toxique fondamentaux et qu'elle permet d'autre part d'identifier des protéines qui pourront plus tard servir de biomarqueurs pour certains polluants ou groupes de polluants. Des biomarqueurs de ce type existent déjà, comme par exemple les deux enzymes de détoxification précédemment cités ou bien la vitellogénine dont la synthèse est accrue lors de contaminations avec des hormones environnementales [4].

De premiers essais d'exposition ont maintenant montré que des poissons zèbres qui avaient été exposés à 1 μM de cadmium présentaient un profil protéique complètement différent des témoins non traités. Ainsi, la concentration de la chaîne lourde de la myosine était nettement augmentée. Le même effet a également été observé au niveau génique: le gène de la myosine a vu son expression stimulée chez des poissons zèbres exposés à du pé-

trole brut riche en métaux lourds. Dans les deux cas, les poissons exposés présentaient en outre une incurvation de la queue qui est une réaction connue à un contact avec des toxines.

De la même façon, l'analyse protéomique a permis de confirmer qu'une exposition à de l'œstradiol, l'hormone sexuelle femelle, induisait une augmentation des teneurs en vitellogénine. Actuellement, la nouvelle technologie est également employée par nos soins dans le projet « Genезis » qui étudie la différenciation sexuelle chez le poisson zèbre et qui bénéficie du financement du Fonds National Suisse. D'autre part, la technique étant maintenant bien implantée à l'Eawag, il est même envisageable de l'appliquer sans grande difficulté à d'autres organismes tels que les bactéries ou les algues vertes. ○○○

Fig. 3: Spectre de masse d'un peptide de la chaîne lourde de la myosine (protéine motrice des fibres musculaires). Voir détails dans le texte.



- [1] Nesatyy V.J., Suter M.J.F. (2007): Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Science and Technology* 41, 6891–6900.
- [2] Washburn M.P., Wolters D., Yates J.R. (2001): Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnology* 19, 242–247.
- [3] Durr E., Yu J.Y., Krasinska K.M., Carver L.A., Yates J.R., Testa J.E., Oh P., Schnitzer J.E. (2004): Direct proteomic mapping of the lung microvascular endothelial cell surface *in vivo* and in cell culture. *Nature Biotechnology* 22, 985–992.
- [4] Vermeirssen E.L.M., Burki R., Joris C., Peter A., Segner H., Suter M.J.F., Burkhardt-Holm P. (2005): Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2226–2233.

Publications

La liste complète et des fichiers pdf de toutes les publications de l'Eawag sont disponibles: http://library.eawag-empa.ch/eawag_publications.htm
Recherche par auteur, titre ou mot-clé. Pour tout renseignement: library@eawag-empa.ch

- Seehausen O.** (2007): Evolution and ecological theory – Chance, historical contingency and ecological determinism jointly determine the rate of adaptive radiation. *Heredity* 99 (4), 361–363.
- Yang J., Reichert P., Abbaspour K.C.** (2007): Bayesian uncertainty analysis in distributed hydro-logic modeling: A case study in the Thur River basin (Switzerland). *Water Resources Research* 43 (10), Article number W10401.
- Hudson A.G., Vonlanthen P., Müller R., Seehausen O.** (2007): Review: The geography of speciation and adaptive radiation in coregonines. *Advances in Limnology* 60, 111–146.
- Eckmann R., Gerdeaux D., Müller R., Rösch R.** (2007): Re-oligotrophication and whitefish fisheries management – A workshop summary. *Advances in Limnology* 60, 353–360.
- Müller R.** (2007): The re-discovery of the vanished «Edelfisch» *Coregonus nobilis* Haack, 1882, in Lake Lucerne, Switzerland. *Advances in Limnology* 60, 419–430.
- Fette M., Weber C., Peter A., Wehrli B.** (2007): Hydropower production and river rehabilitation: A case study on an alpine river. *Environmental Modeling & Assessment* 12 (4), 257–267.
- Meierhofer R., Wegelin M.** (2007): Was braucht es, damit SODIS erfolgreich ist? *Revue Lion* 1, 6–7.
- Meierhofer R.** (2007): Auf dem Weg nach Afrika. Welche Projekte werden unterstützt? *Lion Revue*, 1 S.
- Meierhofer R.** (2007): Begeisterte Teilnehmer an SODIS-Ausbildungs-Workshop in Uganda. *Lion Revue*, 2 S.
- Birkenmaier A., Holert J., Erdbrink H., Moeller H.M., Friemel A., Schoenenberger R., Suter M.J.F., Klebensberger J., Philipp B.** (2007): Biochemical and genetic investigation of initial reactions in aerobic degradation of the bile acid cholate in *Pseudomonas* sp strain Chol1. *Journal of Bacteriology* 189 (20), 7165–7173.
- Nesatyy V.J., Suter M.J.F.** (2007): Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms. *Environmental Science & Technology* 41 (20), 6891–6900.
- Tobias R., Würzebesser C., Mosler H.J.** (2007): A model of prospective memory and habit phenomena calibrated with dynamic field data. The 2007 European Simulation and Modelling Conference St. Julians. Malta, October 22–24, 373–380.
- Mosler H.J., Tobias R.** (2007): How do commitments work? An agent based simulation using data from a recycling campaign in Santiago de Cuba. **The 2007 International Conference on Artificial Intelligence, Las Vegas, USA, June 25–28, 6 pp.**
- Klump S., Tomonaga Y., Kienzler P., Kinzelbach W., Baumann T., Imboden D.M., Kipfer R.** (2007): Field experiments yield new insights into gas exchange and excess air formation in natural porous media. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 71 (6), 1385–1397.
- McCracken K.G., Beer J.** (2007): Long-term changes in the cosmic ray intensity at Earth, 1428–2005. *Journal of Geophysical Research* 112 (A10), Article number A10101, 15 pp.
- Wang Y., Hammes F., Boon N., Egli T.** (2007): Quantification of the filterability of freshwater bacteria through 0.45, 0.22, and 0.1 µm pore size filters and shape-dependent enrichment of filterable bacterial communities. *Environmental Science & Technology* 41 (20), 7080–7086.
- Ibelings B.W., Chorus I.** (2007): Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater «seafood» and its consequences for public health: A review. *Environmental Pollution* 150 (1), 177–192.
- Larsen T.A., Maurer M., Udert K.M., Lienert J.** (2007): Nutrient cycles and resource management: Implications for the choice of wastewater treatment technology. *Water Science and Technology* 56 (5), 229–237.
- Lienert J., Bürki T., Escher B.I.** (2007): Reducing micropollutants with source control: Substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine. *Water Science and Technology* 56 (5), 87–96.
- Pronk W., Zuleeg S., Lienert J., Escher B., Koller M., Berner A., Koch G., Boller M.** (2007): Pilot experiments with electro dialysis and ozonation for the production of a fertiliser from urine. *Water Science and Technology* 56 (5), 219–227.
- Kunz Y., Pohl J., Langhans S.D.** (2007): Uferbezogene Indikatoren – Neue Ansätze zur Fließgewässerbewertung. *Wasser Energie Luft* 99 (1), 71–74.
- Koné D., Cofie O., Zurbrügg C., Gallizzi K., Mosser D., Drescher S., Strauss M.** (2007): Helminth eggs inactivation efficiency by faecal sludge dewatering and co-composting in tropical climates. *Water Research* 41 (19), 4397–4402.
- Doering M., Uehlinger U., Rotach A., Schlaepfer D.R., Tockner K.** (2007): Ecosystem expansion and contraction dynamics along a large Alpine alluvial corridor (Tagliamento River, Northeast Italy). *Earth Surface Processes and Landforms* 32 (11), 1693–1704.
- Alder A.C., Bruchet A., Carballa M., Clara M., Joss A., Löffler D., McArdell C.S., Miksch K., Omil F., Tuhkanen T., Ternes T.A.** (2006): The challenge of micropollutants in urban water management (Chapter 2). In: Ternes T.A., A. Joss (Eds.) *Human Pharmaceuticals, Hormones and Fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management*. IWA Publishing, London, UK, 15–54.
- Efimov A.E., Tonevitsky A.G., Dittrich M., Matisko N.B.** (2007): Atomic force microscope (AFM) combined with the ultramicrotome: a novel device for the serial section tomography and AFM/TEM complementary structural analysis of biological and polymer samples. *Journal of Microscopy* 226 (3), 207–217.
- Müller B., Stöckli A., Stierli R., Butscher E., Gächter R.** (2007): A low cost method to estimate dissolved reactive phosphorus loads of rivers and streams. *Journal of Environmental Monitoring* 9 (1), 82–86.
- Muscheler R., Joos F., Beer J., Müller S.A., Vonmoos M., Snowball I.** (2007): Solar activity during the last 1000 yr inferred from radionuclide records. *Quaternary Science Reviews* 26 (1–2), 82–97.
- Robinson C.T., Buser T.** (2007): Density-dependent life history differences in a stream mayfly (*Deleatidium*) inhabiting permanent and intermittent stream reaches. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 41 (3), 265–271.
- Vonlanthen P., Excoffier L., Bittner D., Persat H., Neuenschwander S., Largiadèr C.R.** (2007): Genetic analysis of potential postglacial watershed crossings in Central Europe by the bullhead (*Cottus gobio* L.). *Molecular Ecology* 16 (21), 4572–4584.
- Wittmer D., Lichtensteiger T.** (2007): Development of anthropogenic raw material stocks: A retrospective approach for prospective scenarios. *Minerals and Energy – Raw Materials Report* 22 (1–2), 62–71.
- Dytczak M.A., Londry K.L., Siegrist H., Oleszkiewicz J.A.** (2007): Ozonation reduces sludge production and improves denitrification. *Water Research* 41 (3), 543–550.
- Hölker F., Dörner H., Schulze T., Haertel-Borer S.S., Peacor S.D., Mehner T.** (2007): Species-specific responses of planktivorous fish to the introduction of a new piscivore: implications for prey fitness. *Freshwater Biology* 52 (9), 1793–1806.
- Kwon J., Liljestran H.M., Katz L.E., Yamamoto H.** (2007): Partitioning thermodynamics of selected endocrine disruptors between water and synthetic membrane vesicles: Effects of membrane

compositions. *Environmental Science & Technology* 41 (11), 4011–4018.

Ort C., Siegrist H., Hosbach H., Studer C., Morf L., Scheringer M. (2007): Mikroverunreinigungen. Nationales Stoffflussmodell. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 853–859.

Hollender J., McArdell C.S., Escher B.I. (2007): Mikroverunreinigungen. Vorkommen in Gewässern der Schweiz. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 843–852.

Cirja M., Zuehlke S., Ivashechkin P., Hollender J., Schäffer A., Corvini P.F.X. (2007): Behavior of two differently radiolabelled 17β -ethinylestradiols continuously applied to a laboratory-scale membrane bioreactor with adapted industrial activated sludge. *Water Research* 41 (19), 4403–4412.

Lienert J., Larsen T.A. (2007): Soft paths in wastewater management – the pros and cons of urine source separation. *GAIA* 16 (4), 280–288.

Zeidenitz C., Mosler H.J., Hunziker M. (2007): Outdoor recreation: From analysing motivations to furthering ecologically responsible behaviour. *Forest Snow and Landscape Research* 81 (1–2), 175–190.

Herlyn A., Maurer M. (2007): Status quo der Schweizer Abwasserentsorgung. Kosten, Zustand und Investitionsbedarf. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (3), 171–176.

Herlyn A., Maurer M. (2007): Was ARA und Kanalisation kosten. *Umwelt Perspektiven* 2007 (1), 20–21.

Stamm C., Frey M., Reichert P. (2007): Managing critical source areas to reduce diffuse herbicide losses – prospects and limitations. A Swiss case study. *AFPP – Protection des eaux de surface contre les transferts diffuse de produits phytosanitaires*, Paris, France, November 15–16, 2007, 8 pp.

Baccini P., Baumgartner F., Lichtensteiger T., Michaeli M., Thalman E. (2007): Urbane Schweiz. In: *Anonymous Klimaänderung und die Schweiz 2050*. OcCC/ProClim, Bern, Schweiz, 123–136.

Siegrist H., Joss A. (2007): Mikroverunreinigungen. Technische Verfahren zur Elimination. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 861–867.

Siegrist H., Salzgeber D., Eugster J., Joss A. (2007): Anammox brings WWTP closer to energy autarky due to increased biogas production and reduced aeration energy for N-removal. 11th World Congress on Anaerobic Digestion (AD11), Brisbane, Australia, September 24–27, 2007, 7 pp.

Siegrist H., Joss A., Ternes T. (2007): Fate of micropollutants in drinking and wastewater treatment and consequences for process design. 4th Leading Edge Conference on Water and Wastewater Technologies, Singapore, 3–6 June, 2007, 8 pp.

Menon M., Robinson B., Oswald S.E., Kaestner A., Abbaspour K.C., Lehmann E., Schulin R. (2007): Visualization of root growth in heterogeneously contaminated soil using neutron radiography. *European Journal of Soil Science* 58 (3), 802–810.

Salzgeber D., Joss A., Siegrist H. (2007): Autotrophe Schlammwasserentstickung (Nitritation/Anammox). Im SBR-Verfahren (Sequencing batch reactor). *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (3), 205–209.

Herlyn A., Maurer M. (2007): Zustand und Investitionsbedarf der Schweizer Abwasserentsorgung. *Schweizer Gemeinde* 44 (11; Nr. 441), 14–17.

Winkel L., Alxneit I., Sturzenegger M. (2007): New paths for a SO_2 -free copper production. *Minerals Engineering* 20 (12), 1179–1183.

Deplazes G., Anselmetti F.S. (2007): Auf den Spuren des Flimser Bergsturzes in Lag La Cauma und Lag Grond. *Geosciences ACTUEL* 2007 (3), 46–50.

Liu J., Williams J.R., Zehnder A.J.B., Yang H. (2007): GEPIC – modelling wheat yield and crop water productivity with high resolution on a global scale. *Agricultural Systems* 94 (2), 478–493.

Liu J., Wiberg D., Zehnder A.J.B., Yang H. (2007): Modeling the role of irrigation in winter wheat yield, crop water productivity, and production in China. *Irrigation Science* 26 (1), 21–33.

Liu J. (2007): Modelling global water and food relations – development and application of a GIS-based EPIC model. Dissertation 17069, ETH-Zürich, Switzerland, 118 pp.

Liu J., Zehnder A.J.B., Yang H. (2007): Drops for crops: modelling crop water productivity on a global scale. Proceedings of the 10th International Conference on Environment Science and Technology, Kos island, Greece, September 5–7, 2007, A-835–A-842.

Robinson C.T., Hieber M., Wenzelides V., Lods-Crozet B. (2007): Macroinvertebrate assemblages of a high elevation stream/lake network with an emphasis on the Chironomidae. *Fundamental and Applied Limnology* 169 (1), 25–36.

Chèvre N., Loepfe C., Fenner K., Singer H., Escher B. (2007): Pesticides dans les eaux superficielles de Suisse. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (7), 529–539.

Canonica S. (2007): Oxidation of aquatic organic contaminants induced by excited triplet states. *Chimia* 61 (10), 641–644.

Nozhevnikova A.N., Nekrasova V., Ammann A., Zehnder A.J.B., Wehrli B., Holliger C. (2007): Influence of temperature and high acetate concentrations on methanogenesis in lake sediment slurries. *FEMS Microbiology Ecology* 62 (3), 336–344.

Hoehn E. (2007): Überwachung der Auswirkung von Flussaufweitungen auf das Grundwasser mittels Radon. *Grundwasser* 12 (31), 66–72.

Hoehn E., Cirkpa O., Hofer M., Zobrist J., Kipfer R., Baumann M., Scholtis A., Favero R. (2007): Untersuchungsmethoden der Flussinfiltration. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (7), 497–505.

Markard J. (2007): E-Track: Entwicklung eines Standards. Wie sich Eigenschaften der Stromerzeugung in Europa verfolgen und bilanzieren lassen. *Bulletin SEV/VSE* Jg. 98 (16), 28–31.

Moser R., McArdell C.S., Weissbrodt D. (2007): Mikroverunreinigungen. Vorbehandlung von Spitalabwasser. *GWA Gas, Wasser, Abwasser* 87 (11), 869–875.

Reichert P., Borsuk M.E., Hostmann M., Schweizer S., Spörri C., Tockner K., Truffer B. (2007): Concepts of decision support for river rehabilitation. *Environmental Modelling & Software* 22 (2), 188–201.

Heimerl S., Kohler B., Ruef A., Markard J., Schneider M.F.K., Wieprecht S. (2007): Machbarkeitsstudie für Grün-Strom-Zertifizierung aus Wasserkraft für Deutschland abgeschlossen. *Wasserwirtschaft* 97 (5), 39–40.

Flichakova N., Bader H.P., Scheidegger R., Robinson D., Scartezzini J.-L. (2007): Urban district energy futures: A dynamic material flow analysis (MFA) model. Proceedings of Renewables in a changing Climate Innovation in the built environment CISBAT, Lausanne, Switzerland, September 4–5, 585–590.

Bader H.P., Scheidegger R., Real M. (2007): Photovoltaic energy on a global scale: Dynamic modelling of implementation and costs. Proceedings of Renewables in a changing Climate Innovation in the built environment CISBAT, Lausanne, Switzerland, September 4–5, 541–546.

Seyler C., Oetjen L., Bader H.P., Scheidegger R., Kytzia S. (2007): Potentials for mineral construction wastes as secondary resources in Switzerland – case study on concrete wastes. Congress Proceedings of the R'07 World Congress on Recovery of Material and Energy for Resource Efficiency, Davos, Switzerland, September 3–5, 6 pp.

Buser A., Morf L., Taverna R., Bader H.P., Scheidegger R. (2007): Temporal behaviour of the anthropogenic metabolism of selected brominated flame retardants: Emissions to the environment. 4th International Workshop on Brominated Flame Retardants, Amsterdam, The Netherlands, April 24–27, 4 pp.

Kwonpongagoon S., Scheidegger R., Bader H.P. (2007): Modeling the cadmium flows in Australia. Proceedings of the 2nd International Conference on Asian Simulation and Modelling (ASIMMOD) Chian Mai, Thailand, January 9–11, 364–370.

- Bader H.P., Scheidegger R., Gujer W., Huang D.** (2007): Modellierungsunterstützte Suche nach neuen Lösungen für das Abwassermanagement in Kunming (China). Simulation in Umwelt- und Geowissenschaften, Workshop, Berlin, Deutschland, 22.–23. März, 61–70.
- Huang D., Bader H.P., Scheidegger R., Schertenleib R., Gujer W.** (2007): Confronting limitations: New solutions required for urban water management in Kunming City. *Journal of Environmental Management* 84 (1), 49–61.
- Bluemling B., Yang H., Pahl-Wostl C.** (2007): Making water productivity operational – A concept of agricultural water productivity exemplified at a wheat-maize cropping pattern in the North China plain. *Agricultural Water Management* 91 (1–3), 11–23.
- Gabriel F.L.P., Cyris M., Giger W., Kohler H.P.E.** (2007): ipso-Substitution: A General Biochemical and Biodegradation Mechanism to Cleave α -Quaternary Alkylphenols and Bisphenol A. *Chemistry & Biodiversity* 4 (9), 2123–2137.
- Borer P.M., Hug S.J., Sulzberger B., Kraemer S.M., Kretzschmar R.** (2007): Photolysis of citrate on the surface of lepidocrocite: An *in situ* attenuated total reflection infrared spectroscopy study. *Journal of Physical Chemistry C* 111 (28), 10560–10569.
- Roberts L.C., Hug S.J., Dittmar J., Voegelin A., Saha G.C., Ali M.A., Badruzzaman A.B.M., Kretzschmar R.** (2007): Spatial distribution and temporal variability of arsenic in irrigated rice fields in Bangladesh. 1. Irrigation water. *Environmental Science & Technology* 41 (17), 5960–5966.
- Dittmar J., Voegelin A., Roberts L.C., Hug S.J., Saha G.C., Ali M.A., Badruzzaman A.B.M., Kretzschmar R.** (2007): Spatial distribution and temporal variability of arsenic in irrigated rice fields in Bangladesh. 2. Paddy soil. *Environmental Science & Technology* 41 (17), 5967–5972.
- Katsoyiannis I.A., Hug S.J., Ammann A., Zikoudi A., Hatziliontos C.** (2007): Arsenic speciation and uranium concentrations in drinking water supply wells in Northern Greece: Correlations with redox indicative parameters and implications for ground-water treatment. *Science of the Total Environment* 383 (1–3), 128–140.
- Miniaci C., Bunge M., Duc L., Edwards I., Bürgmann H., Zeyer J.** (2007): Effects of pioneering plants on microbial structures and functions in a glacier forefield. *Biology and Fertility of Soils* 44 (2), 289–297.
- Neretin L.N., Abed R.M.M., Schippers A., Schubert C.J., Kohls K., Kuypers M.M.M.** (2007): Inorganic carbon fixation by sulfate-reducing bacteria in the Black Sea water column. *Environmental Microbiology* 9 (12), 3019–3024.
- Störmer E., Wegelin C., Truffer B.** (2007): Lokale Systeme unter globalen Einflüssen langfristig planen. «Regional Infrastructure Foresight» als Ansatz zum Umgang mit Unsicherheiten bei Abwasserinfrastruktursystemen. In: Bora A., S.Bröchler, M. Decker (Eds.) *Technology Assessment in der Weltgesellschaft*. Edition Sigma, Berlin, Deutschland, 123–132.
- Bontes B.M., Verschoor A.M., Pires L.M.D., van Donk E., Ibelings B.W.** (2007): Functional response of *Anodonta anatina* feeding on a green alga and four strains of cyanobacteria, differing in shape, size and toxicity. *Hydrobiologia* 584, 191–204.
- Störmer E.** (2007): Strategieplanung für Abwasserentsorgung. *Umwelt Perspektiven* 2007 (5), 12–16.
- Schubert U., Störmer E.** (Eds.) (2007): Sustainable development in Europe. Concepts, evaluation and application. In: Martinuzzi A., P. Hardi (Eds.) *Evaluating sustainable development*. Edward Elgar Publishing, Cheltenham UK and Northampton (MA) USA, 368 pp.
- Muscheler R., Joos F., Beer J., Müller S.A., Vonmoos M., Snowball I.** (2007): Reply to the comment by Bard et al. on «Solar activity during the last 1000 yr inferred from radionuclide records». *Quaternary Science Reviews* 26 (17–18), 2304–2308.
- Renn O., Dreyer M., Klinke A., Schweizer P.J.** (2007): Systemische Risiken: Charakterisierung, Management und Integration in eine aktive Nachhaltigkeitspolitik. In: Anonymous Soziale Nachhaltigkeit, Metropolis, Marburg, 161–191.
- Heck T., Frank M., Anselmetti F.S., Kubick P.W.** (2007): Origin and age of submarine ferromanganese hardgrounds from the Marion Plateau, offshore northeast Australia. *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results* 194, Manuscript number 194SR-008 (22 pp.).
- Cheshenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O., Eggen R.I.L.** (2008): Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155 (1), 31–62.
- Bezault E., Clota F., Derivaz M., Chevassus B., Baroiller J.F.** (2007): Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. *Aquaculture* 272 (Supplement 1, Genetics in Aquaculture IX), S3–S16.
- Larned S., Datry T., Robison C.T.** (2007): Invertebrate and microbial responses to inundation in an ephemeral river reach in New Zealand: effects of preceding dry periods. *Aquatic Sciences*, 14 pp.
- Ohlendorf C., Sturm M.** (2007): A modified method for biogenic silica determination. *Journal of Paleolimnology* 39 (1), 137–142.
- von Gunten L., Heiri O., Bigler C., van Leeuwen J., Casty C., Lotter A.F., Sturm M.** (2007): Seasonal temperatures for the past ~ 400 years reconstructed from diatom and chironomid assemblages in a high-altitude lake (Lej da la Tscheppa, Switzerland). *Journal of Paleolimnology Online First*, 17 pp.
- Blass A., Grosjean M., Livingstone D.M., Sturm M.** (2007): Signature of explosive volcanic eruptions in the sediments of a high-altitude Swiss lake. *Journal of Paleolimnology* 39 (1), 35–42.
- Wedekind C., Evanno G., Urbach D., Jacob A., Müller R.** (2007): «Good-genes» and «compatible-genes» effects in an Alpine whitefish and the information content of breeding tubercles over the course of the spawning season. *Genetica* 132 (2), 199–208.
- Kallivretaki E., Eggen R.I.L., Neuhaus S.C.F., Kah O., Segner H.** (2007): The zebrafish, brain-specific, aromatase *cyp19a2* is neither expressed nor distributed in a sexually dimorphic manner during sexual differentiation. *Developmental Dynamics* 236, 3155–3166.
- Matzinger A., Pieters R., Ashley K.I., Lawrence G.A., Wüest A.** (2007): Effects of impoundment on nutrient availability and productivity in lakes. *Limnology and Oceanography* 52 (6), 2629–2640.
- Kwon J.H., Lee H.K., Kwon J.W., Kim K., Park E., Kang M., Kim Y.H.** (2007): Mutagenic activity of river water from a river near textile industrial complex in Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*.
- Witte F., Wanink J.H., Kische-Machumu M., Mkumbo O.C., Goudswaard P.C., Seehausen O.** (2007): Differential decline and recovery of haplochromine trophic groups in the Mwanza Gulf of Lake Victoria. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 10 (4), 416–433.
- Seehausen O., Takimoto G., Roy D., Jokela J.** (2008): Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular Ecology* 17 (1), 30–44.
- Jacob A., Nusslé S., Britschgi A., Evanno G., Müller R., Wedekind C.** (2007): Male dominance linked to size and age, but not to «good genes» in brown trout (*Salmo trutta*). *BMC Evolutionary Biology* 7, Article number 207.
- Acuña V., Dahm C.N.** (2007): Impact of monsoonal rains on spatial scaling patterns in water chemistry of a semiarid river network. *Journal of Geophysical Research* 112, Paper number G04009 (11 pp.).
- van der Sluijs I., van Alphen J.J.M., Seehausen O.** (2007): Preference polymorphism for coloration but no speciation in a population of Lake Victoria cichlids. *Behavioral Ecology Advance Access published online*, 7 pp.

- Robinson C.T., Matthaei S.** (2007): Hydrological heterogeneity of an alpine stream-lake network in Switzerland. *Hydrological Processes* 21 (23), 3146–3154.
- Helle S., Helama S., Jokela J.** (2007): Temperature-related birth sex ratio bias in historical Sami: warm years bring more sons. *Biology Letters* First cite early online publishing, 3 pp.
- Pettay J.E., Helle S., Jokela J., Lummaa V.** (2007): Natural Selection on Female Life-History Traits in Relation to Socio-Economic Class in Pre-Industrial Human Populations. *PLoS ONE* 2 (7), e606 (9 pp.).
- Yang H., Zehnder A.J.B.** (2007): «Virtual water»: An unfolding concept in integrated water resources management. *Water Resources Research* 43, Article number W12301 (10 pp.).
- Finger D., Schmid M., Wüest A.** (2007): Comparing effects of oligotrophication and upstream hydropower dams on plankton and productivity in perialpine lakes. *Water Resources Research* 43, Article number W12404 (27 pp.).
- Lienert J., Larsen T.A.** (2007): Pilot projects in bathrooms: a new challenge for wastewater professionals. *Water Practice & Technology* 2 (3).
- Dijkstra P.D., Seehausen O., Groothuis T.G.G.** (2007): Intrasexual competition among females and the stabilization of a conspicuous colour polymorphism in a Lake Victoria cichlid fish. *Proceedings of the Royal Society B FirstCite e-Publishing*, 8 pp.
- Burkhardt M., Rossi L., Boller M.** (2008): Diffuse release of environmental hazards by railways. *Desalination* 226, 106–113.
- Kwonpongsagoon S., Bader H.P., Scheidegger R.** (2007): Modelling cadmium flows in Australia on the basis of a substance flow analysis. *Clean Technologies and Environmental Policy* 9 (4), 313–323.
- Liu J., Zehnder A.J.B., Yang H.** (2007): Historical trends in China's virtual water trade. *Water International* 32 (1), 78–90.
- Liu J., Yang H., Zehnder A.J.B.** (2007): Simulation of crop water relations on large scales with high spatial resolutions. *TIAS-GWSP workshop «Global Environmental Assessments: Bridging Scales and Linking to Policy»*, Issues in global water system research, No. 2, Adelphi, Maryland, USA, May 10–11, 2007, 44–48.
- Forster D., Bühler Y., Kellenberger T.W.** (2007): Object-oriented land cover/land use classification for upscaling agricultural nutrient budgets. In: Bill R. (Ed.) *GIS – Theory and Applications*, Textbook for the DAAD Summer School, Internal Report, Volume 16, Rostock University, Rostock, Germany, 177–188.
- Kracht O., Gresch M., Gujer W.** (2007): A stable isotope approach for the quantification of sewer infiltration. *Environmental Science and Technology* 41 (16), 5839–5845.
- Rieckermann J., Bares V., Kracht O., Braun D., Gujer W.** (2007): Estimating sewer leakage from continuous tracer experiments. *Water Research* 41 (9), 1960–1972.
- Huang D.B., Scholz R.W., Gujer W., Chitwood D.E., Loukopoulos P., Schertenleib R., Siegrist H.** (2007): Discrete event simulation for exploring strategies: An urban water management case. *Environmental Science and Technology* 41 (3), 915–921.
- Störmer E.** (2008): Greening as strategic development in industrial change – Why companies participate in eco-networks. *Geoforum* 39, 32–47.
- Tellenbach C., Wolinska J., Spaak P.** (2007): Epidemiology of a *Daphnia* brood parasite and its implications on host life-history traits. *Oecologia* 154 (2), 369–375.
- Truffer B., Markard J., Wüstenhagen R.** (2007): Eco-labeling of electricity – strategies and trade-offs in the definition of environmental standards. In: Teisl, M. (Ed.) *Labelling strategies in environmental policy*. Ashgate Publishing Limited, Hampshire, England, 353–365.
- Vermeirssen E.L.M., Asmin J., Escher B.I., Kwon J.H., Steimen I., Hollender J.** (2008): The role of hydrodynamics, matrix and sampling duration in passive sampling of polar compounds with Empore™ SDB-RPS disks. *Journal of Environmental Monitoring* 10 (1), 119–128.
- Boller M., Langbein S., Steiner M.** (2007): Characterization of road runoff and innovative treatment technologies. In: Morrison G.M., P. Rauch S. (Eds.) *Highway and urban environment – Proceedings of the 8th Highway and Urban Environment Symposium*, Springer, 441–452.
- Steiner M., Langbein S., Boller M.** (2007): Development and full-scale implementation of a new treatment scheme for road runoff. In: Morrison G.M., S. Rauch (Eds.) *Highway and Urban Environment – Proceedings of the 8th Highway and Urban Environment Symposium*, Springer, 453–463.
- Burkhardt M., Kasteel R., Vanderborght J., Vereecken H.** (2008): Field study on colloid transport using fluorescent microspheres. *European Journal of Soil Science* 59 (1), 82–93.
- Grünschloß L., Hanika J., Schwede R., Keller A.** (2007): (t, m, s)-Nets and maximized minimum distance. *Monte Carlo and Quasi-Monte Carlo Methods 2006*, Proceedings of the 7th International Conference on Monte Carlo and Quasi-Monte Carlo Methods in Scientific Computing, Ulm, Germany, August 14–18, 2006, 397–412.
- Neuenschwander S., Largiadèr C.R., Ray N., Currat M., Vonlanthen P., Excoffiere L.** (2008): Colonization history of the Swiss Rhine basin by the bullhead (*Cottus gobio*): Inference under a Bayesian spatially explicit framework. *Molecular Ecology*.
- Thevenon F., Anselmetti F.S.** (2007): Charcoal and fly-ash particles from Lake Lucerne sediments (Central Switzerland) characterized by image analysis: anthropologic, stratigraphic and environmental implications. *Quaternary Science Reviews* 26 (19–21), 2631–2643.
- Holzner C.P., McGinnis D.F., Schubert C.J., Kipfer R., Imboden D.M.** (2008): Noble gas anomalies related to high-intensity methane gas seeps in the Black Sea. *Earth and Planetary Science Letters* 265 (3–4), 396–409.
- Luo J., Cirpka O.A., Dentz M., Carrera J.** (2008): Temporal moments for transport with mass transfer described by an arbitrary memory function in heterogeneous media. *Water Resources Research* 44, Article number W01502 (7 pp.).
- Hollender J., Singer H., Mcardell C.S.** (2008): Polar organic micropollutants in the water cycle. Dangerous pollutants (xenobiotics) in urban water cycle. *Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Dangerous Pollutants (Xenobiotics) in Urban Water Cycle*, Lednice, Czech Republic, May 3–6, 2007, 103–116.
- Tuominen I., Pollari M., von Wobeser E.A., Tyystjärvi E., Ibelings B.W., Matthijs H.C.P., Tyystjärvi T.** (2008): Sigma factor SigC is required for heat acclimation of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *FEBS Letters* 582 (2), 346–355.
- Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M., Köster O., Egli T.** (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Research* 42 (1–2), 269–277.
- Mieleitner J., Reichert P.** (2008): Modelling functional groups of phytoplankton in three lakes of different trophic state. *Ecological Modelling* 211 (3–4), 279–291.
- Aeppli C., Berg M., Hofstetter T.B., Kipfer R., Schwarzenbach R.P.** (2008): Simultaneous quantification of polar and non-polar volatile organic compounds in water samples by direct aqueous injection-gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1181 (1–2), 116–124.
- Tobias R., Mosler H.J.** (2007): Einsatz der Computersimulation in der Umweltpsychologie. *Umweltpsychologie* 11 (2), 22–37.
- Steinhilber F., Abreu J.A., Beer J.** (2008): Solar modulation during the Holocene. *Astrophysics and Space Sciences* 1 (4), 1–6.
- Lively C.M., Delph L.F., Dybdahl M.F., Jokela J.** (2008): Experimental test for a co-evolutionary hotspot in a host–parasite interaction. *Evolutionary Ecology Research* 10, 95–103.

Eawag spin-off: Gestion des eaux de ruissellement

Après coup, Michele Steiner était tout de même un peu effrayé de sa propre audace: parviendrait-il réellement à s'imposer dans le monde difficile de l'entreprise? Il y a maintenant deux ans qu'il a créé la société wst21 – Wasser, Strategie und Technologie im 21. Jahrhundert / Eau, Stratégie et Technologie au 21^{ème} siècle.

La décision n'a pas été facile pour Michele Steiner de quitter le cadre rassurant de la recherche de l'Eawag pour monter sa propre entreprise. Soutenu et encouragé par le professeur Markus Boller, son mentor à l'Eawag, c'est fin 2005 que cet ingénieur environnemental d'EPF Zurich a finalement franchi le pas en créant wst21. Il lui fallait s'immerger dans un monde complètement nouveau: tout apprendre du marketing et du corporate design, choisir la forme juridique de sa société, s'inscrire au registre du commerce, contracter les assurances nécessaires, apprendre à rédiger et conclure des contrats et bien entendu acquérir les premiers mandats. Mais fort d'un bagage solide conféré par plusieurs années d'études et de recherche, Michele Steiner se sentait prêt à relever le défi.

wst21 – Eau, stratégie et technologie au 21^{ème} siècle. La philosophie de wst21 est de conjuguer le développement technique et la planification stratégique pour résoudre les problèmes concrets de la gestion des eaux urbaines d'aujourd'hui. L'activité est centrée sur les eaux de voiries et plus accessoirement sur celles ruisselant des toitures et façades. Ainsi, wst21 se charge actuellement à Attinghausen du suivi d'une installation de traitement des eaux de ruissellement autoroutières provenant d'un tronçon d'environ 2 km de l'axe du St Gothard. Son rôle est tout d'abord d'évaluer la pertinence des réglages et du dimensionnement de l'installation de manière à tirer profit des écarts éventuels par rapport à l'optimum pour minimiser les coûts d'installations futures du même

type. Ensuite, wst21 contrôle la justesse des plans et concepts élaborés pour l'exploitation de la station et le traitement des effluents et se charge de répondre aux questions techniques qui se présentent. Par exemple: quand faut-il régénérer ou remplacer les couches de sable ou d'adsorbant? A quelle fréquence faut-il curer les conduites et pomper les boues? Parmi ses mandats, wst21 compte aussi bien des organismes publics au niveau communal, cantonal et national que des bureaux d'études et des particuliers.

Un envol réussi. Avant la fondation officielle de wst21, l'Eawag a prêté main forte à la création de l'entreprise par de nombreux conseils tant sur le plan administratif que scientifique. De plus, la jeune entreprise a pu utiliser les locaux et l'infrastructure de l'Eawag pendant deux ans à un prix très raisonnable. Autant d'avantages dont Michele Steiner a su tirer profit et dont il est particulièrement reconnaissant. Aussi tient-il à préserver et entretenir des contacts étroits avec l'Eawag et le monde de la recherche en général. Aujourd'hui, wst21 emploie déjà 3 personnes et ses locaux sont installés sur le site du Technopark de Zurich depuis décembre 2007.

www.wst21.ch



Martina Bauchrowitz

Installation de traitement des eaux de ruissellement autoroutières sur l'axe du St Gothard. Grâce aux données livrées par son suivi, wst21 élabore des bases de calcul pour le dimensionnement d'installations à venir.

Une mine d'expérience et de savoir-faire



C'est en 1997 que Michele Steiner est venu renforcer les rangs de l'Eawag. Son premier travail, une étude bibliographique, portait sur l'évaluation d'adsorbants potentiels pour l'élimination des métaux lourds tels que le cuivre et le zinc véhiculés par les eaux de toiture et de façade. Dans la thèse qu'il a ensuite effectuée, il s'est alors chargé de tester par voie expérimentale l'efficacité et les possibilités d'utilisation pratique des matériaux les plus prometteurs. Un système de filtration basé sur un mélange d'hydroxyde de fer granulaire et de sable calcaire s'est révélé particulièrement satisfaisant et a été depuis utilisé avec succès dans divers projets, notamment la construction d'une extension de l'Office fédéral de métrologie de Wabern (BE) à la façade entièrement recouverte de cuivre. Michele Steiner s'est d'autre part consacré dans le cadre d'un projet postdoctoral au traitement des eaux polluées ruisselant des autoroutes et autres voies de circulation fortement fréquentées. Son but était d'une part de développer de nouveaux procédés techniques allouant fort rendement d'épuration et faible empreinte au sol et d'autre part d'élaborer des stratégies de suivi permettant d'évaluer l'efficacité des nouveaux systèmes installés.



Un nouveau centre d'écotoxicologie

La recherche sur les risques liés aux substances chimiques doit être avancée en Suisse. Telle est la conclusion à laquelle ont abouti le Conseil fédéral et le Parlement. Par un travail commun, l'Eawag et l'EPFL mettent actuellement en place un nouveau centre d'écotoxicologie appliquée.

Dans son rapport de mai 2007 sur la recherche toxicologique indépendante en Suisse, le Conseil fédéral aboutit à la conclusion que les ressources et structures universitaires actuelles sont insuffisantes pour créer les bases nécessaires à l'évaluation des risques que représentent les produits chimiques pour la santé, l'environnement et la sécurité. Grâce au feu vert donné en octobre 2007 par le Parlement, l'Eawag peut maintenant mettre en place un nouveau centre d'écotoxicologie appliquée en collaboration avec l'EPFL.

Des liens étroits avec la recherche, l'enseignement et la pratique. Grâce aux 2 millions de francs qui lui sont octroyés chaque année, le centre d'écotoxicologie appliquée est en mesure de fournir trois grands types de prestations:

► Un carrefour d'échanges: le centre suit de près les évolutions nationales et internationales dans le domaine de l'écotoxicologie appliquée et débat des problèmes actuels et futurs ainsi que de pistes de résolution éventuelles par des contacts réguliers avec des représentants de la pratique et du monde scientifique.

► Recherche et développement: le centre se chargera notamment de la mise au point de méthodes d'évaluation économiques en temps et en moyens pour la mise en évidence des effets écotoxiques, de nouvelles méthodes d'analyse chimique et de modèles faciles d'utilisation pour la simulation des risques liés aux produits chimiques.

► Une plateforme d'information: le centre assure la publication des résultats pertinents dans les revues spécialisées et diffuse d'autre part ses informations par le biais d'Internet, d'un bulletin d'informations, de communiqués et article dans les médias et sous la forme d'une formation

continue à l'intention des spécialistes et des étudiants. D'autre part, son Service public se charge de la transmission de renseignements spécialisés.

Double-implantation à Dübendorf et à Lausanne. Sous la tutelle du Pr. Rik Eggen, directeur adjoint de l'Eawag, une taskforce nationale a assuré la conception et l'accompagnement de la création

du centre d'écotoxicologie. La nouvelle institution est implantée à l'Eawag à Dübendorf (avec env. 6 personnes) et à l'EPFL de Lausanne (avec env. 3 personnes). Alors que la recherche de Dübendorf se concentre sur les questions d'écotoxicologie aquatique, c'est aux aspects terrestres que se consacre l'équipe de Lausanne. Le centre d'écotoxicologie appliquée pratique également la recherche sur mandat mais ne saurait faire concurrence aux organismes privés. Au contraire il souhaite offrir ses services en cas de besoin d'expertise indépendante ou de compétences spécialisées non disponibles par voie interne.



Martina Bauchrowitz

Trois questions à la nouvelle directrice du centre d'écotoxicologie



Le nouveau centre d'écotoxicologie appliquée sera dirigé par la biologiste **Almut Gerhardt** qui a pris ses fonctions le 1^{er} juin 2008. Parallèlement à un parcours universitaire dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique, Almut Gerhardt a fondé et dirigé sa propre entreprise, LimCo International.

Qu'est-ce qui vous intéresse dans votre nouvelle fonction ?

Dans l'édification de quelque chose d'entièrement nouveau, il y a un côté pionnier qui me correspond bien. D'autre part, je suis particulièrement motivée par la perspective de faire de la recherche appliquée en écotoxicologie pour développer des produits concrets comme par exemple des tests sensibles pour l'évaluation des substances chimiques et pour l'application au suivi écotoxicologique de l'état des cours d'eau. Enfin, nous avons ici la possibilité de transmettre directement nos connaissances d'application pratique aux étudiants et aux utilisateurs et donc de poser des jalons pour l'avenir.

Quels sont les apports du nouveau centre par rapport aux hautes écoles ou au privé ?

De par son ancrage dans le domaine des EPF, le centre est au plus près de la recherche. Il peut très rapidement saisir les résultats intéressants et les utiliser pour développer des produits pour la pratique. Je pense tout particulièrement à des tests de toxicité, des logiciels d'évaluation des risques ou du matériel d'enseignement. Les hautes écoles universitaires sont plutôt impliquées dans la recherche fondamentale et les entreprises privées sont contraintes de s'adapter au marché pour le développement de leurs produits.

Quels sont les projets de recherche que vous souhaitez démarrer en priorité ?

D'un côté, les projets déjà entamés qui portent sur l'évaluation des polluants sur la base de leurs effets doivent être poursuivis et élargis. De l'autre, nous voulons lancer de nouveaux projets de recherche pluridisciplinaire. Je pense notamment au développement d'une plateforme de capteurs multimétriques. Elle permettrait de mesurer simultanément divers paramètres biologiques, physiques et chimiques et de les mettre en relation avec les paramètres écologiques du milieu surveillé.

Notes

12 septembre 2008: Journée d'information de l'Eawag

Du milieu naturel au verre d'eau – une eau potable de qualité pour aujourd'hui et pour demain

La quantité et la qualité de l'eau potable dépendent des ressources en eau d'où elle est puisée. Cette année, la journée d'information de l'Eawag sera consacrée aux différents aspects de cette relation de dépendance. Les questions les plus diverses seront traitées: Quel est le rôle des cours d'eau dans la protection des eaux souterraines? Les changements climatiques ont-ils une influence sur les ressources en eau? Et comment évaluer à l'échelle globale le risque lié aux pollutions géogènes? Le colloque présentera d'autre part les principaux résultats du projet transversal de l'Eawag sur l'approvisionnement en eau au XXI^{ème} siècle intitulé Wave21 (pour «Wasserversorgung im 21. Jahrhundert»). En plus de nouvelles méthodes d'évaluation de la qualité sanitaire de l'eau de consommation et d'élimination des éléments traces organiques, les approches modernes de potabilisation de l'eau seront présentées. En langue allemande. infotag@eawag.ch



Voyage d'étude sur le Yangzi Jiang



Pour la première fois dans l'histoire, le gouvernement de Pékin a autorisé une équipe de scientifiques étrangers à venir étudier avec leurs collègues chinois la qualité des eaux du Yangzi Jiang. Beat Müller et Michael Berg de l'Eawag étaient du voyage. Des centaines d'échantillons d'eau et de sédiments ont été prélevés et les résultats sont étonnants: bien que les charges polluantes recueillies par le fleuve soient parfois énormes, les concentrations de restent majoritairement dans un domaine tout à fait comparable aux autres grands fleuves étudiés. Dans le cadre de la même expédition, les scientifiques ont

également cherché à repérer les derniers dauphins blancs du Yangzi. Malheureusement sans succès. Il faut probablement compter le dauphin d'eau douce connu sous le nom de Baiji au nombre des espèces disparues. www.eawag.ch/jangtse

Nouveau cours de formation continue

«Integrated Water Resource Management»

L'un des objectifs prioritaires de développement du millénaire définis par l'ONU est de réduire de moitié la part des personnes n'ayant pas accès à l'eau potable d'ici 2015. Pour atteindre cet objectif, il est besoin de par le monde de spécialistes mettant en œuvre des approches globales et intégratives pour résoudre les problèmes liés à l'eau et réduire la pauvreté. Pour répondre à ce besoin, la Haute école

spécialisée bernoise Architecture, bois et génie civil propose depuis 2007 une filière de formation continue dans le domaine de l'«Integrated Water Ressource Management» dont l'enseignement est assuré en collaboration avec d'autres hautes écoles, institutions fédérales et ONG ainsi qu'avec l'Eawag.

Informations: www.ahb.bfh.ch/ahb/en/Weiterbildung/ndk

Agenda

Journée d'information de l'Eawag
12 Septembre 2008, Eawag Dübendorf
Vom Gewässer ins Glas – gutes Trinkwasser für heute und morgen

Cours Peak à l'Eawag Dübendorf
7 Octobre 2008
Der Einsatz von umweltspsychologischen Massnahmen für Verhaltensänderungen im Umweltbereich

29/30 Octobre 2008
Wo ist Heizen und Kühlen mit Abwasser möglich und sinnvoll?

11/12 Novembre 2008
Ökotoxikologie-Kurs coetox Basis-Modul

5/6 Février 2009
Evolutionsökologie im Gewässerschutz

Voir: www.eawag.ch/veranstaltungen