

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral
Département Polluants Chimiques

Blandine MELIS
Gilles BOCQUENÉ

juillet 1999 - RST.DEL / 99.06 / Nantes



Ifremer

Ifremer
Laboratoire LER /LR - Documentation
B.P. 171 - Avenue Jean Monnet
34203 Sète cedex
Tél: 04 99 57 32 00 - Fax: 04 99 57 32 96

Effets endocriniens des contaminants en milieu marin

Numéro d'identification du rapport : DEL/PC/RST/99/06/Nantes Diffusion : libre <input checked="" type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> interdite <input type="checkbox"/> Validé par : Secrétaire Comité de lecture des RST Version du document : définitive		date de publication juillet 1999 nombre de pages : 45 bibliographie : Oui illustration(s) : Oui langue du rapport français
Titre et sous-titre du rapport : Effets endocriniens des contaminants en milieu marin Titre traduit :		
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Blandine MELIS Gilles BOCQUENÉ	Organisme / Direction / Service, laboratoire Université de Marseille 2 IFREMER, DEL/PC, Nantes	
Collaborateur(s) : nom, prénom Bernard RAFFIN	Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER, DEL/AO, Nantes	
Travaux universitaires : diplôme : DEA établissement de soutenance : Université de Marseille discipline : Biosciences de l'environnement année de soutenance : 1999		
Titre du contrat de recherche :		n° de contrat IFREMER
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s) Responsable scientifique :		
Cadre de la recherche : Programme : Convention : Projet : Autres (préciser) : Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)		

Résumé :

L'état actuel des connaissances dans le domaine de l'écotoxicologie a mis en évidence la présence de contaminants ayant la capacité de perturber la régulation des hormones endogènes des espèces aquatiques et ainsi de modifier et d'altérer les mécanismes endocriniens et la fonction de reproduction. L'apparition de caractéristiques ovocytaires dans les testicules de poissons, en présence de certains composés exogènes caractérise à terme la contamination estrogénique. Même si les substances chimiques telles que les alkylphénols, les PCB, les phtalates et certains pesticides présentent un potentiel toxique important, il semblerait que les estrogènes naturelles et synthétiques jouent un rôle majeur dans l'induction des perturbations de la fonction de reproduction.

Les altérations peuvent s'observer au niveau physiologique par le dosage de biomarqueurs spécifiques (vitellogénine et protéine zona radiata) grâce aux méthodes immunologiques de détection (radio-immunologie RIA et enzymo-immunologie ELISA). La réversion sexuelle des mâles peut également être révélée par les techniques histologiques d'observation des gonades.

Les travaux réalisés sur trois flets mâles (*Platichthys flesus*) prélevés dans l'estuaire de la Loire en mai 1999 et durant la période de repos biologique n'ont pas permis de déceler de perturbations estrogéniques sur cette zone. Néanmoins, deux méthodes de révélation histologique des perturbations ont été testées et révèlent que le procédé classique d'inclusion des échantillons dans la paraffine permet d'obtenir de bons résultats dans l'observation des tissus. Le deuxième procédé effectué directement à partir de gonades congelées reste à optimiser.

Abstract :

This report presents the state of art of endocrine disruption aspects in ecotoxicology. Some contaminants of the aquatic environment are able to mimic female fish hormones and thereby cause inappropriate feminisation of male fish. This feminisation involves artificial induction and emergence of ovotestis in male (oestrogenic disruption). Natural and synthetic oestrogenic hormones and several contaminants (alkylphenols, PCBs, phtalates and some pesticides) are already known to cause widespread feminisation of male.

Two different types of analysis can be performed to detect oestrogenics effects. Immunochemical analysis of plasma (Enzyme-linked immunosorbent assay ELISA and radioimmuno assay RIA) shows that xenoestrogens induce vitellogenin and protein zona radiata in male fish. These two proteins can be used as biomarkers in the detection of effects. The sexual reversion in male can also be detected by histological observation of testicular tissue.

Together with this bibliographic study, research laboratory work was also conducted. Field studies on three males of the flounder (*Platichthys flesus*) in the Loire estuary sampled after the reproductive period have shown no effects on the histology of testes. Two histological methods were tested and revealed that the classical method of paraffin inclusion led better results in terms of gonadal observation. The method using cryomicrotome from frozen gonads still needs to be optimized.

Mots-clés :

Perturbations endocriniennes, effets estrogéniques, poissons, pollution marine.

Keywords :

Endocrine disruption, oestrogenics effects, fishes, marine pollution.

1.	PRESENTATION ET SITUATION DU SUJET	5
2.	INTRODUCTION	6
3.	ETAT DES CONNAISSANCES.....	8
3.1.	Mécanismes endocriniens naturels chez les poissons	8
3.1.1.	Mécanismes endocriniens naturels chez les femelles	8
3.1.2.	Mécanismes endocriniens naturels chez les mâles	9
3.1.3.	Mécanismes endocriniens naturels chez les immatures	10
3.2.	Effets des perturbateurs xénobiotiques	11
3.2.1.	Effets des perturbateurs chez les femelles	11
3.2.2.	Effets des perturbateurs chez les mâles	13
3.2.3.	Effets des perturbateurs chez les individus immatures	14
3.2.4.	Effets des perturbateurs sur la population	14
3.3.	Outils et méthodes de détection des effets estrogéniques	15
3.3.1.	Histologie des gonades	15
3.3.2.	Méthodes immunologiques	16
3.3.3.	Etudes expérimentales	17
3.4.	Perturbateurs chimiques et naturels	18
3.4.1.	Polychlorobiphényles (PCB).....	18
3.4.2.	Alkylphénols	19
3.4.3.	Pesticides	20
3.4.4.	Phtalates	21
3.4.5.	Métaux et organo-métaux	21
3.4.6.	Hydrocarbures.....	22
3.4.7.	Hormones synthétiques	22
3.4.8.	Estrogènes naturelles.....	22
4.	MATERIELS ET METHODES	24
4.1.	Préparation des échantillons.....	24
4.2.	Méthodes histologiques	25
4.2.1.	Histologie classique.....	25
4.2.2.	Histologie au cryomicrotome	26
4.3.	Méthodes immunologiques	27
5.	RESULTATS	27
5.1.	Méthodes histologiques	27
5.1.1.	Histologie classique.....	27
5.1.2.	Histologie au cryomicrotome	27
5.2.	Histopathologie des gonades.....	28

6.	DISCUSSION	31
6.1.	Méthodes histologiques	31
6.2.	Méthodes immunologiques	34
6.3.	Etudes expérimentales et environnementales	36
6.3.1.	Approche <i>in vitro</i>	36
6.3.2.	Approche <i>in vivo</i>	36
6.3.3.	Approche <i>in situ</i>	37
7.	CONCLUSION.....	38
8.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	40



1. PRESENTATION ET SITUATION DU SUJET

Il est aujourd'hui manifeste que dans l'environnement une grande variété de molécules d'origine anthropique a la capacité de perturber la régulation naturelle du système endocrinien et reproductif de la plupart des espèces animales y compris chez l'homme.

Chez plusieurs espèces de poisson, des perturbations dans les fonctions de reproduction liées à la contamination du milieu ont été décrites qui, associées à d'autres facteurs tels que la pêche ou la disparition progressives des nourriceries, peuvent mettre en péril le maintien des stocks voire la survie de certaines espèces.

Les composés incriminés couvrent une large gamme de contaminants qui va des stéroïdes synthétiques tels que ceux utilisés dans les pilules contraceptives, des pesticides organochlorés (DDT, HCH), des triazines, des PCBs, des détergents tels que les alkylphénols (nonylphénols), des plastifiants (phtalates), des organo-métaux (TBT) et des estrogènes naturels tels que les phytoestrogènes (coumestrol et composés isoflavoniques du blé et du soja) et les mycoestrogènes.

Les mécanismes d'action de ces molécules sont encore en partie méconnus puisque certains de ces composés agissent directement sur les récepteurs endocriniens alors que d'autres interviennent à différents niveaux de la régulation du système hormonal. Cette difficulté se traduit par l'utilisation d'un vocabulaire divers pour décrire ces effets. Ainsi les appellations xéno-estrogènes, perturbateurs endocriniens ou encore "endocrine disruptors", "hormone-like" ou "estrogenic mimics" chez les anglo-saxons, sont citées dans la littérature. Dans bien des cas, les conséquences physiologiques de ces perturbations ont été découvertes de manière accidentelle mais une attention particulière est aujourd'hui portée aux réponses estrogéniques telles que l'induction de la vitellogenine (VTG), de la protéine *zona radiata* (ZRP) et des manifestations ultimes que sont les phénomènes de féminisation avec réduction de la spermatogenèse et l'apparition d'ovocytes dans les gonades mâles (ovotestis).

Cette problématique qui a émergé il y a une dizaine d'années est l'objet d'importants travaux de recherche (i) pour comprendre des processus qui mettent en jeu à la fois l'hypothalamus, l'hypophyse, les gonades et le foie, (ii) pour décrire les effets et développer des outils de diagnostic de ces perturbations. La compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation des fonctions de reproduction, dans la perturbation due aux xénobiotiques, dans le choix des outils analytiques a nécessité un important travail de clarification à la fois bibliographique et technique.

Cette motivation justifie l'édition de ce rapport de DEA sous la forme d'un rapport interne IFREMER destiné avant tout à informer les partenaires de la surveillance du milieu marin d'un phénomène dont l'ampleur peut paraître inquiétante par ses incidences sur l'écosystème et à terme sur la santé humaine.

2. INTRODUCTION

Les océans, réservoir de $1.37 \cdot 10^{21}$ litres, sont le réceptacle ultime, depuis cette seconde partie du XX^{ème} siècle, de la plus grande partie des polluants d'origine anthropique. Marées noires, pollutions accidentelles et chroniques, rejets industriels ou agricoles : l'écosystème marin subit de très nombreuses agressions. La bande côtière accueille, à elle seule, 90% de ces substances toxiques. Plusieurs dizaines de milliers de molécules nouvelles sont synthétisées chaque année par l'homme. Beaucoup d'entre elles sont libérées dans le milieu naturel et se retrouvent *in fine* dans le milieu marin (Laubier, 1990). L'étude des pollutions et de leurs effets sur les écosystèmes côtiers et marins découle d'une prise de conscience récente de la part du grand public et des politiques. Préserver l'équilibre de notre milieu naturel face à la dynamique de notre développement est devenu une réelle nécessité.

Dans les années 1950-1960, l'exploitation parfois excessive des ressources naturelles, la poussée démographique, la modification des pratiques agricoles et surtout l'essor industriel ont été à l'origine de perturbations significatives de l'environnement, notamment de l'environnement aquatique, et en particulier des intoxications aiguës dues au mercure (Minamata), au cadmium (maladie Itai Itai) ont touché certaines populations au Japon. C'est à cette époque qu'ont débuté les travaux écotoxicologiques ayant pour but la mise au point de tests de biodégradabilité des polluants, de tests de toxicité vis à vis des poissons, de méthodes de détermination d'indices de qualité des rivières.

La dégradation rapide du milieu aquatique a incité les groupes d'études émanant d'instances nationales et internationales, à travers les nombreux programmes initiés par les institutions scientifiques, à mesurer au moyen de la chimie la teneur en polluants présents dans le milieu. Néanmoins, si les travaux des réseaux de surveillance sont indispensables à l'établissement de tendances pour de nombreux contaminants, les mesures de teneurs en polluants ne renseignent pas sur les effets toxiques engendrés sur les espèces aquatiques.

Le développement récent de la biochimie et de la toxicologie moléculaire a permis de progresser rapidement dans la connaissance des mécanismes de toxicité des xénobiotiques. Par la suite, des effets biochimiques sensibles et spécifiques ont été mis en évidence chez des espèces exposées à certains contaminants et présentant un intérêt écotoxicologique : les oiseaux, les poissons et les mollusques.

L'essor de ces nouvelles techniques a eu pour intérêt au début des années 1980, de développer la notion de biomarqueur qui caractérise des changements moléculaires, biochimiques, histologiques ou physiologiques chez des organismes susceptibles d'être utilisés pour estimer soit l'exposition à des contaminants présents dans leur milieu, soit les effets induits par la pollution (Koemann *et al.*, 1993).

Dans les années 1990, les recherches ont mis en évidence de nouveaux effets de la contamination. La qualité du sperme humain décline de façon conséquente en Belgique, au Danemark, en France et en Grande Bretagne. En même temps, des cancers testiculaires sont observés dans cette population (Toppari *et al.*, 1996). Il semblerait que ce type de dégradation se soit développé également chez certaines espèces animales. Dans la classe des poissons, l'exposition à certaines substances dites xéno-endocriniennes, présentes de façon conséquente dans le milieu aquatique, provoquerait l'apparition d'anomalies gonadiques plus ou moins permanentes, de différenciation vers la masculinisation ou la féminisation des individus. Les perturbations dites estrogéniques sont caractérisées par l'apparition de tissus ovocytaires dans les testicules.

Le travail effectué dans ce rapport propose :

1 : de résumer l'ensemble des recherches bibliographiques récentes et de faire le point dans un domaine où les informations et les données restent confuses voire quelques fois contradictoires, il s'agit (i) de révéler les perturbations endocriniennes observées au niveau des organismes aquatiques et plus particulièrement sur les poissons, (ii) de faire le point sur les différentes méthodes capables d'élucider les altérations estrogéniques, de discuter les avantages et les inconvénients de chacune d'entre elles et (iii) de répertorier les composés responsables de ces effets.

2 : des essais de validation *in situ* réalisés à partir de flets mâles (*Platichthys flesus*, Linné, 1758) prélevés dans l'estuaire de la Loire en mai 1999 dans le but de développer et de mettre en place un outil de diagnostic fiable des effets endocriniens et plus particulièrement estrogéniques.



3. ETAT DES CONNAISSANCES

3.1. Mécanismes endocriniens naturels chez les poissons

Pour comprendre comment les xénobiotiques ont la capacité d'affecter le fonctionnement endocrinien d'un organisme, il est nécessaire de connaître les mécanismes endogènes en dehors de toute perturbation.

Les hormones impliquées dans la fonction de reproduction sont de deux types. Il s'agit d'une part des estrogènes dont la plus importante classe naturelle chez les vertébrés est représentée par la 17- β -oestradiol. Elle est synthétisée chez les femelles par les follicules entourant les ovocytes ovariens. Les androgènes ou hormones mâles sont quant à elles sécrétées par les cellules interstitielles de Leydig situées dans les testicules. Chez les poissons, l'hormone mâle la plus représentée est la 11-kétotestostérone.

3.1.1. Mécanismes endocriniens naturels chez les femelles

Une des propriétés des estrogènes est de stimuler la vitellogénèse chez les femelles. En général, les récepteurs androgéniques et estrogéniques localisés dans le foie stimulent la transcription d'une séquence de gènes particulière à l'origine de la synthèse d'une protéine spécifique, la vitellogénine est un constituant essentiel de la croissance des ovocytes, de la formation de l'oeuf et du développement de l'embryon chez les ovipares. Par ce même mécanisme la vitellogénèse est stimulée dans le foie des femelles matures par les estrogènes endogènes (17- β -oestradiol) contenues dans le plasma. La protéine est ensuite transportée par la voie sanguine vers les ovaires et agit directement sur le développement des ovocytes en tant que matière nutritive (fig. 1).



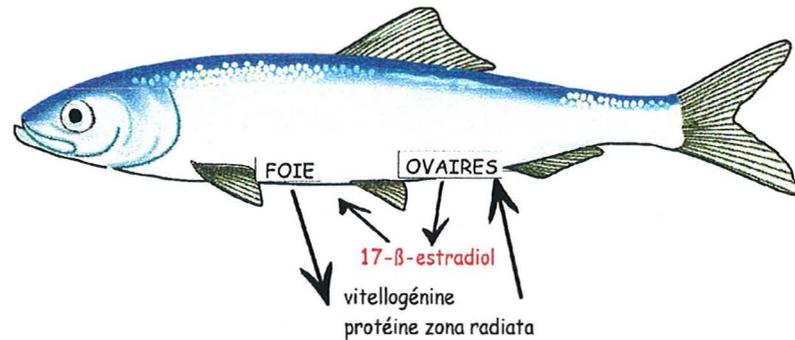


Figure 1 : Stimulation hormonale et mécanisme endocrinien naturel chez les femelles.

Lors de la reproduction chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), la vitellogénine destinée à stimuler les ovocytes chez les femelles matures peut atteindre une concentration de 25 mg. ml⁻¹ dans le plasma. Pendant la phase de repos biologique, la concentration en vitellogénine est nettement moins élevée (1.5 mg. ml⁻¹) et le poids des organes sexuels est considérablement réduit (Tyler *et al.*, 1990a, b).

Les estrogènes naturelles et plus particulièrement la 17- β -oestradiol, ont également la faculté d'induire la synthèse, dans le foie des femelles, d'une autre protéine impliquée dans la fonction de reproduction. La protéine zona radiata permet d'une part, la formation de l'enveloppe vitelline des oeufs et protège d'autre part l'embryon contre les chocs mécaniques. La présence de la protéine *zona radiata* existe également chez les mâles et les individus sexuellement immatures à des concentrations très faibles, à peine détectables dans les conditions naturelles (Arukwe *et al.*, 1997a).

3.1.2. Mécanismes endocriniens naturels chez les mâles

Même si les hormones androgènes contrôlent la fonction de reproduction chez les mâles, il semblerait qu'une faible proportion d'estrogènes endogènes soit nécessaire pour réguler la synthèse de la 11-kétotestostérone et de la testostérone (Jobling *et al.*, 1996). Les hormones typiquement estrogéniques sont donc nécessaires au bon fonctionnement des mécanismes endocriniens chez les mâles. En outre, un processus d'aromatase peut s'observer chez les individus et ce, quelque soit leur sexe. Les aromatasés contenus dans le cerveau ont pour particularité de convertir la testostérone en estradiol (fig. 2).

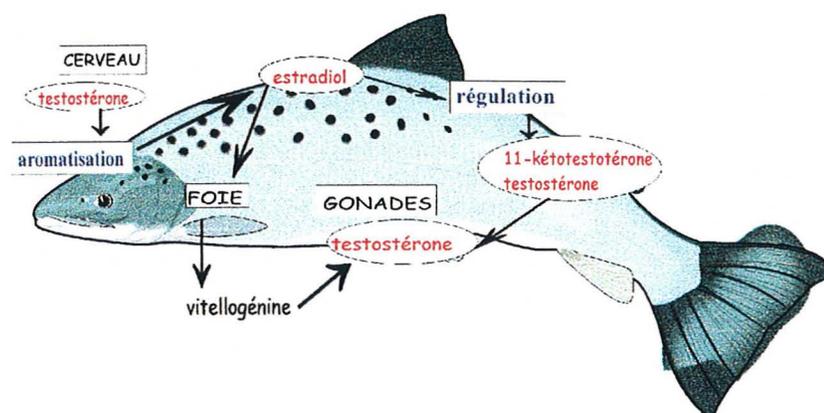


Figure 2 : Mécanismes estrogéniques et androgéniques naturels chez le mâle.

L'hormone féminisante ainsi produite est reconnue par les récepteurs dans le foie. Cette stimulation est responsable d'une légère induction de la vitellogenèse chez les mâles. Il semblerait néanmoins que la concentration d'estrogène présente dans le plasma des mâles soit trop faible pour induire une production de vitellogénine conséquente (Sumpter & Jobling, 1995 ; Harries *et al.*, 1997). Cette induction de vitellogénine masculine est largement inférieure à celle provoquée par une exposition aux xéno-estrogènes (Wingfiel & Grimm, 1977) et à celle synthétisée naturellement par les ovaires des femelles matures.

3.1.3. Mécanismes endocriniens naturels chez les immatures

L'action des estrogènes et des androgènes est également observée au stade larvaire. Ces hormones induisent la gonadogenèse (formation structurale des gonades) et la gamétogenèse (synthèse et différenciation des cellules germinales qui deviendront plus tard des gamètes) (Jobling *et al.*, 1998). L'administration chez le saumon coho (*Oncorhynchus kisutch.*) de 17- β -oestradiol au stade larvaire induit un phénotype féminin. Tandis que l'administration de 17- α -méthyltestostérone permet d'obtenir 100% d'individus mâles (Piferrer & Donaldson, 1989).

Chez les mammifères et les oiseaux, la détermination sexuelle est sous le contrôle de gènes localisés sur les chromosomes sexuels. Chez les vertébrés inférieurs et notamment chez les poissons, la différenciation sexuelle est plus flexible et semble être régulée en partie par les facteurs environnementaux (température, photopériode, etc) en concomitance avec l'activité hormonale. Chez le poisson chat africain (*Clarias lazera*) la détermination sexuelle se réalise en faveur des mâles quand la température

du milieu est maintenue entre 30°C et 39°C (Van den Hurk & Lambert, 1982).

La fonction essentielle des hormones sexuelles est de permettre la détermination et la différenciation sexuelle au stade larvaire, de réguler le cycle reproductif des individus matures mais également de favoriser la croissance et le développement des oeufs.

3.2. Effets des perturbateurs xénobiotiques

Certains polluants se comportent dans le milieu comme des perturbateurs endocriniens. Ils induisent notamment des caractéristiques physiologiques et morphologiques particulières chez les individus exposés et altèrent fortement la fonction de reproduction. Après avoir considéré dans le paragraphe précédent l'action naturelle des hormones impliquées dans la fonction de reproduction, il est nécessaire de prendre en considération les perturbations induites par les xéno-endocriniens dans ce domaine.

Certains xéno-endocriniens sont capables de reconnaître et de se lier aux récepteurs estrogéniques peu spécifiques. Les contaminants dont la structure chimique est parfois similaire aux hormones naturelles rentrent en compétition avec les estrogènes endogènes. Les récepteurs engendrent alors une réponse semblable à celle obtenue avec les composés naturels. Néanmoins, une étude récente menée sur le flet a révélé qu'en présence de polluants une augmentation de la vitellogénine pouvait être provoquée par une élévation du taux de 17- β -estradiol directement dans le plasma. Les composés dits xéno-estrogéniques ne seraient donc pas systématiquement considérés comme imitateurs des estrogènes endogènes (Janssen *et al.*, 1997).

Il semblerait que certaines substances soient responsables d'effets anti-estrogéniques. Dans ce cas, les produits se fixent aux récepteurs estrogéniques et provoquent une modification de la conformation du site. Les récepteurs ne sont alors plus capables de stimuler la transcription des gènes normalement activés dans des conditions saines. Ceci peut induire une dégradation du foie à l'origine d'une réduction de la production de vitellogénine. On observe également une inhibition et un retard dans le développement des ovaires (Johnson *et al.*, 1988 ; Pereira *et al.*, 1992).

3.2.1. Effets des perturbateurs chez les femelles

La plupart des femelles exposées aux xéno-endocriniens présentent une synthèse prématurée de vitellogénine. L'augmentation précoce de la

maturité sexuelle caractérisée par l'induction de vitellogénine semble associée à la présence de polluants dans le milieu (Johnson *et al.*, 1998a). Une étude menée sur des flets soumis à des concentrations élevées de polluants dans la rivière Mersey (Grande Bretagne, région de Liverpool) montre que l'induction vitellogénique chez les mâles et les individus immatures est légèrement plus importante que celle obtenue chez les femelles matures. La vitellogenèse induite selon l'état de maturité sexuelle dans des conditions normales est maximale pour les femelles en période de reproduction. Dans ce cas, l'exposition aux xéno-endocriniens n'a plus d'effet sur l'induction vitellogénique qui semble alors saturée (Allen *et al.*, 1998).

Les recherches menées sur les femelles de truite arc-en-ciel mettent en évidence l'existence d'une régulation rétroactive de type "feed-back" sur le système hormonal. En effet, l'induction soutenue de la vitellogenèse provoque une réduction du taux d'hormone estrogène dans le plasma à l'origine d'une régression de la qualité des oeufs (Reis-Henriques *et al.*, 1997).

L'induction de la vitellogenèse lors de l'exposition aux xéno-endocriniens peut également s'accompagner de la synthèse de protéine zona radiata à des concentrations supérieures à celles rencontrées dans des conditions normales. Cette production excédentaire de protéine est responsable de l'altération de la coquille et peut avoir des incidences inquiétantes sur la survie des espèces car elle met en péril la viabilité des oeufs (Arukwe *et al.*, 1997a).

D'autres mécanismes impliqués dans la fonction de reproduction peuvent être altérés lors de l'exposition aux xéno-endocriniens. Des études révèlent l'existence d'avortement prématuré (Allen *et al.*, 1999), la réduction du nombre et de la survie des oeufs (Kime, 1995).

Certaines expositions aux contaminants engendrent une modification du sexe des femelles avec l'apparition de caractéristiques masculinisantes (phénomène d'imposex). Le tributylétain (TBT) induit une élévation du taux de testostérone, le développement d'un pénis, d'un canal déférent ainsi que l'apparition d'une prostate chez les femelles de buccin (*Buccinum undatum*) traitées, l'ovogenèse est supplantée par la spermatogenèse avec production de sperme (Gibbs *et al.*, 1988 ; Ten Hallers-Tjabbes *et al.*, 1994). Le TBT inhibe la conjugaison de la testostérone et semble induire l'accumulation des hormones androgènes dans le plasma. Ce "stockage" d'hormones mâles est responsable de l'apparition des caractères masculinisants dans les tissus ovariens (Tyler *et*

al., 1998). Le TBT provoque à long terme la stérilité des femelles et l'extinction des espèces sensibles (Minchin *et al.*, 1995). Néanmoins, la masculinisation citée ci dessus s'applique plus particulièrement aux mollusques et aux crustacés. Chez les poissons, le TBT est décelé à de faibles concentrations dans le foie et le muscle du rouget de vase (*Mullus barbatus*. Linné, 1758), mais il ne semble pas provoquer l'apparition d'altérations dans les ovaires des femelles exposées (Morcillo *et al.*, 1997).

3.2.2. Effets des perturbateurs chez les mâles

Les composés xéno-endocriniens sont capables d'initier les processus de la synthèse vitellogénique et de la protéine zona radiata dans le foie des mâles. Alors que chez les femelles, les ovocytes sont stimulés pour absorber la vitellogénine en vue de nourrir l'embryon (Allen *et al.*, 1999), chez les mâles la protéine n'est pas stockée et circule librement dans le plasma. La vitellogénine est ensuite dégradée lentement car le mécanisme d'excrétion chez les mâles n'est pas habilité à métaboliser rapidement ce type de composé (Matthiessen *et al.*, 1998).

La synthèse de vitellogénine peut s'accompagner d'anomalies testiculaires avec apparition de caractéristiques féminisantes. Selon Jobling *et al.* (1998), les altérations histologiques des gonades mâles sont répertoriées selon une échelle d'indice "intersexe" échelonnée de 0 à 7. Au stade 0, les gonades sont typiquement masculines. Entre les stades 4 et 7 les gonades présentent une intersexualité plus marquée, caractérisée par l'absence de conduit spermatique et la présence bien visible d'une cavité ovarienne. L'examen des tissus révèle l'élongation du lobe testiculaire et l'apparition d'ovocytes. En règle générale, le stade d'ovocyte primaire est rarement dépassé (Jobling *et al.*, 1998). Toutefois, lorsque le stade secondaire est atteint l'ovocyte contient déjà des gouttes de jaune (yolk) visibles. Dans la plupart des cas, les structures ovocytaires chez les mâles ont une taille et une apparence similaire à celles observées chez les femelles matures.

Chez le flet la présence d'ovotestis nécessite une concentration moyenne dans le plasma de plus de 100 µg VTG. ml⁻¹. Mais, la vitellogénine n'est pas absorbée par les gonades et ne peut donc être responsable directement de la formation des ovocytes (Matthiessen *et al.*, 1998).

En règle générale, lors de l'exposition aux xéno-endocriniens, la féminisation chez les mâles est précédée d'une action démasculinisante. La croissance testiculaire, la qualité et la quantité de sperme sont réduites (Sumpter, 1995). Il est probable que ce mécanisme d'altération testiculaire

se produise directement sur les testicules par inhibition des récepteurs androgéniques et donc de la spermatogenèse. Dans la plupart des cas, l'induction de vitellogénine s'accompagne d'une réduction du taux de testostérone (Folmar *et al.*, 1996) et de gonadotrophine. Il est reconnu que ces deux hormones jouent un rôle important dans la formation des gamètes mâles (Jobling *et al.*, 1996). Dans le cas d'une dégradation des caractères masculins, les composés xéno-endocriniens sont considérés comme anti-androgéniques, les changements physiologiques qu'ils engendrent s'apparentent à ceux observés lors de l'exposition à de véritables "estrogens-like" avec induction de caractéristiques féminisantes suite à la démasculinisation des individus (Sohoni & Sumpter, 1998).

3.2.3. Effets des perturbateurs chez les individus immatures

Une exposition brève aux contaminants endocriniens peut également perturber la différenciation sexuelle des individus au stade juvénile et produire ainsi une proportion conséquente d'individus hermaphrodites (Sumpter, 1995 ; Gimeno *et al.*, 1996). Les individus monosexes mâles immatures chez la carpe (*Cyprinus carpio*, Linné, 1758) exposés au TPP (alkylphénol reconnu comme étant estrogénique) présentent une réduction conséquente de la spermatogenèse et du nombre de cellules germinales. La synthèse prématurée de vitellogénine et la formation d'un oviducte sont observées. Ce phénomène de réversion sexuelle est permanent et irréversible lorsque la contamination a lieu au stade juvénile.

La contamination des larves peut également se transmettre par la mère. Certaines substances sont accumulées dans les tissus adipeux sous forme inactives. Lors de l'incubation, ces réserves de graisses sont mobilisées pour la nutrition de l'embryon. Les composés libérés deviennent toxiques et agissent directement sur l'embryon (Hansen *et al.*, 1985 ; Colborn *et al.*, 1993).

3.2.4. Effets des perturbateurs sur la population

Quel que soit le sexe de l'individu et son stade de maturité, l'exposition prolongée aux xéno-estrogènes provoque une induction importante de vitellogénine dans le plasma. Cette production anormale peut être 10^6 à 10^7 fois plus élevée que dans des conditions normales.

Le foie constitue non seulement le site privilégié de synthèse protéique (vitellogénine et protéine zona radiata), mais de part son activité détoxifiante il convertit également les xénobiotiques en métabolites

assimilables. Cette biotransformation est assurée par les activités des cytochromes P 450 et par le système enzymatique des transférases. Certains composés chimiques sont capables d'altérer l'activité du système détoxifiant provoquant ainsi un déséquilibre de la régulation endocrinienne. La perturbation du système de métabolisation est en général, en relation avec l'activité anti-estrogénique des contaminants (Gillesby & Zacharewski, 1998). Jusqu'à présent, les informations qui visent à élucider les mécanismes d'action des xéno-estrogènes sur le système de détoxification sont rares.

L'exposition soutenue aux xéno-estrogènes peut aboutir à des nécroses du foie et du rein. Dans certains cas, la contamination peut être létale. La synthèse continue de vitellogénine perturbe la disponibilité des ressources énergétiques (lipides, protéines) et induit la perte de calcium dans les os et les écailles provoquant ainsi une sensibilité accrue aux maladies (Arukwe *et al.*, 1998). De plus, l'allocation d'énergie indispensable pour induire la production massive de vitellogénine et de protéine zona radiata perturbe l'équilibre physiologique des individus en réduisant l'énergie disponible pour la croissance. Le dysfonctionnement de cet état d'équilibre affecte l'état de santé des individus matures et peut conduire à long terme à une baisse du recrutement chez certaines espèces (Arukwe & Goksøyr, 1998).

L'exposition aux xéno-endocriniens engendre non seulement des perturbations dans la fonction de reproduction mais elle met également en péril la survie des individus et de l'espèce.

3.3. Outils et méthodes de détection des effets estrogéniques

Dans la perspective d'identifier les perturbations endocriniennes et plus particulièrement estrogéniques, un certain nombre de méthodes capables de déceler les altérations ont été développées.

3.3.1. Histologie des gonades

Les individus mâles soumis à une contamination xéno-estrogénique peuvent présenter des altérations et modifications morphologiques des gonades avec apparition de caractéristiques féminisantes. Les protocoles expérimentaux capables de caractériser ces effets sont décrits en détail dans le chapitre suivant (§ 4.2.).

3.3.2. Méthodes immunologiques

Chez les individus soumis aux xéno-estrogènes, on observe en général une élévation anormale de vitellogénine et de protéine zona radiata dans le plasma. Ces deux protéines sont utilisées en tant que biomarqueurs d'effets et permettent de détecter les réponses précoces indicatrices de dommages induits par les xénobiotiques. Quelque soit la méthode immunologique utilisée, il est indispensable de disposer, par espèce, d'anticorps spécifiques. Après injection de la protéine purifiée à un organisme-hôte (le lapin), l'immunosérum obtenu permet de doser la protéine dans le plasma par des techniques quantitatives.

3.3.2.1. Dosage radio-immunologique (RIA)

Une des méthodes couramment utilisée est le dosage radio-immunologique (RIA) mis en application dans les années cinquante par Rosalyn Yalow. Le procédé est basé sur le principe de compétition en milieu liquide entre un antigène "froid" non radioactif (Ag_0) qui correspond à la protéine à doser et le même antigène marqué (Ag^*). Cette compétition s'effectue sur des sites de liaison aux anticorps correspondants (Ac). La quantité d' Ag^* et d'Ac est connue et constante. Tandis que la quantité d' Ag_0 froid est inconnue et représente l'échantillon à doser.

L'ensemble des antigènes (Ag_0 et Ag^*) est mis en présence des Ac spécifiques, la compétition entre les différents types d'antigènes a lieu. Après élimination de l'ensemble des antigènes (Ag_0 et Ag^*) libres et non fixés, la précipitation du complexe antigène-anticorps permet de quantifier la protéine recherchée. Plus la quantité d' Ag_0 est importante, moins les anticorps se lient aux Ag^* . La radioactivité mesurée en fin d'expérience est d'autant plus faible que la teneur en protéine recherchée dans l'échantillon est grande.

3.3.2.2. Dosage immunoenzymatique (ELISA)

La technique RIA n'est pas l'unique méthode mise en oeuvre pour déterminer quantitativement les marqueurs protéiques. La méthode ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) est basée sur le même principe que la méthode RIA, toutefois l'ELISA ne demande pas l'utilisation de composés radioactifs.

Dans un premier temps, la technique nécessite la mise en contact d'un anticorps primaire avec le plasma dans lequel se trouve la protéine à doser, considérée comme antigène. Après incubation, le complexe ainsi

formé est placé sur une plaque de microtitration où la protéine purifiée a été préalablement greffée.

L'étape suivante consiste à fixer un anticorps secondaire spécifique du complexe antigénique déjà formé. Les plaques sont rincées à la suite de chaque manipulation au tampon PBS-t-NPS (solution saline neutre de lavage) afin d'éliminer tous les composants non fixés. Un complexe enzymatique contenant la peroxydase est ajouté et se fixe aux anticorps secondaires. C'est l'addition d'OPD (ortho-Phenylene diamine) en tant que substrat qui permet l'activation du complexe enzymatique. L'enzyme permet la révélation du complexe anticorps-antigène par une réaction colorée en spectrophotométrie. La détermination quantitative de protéine zona radiata récemment reconnue comme étant un biomarqueur des perturbations estrogéniques, est évaluée uniquement au moyen de la méthode ELISA (Arukwe *et al.*, 1998).

3.3.3. Etudes expérimentales

Différents protocoles réalisés en laboratoire permettent d'étudier et de révéler les perturbations endocriniennes sur les organismes aquatiques.

3.3.3.1. Approche *in vitro*

Le complexe hépatocytaire représente le lieu privilégié de la synthèse de la vitellogénine et de la protéine zona radiata. Sur le plan expérimental, les travaux effectués sur la cellule isolée révèlent le mode d'action précis d'un xéno-estrogène sur les processus d'induction protéique. La mise en culture des hépatocytes menée sur la truite arc-en-ciel vise à reconstituer en dehors de l'animal la structure hépatique. Les composés que l'on désire tester sont mis en présence du complexe tissulaire. L'induction de vitellogénine peut ensuite être quantifiée grâce aux techniques de dosage immunologiques.

3.3.3.2. Approche *in vivo*

Les poissons conservés en bassin sont soumis à un ou plusieurs contaminants *via* la nutrition, l'injection ou directement par la contamination de l'eau du bassin. Le temps d'exposition, la nature et la concentration des produits testés sont parfaitement contrôlés. Le sang des individus est prélevé au niveau de la veine caudale. Après centrifugation (10 mn, 1200 rpm), le plasma qui constitue le surnageant est récupéré et congelé à - 20° C. La synthèse protéique révélatrice d'une contamination

estrogénique peut ensuite être décelée et dosée par les techniques immunologiques.

3.4. Perturbateurs chimiques et naturels

Le nombre des contaminants susceptibles de posséder des effets endocriniens est considérable. Les mécanismes physiologiques et les effets morphologiques qu'ils engendrent sont spécifiques pour chacun d'entre eux et dépendent des espèces exposées. La liste de ces substances n'est pas exhaustive, seuls les composés les plus couramment rencontrés dans le milieu marin et les plus actifs sur le plan endocrinien sont développés.

3.4.1. Polychlorobiphényles (PCB)

Ces composés organiques chlorés proviennent en partie de l'industrie électrique et chimique et sont utilisés depuis 1929. Sur 209 composés répertoriés plus de 25 sont régulièrement retrouvés dans l'environnement et la matière vivante. La majeure partie des PCB joue un rôle dans le dysfonctionnement du métabolisme endocrinien en agissant directement sur les récepteurs androgéniques (Tyler *et al.*, 1998), en réduisant considérablement le taux d'hormones sexuelles présent dans le plasma (Yano & Matsuyama, 1986).

Certains PCB ortho-substitués ont montré qu'ils possèdent un potentiel estrogénique très élevé. L'induction des caractères féminisants par ces composés dépend d'une part de la dose absorbée par les organismes et d'autre part du pourcentage de chlore présent dans le produit. Une faible proportion en chlore induit une activité estrogénique plus marquée (Toppari *et al.*, 1996).

Les dioxines font également partie de la classe des PCB. Elles proviennent le plus souvent d'usine d'hydrocarbures chlorés, de la fabrication du papier, des incinérations et des fonderies d'acier. Les PCDD (Polychlorinated dibenzo-p-dioxines) et les TCDD (2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin) sont sans doute les dioxines les plus toxiques et les plus représentées dans l'environnement. Les TCDD sont capables d'inhiber les récepteurs androgéniques et de perturber le système de détoxification des cytochromes P 451A (Arukwe & Goksøyr, 1998). Les dioxines ne semblent pas avoir une activité estrogénique puissante mais sont plutôt considérées comme agents de démasculinisation (Tyler *et al.*, 1998).

Les composés polychlorobiphényles sont pour la plupart hydrophobes et lipophiles, à l'origine d'une bioaccumulation importante. La concentration

de PCB dans le milieu aquatique est rarement supérieure à 10 ng.l⁻¹. Toutefois, plusieurs µg PCB.kg⁻¹ ont été retrouvés sous forme bioaccumulés dans les oeufs de différents poissons.

3.4.2. Alkylphénols

Ces contaminants sont particulièrement utilisés dans la formulation des tensio-actifs, des détergents, des peintures, des pesticides et dans la production de plastique. Ils sont extrêmement présents dans les rejets domestiques et plus de 60 % d'entre eux se retrouvent dans l'environnement aquatique (Lye *et al.*, 1997). Les plus couramment étudiés et recensés sont les octylphénols (OP) et les nonylphénols (NP). Ces produits ont la faculté d'imiter les estrogènes en agissant directement sur les récepteurs estrogéniques.

L'étude menée sur la truite arc-en-ciel exposée au 4-octylphénol a révélé que ce produit possédait une activité similaire à celle de la 17-β-estradiol (White *et al.*, 1994), il représente le composé chimique le plus puissant en terme d'induction estrogénique.

Les nonylphénols, ont été retrouvés à des concentrations atteignant 0.1 µg.l⁻¹ dans plus de 70 % des rivières européennes. Toutefois, certains effluents industriels de Grande Bretagne contiennent plus de 100 µg NP.l⁻¹ (Blackburn & Waldock, 1995). La synthèse de vitellogénine et de protéine zona radiata s'accompagne également chez les truites mâles d'une inhibition des récepteurs androgéniques et d'une réduction de la croissance testiculaire (Jobling *et al.*, 1996). Les nonylphénols révèlent une double compétence dans les perturbations endocriniennes. Ils sont non seulement typiquement estrogéniques mais également responsables d'une activité anti-androgénique. Dans les deux cas, la féminisation des mâles est observée et la différenciation des deux mécanismes est difficile à mettre en évidence.

Une étude menée sur ces composés révèle que le 4-nonylphénol est à l'origine d'une variation des isoformes du cytochrome P450 et des enzymes capables de métaboliser les xénobiotiques dans le foie chez le saumon d'Atlantique (*Salmo salar*. Linné, 1758) avec pour conséquence de provoquer une désorganisation de la synthèse hormonale.

Récemment un autre composé de cette classe, le p-tert pentylphénol (TPP) a mis en évidence l'apparition d'un oviducte chez les mâles, à des concentrations comprises entre 0,32 mg TPP.l⁻¹ et 1 mg TPP.l⁻¹. La présence d'ovocytes testiculaires est également observée pour des

concentrations en produits plus élevées (>1 mg TPP. l⁻¹) (Gimeno *et al.*, 1996).

Les perturbations induites par les alkylphénols dans l'activité détoxifiante du foie et les modifications morphologiques des gonades ont des répercussions directes sur la fonction de reproduction des poissons et font l'objet d'études approfondies (Arukwe *et al.*, 1997b). La plupart des alkylphénols sont très résistants à la biodégradation dans le milieu et facilement bioaccumulables, ce qui accentue leur toxicité sur les espèces aquatiques.

3.4.3. Pesticides

Ce groupe de polluants se retrouve en grande quantité dans l'environnement et comporte un grand nombre de molécules d'origines diverses. Le DDT a été largement utilisé dans les pays industrialisés jusque 1960, date de son interdiction. Néanmoins, il est toujours présent dans l'environnement en raison de sa rémanence, le DDT possède un temps de demi-vie de plus de 60 ans. La situation est encore plus inquiétante dans les pays en voie de développement où ce type de molécule est encore couramment utilisé.

Le DDT commercial contient plusieurs métabolites dont les plus importants sont le *p,p'*-DDT et le *o,p'*-DDT considérés comme faiblement estrogéniques. Le *o,p'*-DDT induit la synthèse de vitellogénine chez le mosquito fish (*Gambusia affinis*. Poey, 1854) et chez la truite arc-en-ciel juvénile, (Donohoe & Curtis, 1996 ; Tyler *et al.*, 1998).

De récentes recherches sur le *p,p'*-DDE, le principal métabolite du DDT, révèlent qu'il possède une action anti-androgénique (Kelce *et al.*, 1995).

Les études réalisées sur la toxicité du dieldrine et de l'aldrine sont rares, néanmoins, il a été rapporté que ces deux composés sont responsables d'effets typiquement estrogéniques.

Les herbicides de la famille des triazines sont responsables d'une action anti-estrogénique. Leur bioaccumulation au niveau du foie, des reins et des intestins est importante (Gluth *et al.*, 1985).

Les hexachlorocyclohexanes (HCH) comprennent plusieurs formes isomériques dont la plus persistante et la plus bioaccumulable est le β -HCH qui induit chez le mâle medaka (*Oryzias latipes*. Temminck Schlegel, 1846) l'apparition d'ovocytes testiculaires après 4 mois d'exposition (Wester, 1991).



3.4.4. Phtalates

Les phtalates sont principalement utilisés dans la synthèse du PVC. La production mondiale augmente de façon drastique depuis plusieurs décennies et ne cesse de s'accroître (Giam *et al.*, 1978). Les phtalates les plus abondants dans l'environnement marin sont le di-2-éthyl-hexyl (DEHP) et le di-n-butyl-phtalate (DBP), ils sont faiblement estrogéniques, et leur potentiel toxique se manifeste pour des concentrations 10^6 à 10^7 plus élevées que celles de la 17- β -estradiol (Harries *et al.*, 1997). Les phtalates ont la faculté de désorganiser l'activité détoxifiante du foie et de perturber ainsi la synthèse des hormones endogènes (Perlier, com.pers.).

Les investigations sur ces composés sont encore rares et malgré les effets faiblement estrogéniques dont ils semblent être responsables (Jobling *et al.*, 1995), il est difficile d'affirmer que leur présence joue un rôle négligeable dans les perturbations biologiques du milieu.

3.4.5. Métaux et organo-métaux

Le tributylétain (TBT) est un biocide couramment utilisé dans les peintures anti fouling sur la coque des navires. Les études menées sur le murex (*Nucella lapillus*, Linné) révèlent le phénomène d'imposex chez les femelles traitées.

Le tributylétain est accumulable et se retrouve majoritairement dans le sédiment où il est adsorbé sur les particules organiques. Son potentiel toxique est donc particulièrement fort sur le recrutement des espèces benthiques et plus particulièrement des stades larvaire et juvénile. En effet, l'exposition des individus immatures à 1 ng TBT.l⁻¹ induit le phénomène d'imposex, alors que les adultes réagissent au delà de 5 ng TBT.l⁻¹ (Tyler *et al.*, 1998). Aux USA, l'EPA (Environmental Protection Agency) considère que la concentration maximale du TBT dans l'environnement aquatique ne doit pas excéder 20 ng.l⁻¹. Depuis l'interdiction du TBT en 1987 sur les bateaux de moins de 25 mètres, une décroissance significative des fréquences d'imposex est observée sur le murex (Minchin *et al.*, 1995). Néanmoins, dans certains ports et sur les routes fréquemment empruntées par les navires, cette valeur seuil est largement dépassée atteignant parfois plus de 30 ng TBT.l⁻¹ (Tyler *et al.*, 1998). L'interdiction de 1987 devrait bientôt s'étendre à l'ensemble des navires.

Le cadmium est reconnu comme anti-estrogénique. Il inhibe les récepteurs provoquant un blocage de la synthèse de vitellogénine (Benneteau, com.

pers ; Haux *et al.*, 1988 ; Pereira *et al.*, 1993). L'arsenic dégrade les testicules et les ovaires (Shukla & Pandey, 1984a et b). Peu de données traitant des effets estrogéniques des métaux lourds sur les organismes aquatiques sont disponibles à ce jour.

3.4.6. Hydrocarbures

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques et halogénés perturbent directement les cytochromes P 450 et sont responsables de la réduction du taux d'estrogènes endogènes dans le plasma (Arukwe & Goksøyr, 1998). Dans la plupart des cas, les hydrocarbures sont typiquement anti-estrogéniques, ils inhibent le développement ovarien et provoquent une réduction du taux d'estradiol. Par voie de conséquence, ils induisent une baisse du taux de vitellogénine dans le plasma (Johnson *et al.*, 1998a).

3.4.7. Hormones synthétiques

Les préparations pharmaceutiques à base d'hormones synthétiques sont reconnues pour engendrer des effets estrogéniques puissants dans l'environnement. Ces substances ont la capacité d'imiter les estrogènes naturelles à de très faibles concentrations.

La 17- α -éthynyl estradiol (EE₂) utilisée pour l'élaboration des pilules contraceptives intègre rapidement l'environnement aquatique par l'intermédiaire des rejets urbains et domestiques. L'EE₂ est stable dans l'environnement et sa dégradation en métabolites inactifs par la boucle microbienne est longue. Trois semaines de traitement à 10 ng EE₂.l⁻¹ provoque une synthèse rapide et maximale de la vitellogénine dans le plasma de la truite arc-en-ciel (Allen *et al.*, 1998). Une simple exposition à 2 ng EE₂.l⁻¹ peut retarder de 50% le développement testiculaire chez la même espèce (Jobling *et al.*, 1996). L'apparition d'ovocytes testiculaires est fréquente en présence de ce composé.

La concentration en EE₂ dans l'environnement aquatique est variable, une étude effectuée en Grande Bretagne sur plusieurs rivières révèle que les concentrations sont comprises entre 0,2 et 7 ng EE₂.l⁻¹. Leur présence dans l'environnement aquatique est véritablement préoccupante.

3.4.8. Estrogènes naturelles

Les phytoestrogènes et les mycoestrogènes sont des composés naturels que l'on retrouve dans de nombreux végétaux. Certains d'entre eux sont

destinés à l'alimentation humaine et d'élevage. Il s'agit entre autres, du blé, du chou, des épinards et du soja. Ces estrogènes sont réparties en plusieurs familles chimiques dont les plus importantes sont: les isoflavones (génistéine, équol, daidzéine, biochanine A), les coumestanes (coumestrol) et les lignanes (entérolactone). Chacun d'entre eux induisent la vitellogenèse chez les esturgeons immatures (*Acipenser baeri*. Brandt, 1869). Le coumestrol est le plus puissant des phytoestrogènes, provoquant une induction de la vitellogénine à de très faibles doses chez l'esturgeon et la truite arc-en-ciel (Pelissero *et al.*, 1991b).

Le soja (isoflavonic) est une source importante de protéines, il est souvent utilisé sous forme de farine pour alimenter les animaux d'élevage. Les esturgeons (*Acipenser baeri*) nourris à la farine de soja présentent un taux de vitellogénine dans le plasma 280 fois supérieur par rapport au taux observé sur la population contrôle nourrie à la farine de caséine. Les concentrations sont respectivement de 1,24 mg VTG. ml⁻¹ et de 0,0045 mg VTG. ml⁻¹ (Pelissero *et al.*, 1991a).

Certaines de ces substances phytoestrogéniques sont responsables d'effets masculinisants, il semblerait que le β -sisterol soit capable d'agir comme une hormone androgène (Le Blanc & Bain, 1997). A l'inverse de la plupart des produits chimiques, les estrogènes d'origine végétale ne sont pas bioaccumulables, elles sont rapidement métabolisées et excrétées par les organismes qui les absorbent.

Les estrogènes naturelles d'origine animale rejetées dans l'environnement aquatique à partir de rejets d'élevage ou de stations d'épuration sont également responsables d'effets estrogéniques. Les femmes synthétisent la plus importante quantité d'estrogènes naturelles, elles excrètent entre 10 μ g et 100 μ g d'estradiol par jour. Les femmes enceintes peuvent produire jusqu'à 30 mg d'estradiol par jour. L'activité estrogénique de ces composés est amorcée à de très faibles concentrations. L'exposition de salmonidés mâles à l'estradiol induit des effets délétères sur la spermatogenèse, dégrade les testicules et induit l'apparition d'ovocytes. Les concentrations de 17- β -estradiol et d'estradiol dans les rivières de Grande Bretagne sont comprises entre 1 ng de 17- β -estradiol. l⁻¹ et jusqu'à 30 ng d'estradiol. l⁻¹. Or, le seuil de réactivité capable d'induire la vitellogenèse chez la truite arc-en-ciel est de 25 ng de 17- β -estradiol. l⁻¹.

Les études menées en Grande Bretagne sur les rivières et les estuaires avant 1998, ont identifié les dérivés alkylphénoliques comme étant les principaux agents responsables des effets estrogéniques. Une étude

suédoise a décelé jusqu'à 840 ng de 4 nonylphénol. l⁻¹ dans l'environnement aquatique (Larsson *et al.*, 1999).

Depuis 1998, les recherches se sont multipliées. Elles ont révélé le potentiel estrogénique des substances naturelles, à moindre degré le rôle joué par les hormones synthétiques et notamment par les produits dérivants des préparations contraceptives. Bien que les concentrations de ces composés soient comprises respectivement entre 1 et 7 ng.l⁻¹ dans le milieu, leur potentiel d'action estrogénique dans l'environnement aquatique est véritablement inquiétant et doit faire l'objet d'études approfondies.

4. MATERIELS ET METHODES

Les travaux récents en toxicologie environnementale ont mis en évidence les perturbations engendrées par certains polluants sur la fonction de reproduction, notamment chez le flet. Afin de déterminer le degré d'altération lié à cette contamination, il est nécessaire d'évaluer ces dysfonctionnements au moyen d'outils de détection. Dans le chapitre suivant, les techniques décrites sont spécifiques à la révélation des effets estrogéniques, plus particulièrement chez les mâles.

4.1. Préparation des échantillons

Vingt et un flets ont été pêchés au chalut dans l'estuaire de la Loire entre Paimboeuf et Saint Brevin (Loire Atlantique) en mai 1999, la profondeur du site n'excédant pas 20 m. Sur la totalité de l'échantillon, seulement 3 mâles ont été capturés représentant ainsi 14,3 % de l'échantillon étudié. Les 3 individus mâles retenus sont répertoriés sous les lettres A, B et C et mesurent en moyenne 32 cm \pm 2.5 cm. Les gonades sont prélevées sur les individus immédiatement après le sacrifice. Elles sont de petites tailles (1 cm de largeur et 2 cm de longueur en moyenne pour les 3 spécimens), roses et localisées à quelques centimètres de l'anus sur la face ventrale des individus. Les tissus ovariens de 2 femelles (D et E) sont également retenus en vue de comparer leur structure avec celle d'éventuels mâles "intersexes". Chacun des échantillons est fixé individuellement dans le liquide de Bouin.

Le sang des flets mâles est également prélevé au niveau de la veine caudale. Il est immédiatement centrifugé (10 mn, 2000 rpm, 4°C) avant sa coagulation. Le surnageant qui constitue le plasma est ensuite conservé à

- 20° C en vue de déterminer le dosage de biomarqueur par la méthode ELISA ou RIA dans une éventuelle analyse ultérieure.

4.2. Méthodes histologiques

4.2.1. Histologie classique

Les 3 gonades mâles (A, B et C) sont placées dans le Bouin afin de conserver intacts les tissus mais également pour les protéger de la décomposition par les micro-organismes. A la suite de cette fixation, les échantillons sont rincés à l'eau courante (5 mn) afin d'éliminer l'excédent de Bouin. Les tissus sont ensuite déshydratés dans des bains successifs d'alcool dont les durées et les pourcentages sont les suivantes :

- 2 bains successifs de 1 h dans l'alcool à 70°,
- 2 bains successifs de 1 h dans l'alcool à 95°,
- 3 bains successifs de 30 mn, 1 h et 30 mn dans l'alcool absolu (100°).

Les échantillons sont alors totalement déshydratés. L'éthanol est éliminé dans le toluène par 3 bains successifs d'une durée de 30 mn, 1 h et 30 mn. Le toluène remplace l'alcool qui n'est pas miscible dans la paraffine. La durée des bains dans le toluène dépend de la taille de l'échantillon considéré. Les gonades sont ensuite placées dans 2 bains successifs de paraffine (12 h et 1 h). Le premier bain évapore le toluène afin de le remplacer par la paraffine. Le second parfait le premier. Cette imprégnation se fait à chaud et se réalise à l'étuve réglée à la température du point de fusion de la paraffine.

Les tissus sont ensuite inclus et fixés dans la paraffine, les blocs ainsi constitués sont placés à proximité d'une source réfrigérée afin qu'ils durcissent. La réalisation des coupes fines (entre 5 et 10 μm) est obtenue en découpant le bloc de paraffine contenant l'échantillon au moyen d'un microtome (type Minot, Reichert : Jung 2030). Les rubans ainsi découpés sont étalés sur des lames recouvertes d'eau distillée. Le principe de l'étalement est basé sur une dilatation des coupes à la chaleur. Pour que la dilatation s'opère librement, la coupe est mise à flotter sur une goutte d'eau distillée, porté ensuite à une température légèrement inférieure au point de fusion de la paraffine. Ce procédé facilite fortement l'étalement du ruban. Une fois les rubans déposés sur les lames, l'eau en excès est éliminée. Les lames sont alors stockées sur des portoirs qui les maintiennent verticalement. Dans cette position, elles sont mises à l'étuve (60° C) durant 12 h.

L'étape suivante de la coloration nécessite d'abord de déparaffiner les lames grâce à 3 bains successifs, chacun de 3 mn dans le produit bioclear (solvant biodégradable qui remplace le toluène). Les coupes sont réhydratées dans 3 bains d'alcool à 100°/90°/70° de 3 mn et rincés sous l'eau courante durant 5 mn. La coloration proprement dite des lames au trichrome de Masson se réalise selon le protocole suivant (Martoja & Martoja, 1967) :

- 1 bain d'hématoxyline de Groat de 2 mn,
- lavage à l'eau courante pendant 5 mn,
- 1 bain de fushine de Ponceau de 5 mn,
- 2 rinçages à l'eau acétique (1%) de 1 et 2 mn,
- 1 bain d'orange G molybdique de 5 mn,
- 2 rinçages à l'eau acétique (1%) de 1 et 2 mn,
- 1 bain de vert lumière acétique de 5 mn,
- 2 rinçages à l'eau acétique (1 %) de 1 et 2 mn.

La dernière phase est la déshydratation et comprend 3 bains successifs d'une vingtaine de secondes dans différents alcools à 70°/90° et 100°. Il s'agit ensuite de replonger les lames dans 3 bains de toluène de durées respectives : 20 s/ 20 s/ 3mn.

Une goutte du liquide d'Eukit déposée sur les lames permet la fixation des lamelles. Pour éviter la formation de bulles et pour former une surface uniforme, on place une goutte de toluène entre lame et lamelle. Les coupes ainsi préparées et séchées sont prêtes à l'observation microscopique.

4.2.2. Histologie au cryomicrotome

La réalisation des coupes microscopiques décrite selon le procédé précédent nécessite une semaine de préparation. Une autre méthode, visant à effectuer les mêmes coupes, offre l'avantage de réduire considérablement le temps de manipulation (1 jour). Il s'agit de la technique histologique par cryomicrotome. Les gonades sont également prélevées sur des individus après le sacrifice et sont immédiatement congelées à -20° C. Les tissus ne sont ni fixés dans le bouin, ni inclus dans la paraffine. Les organes congelés sont coupés en fines coupes (entre 4 et 7 µm) directement sur le cryomicrotome (microtome cryostat HM 500M). L'état de congélation permet la fixation instantanée des coupes sur les lames. Différents protocoles de coloration sont testés sur les tissus. Il s'agit dans un premier temps d'utiliser la méthode de coloration classique au trichrome de Masson décrite précédemment mais également de tester la

coloration au trichrome en un temps, préparé selon les indications de Gabe et Martoja-Pierzon, 1957 (Martoja & Martoja, 1967). Les coupes sont placées dans le bain de coloration 10 mn puis rincées à l'eau distillée (5 mn). Une goutte de glycérine est placée sur les lames afin d'y fixer les lamelles. Les coupes sèches sont ensuite observées au microscope.

4.3. Méthodes immunologiques

L'observation histologique des gonades peut être couplée aux techniques immunologiques. Le plasma récupéré sur les flets ne sera pas traité par les méthodes immunologiques lors de cette étude. En effet, l'induction chez le lapin, d'anticorps spécifiques à la vitellogénine de flet nécessite entre 5 à 7 mois d'expérimentation. Dans le cadre du stage de recherche de DEA, ce temps de manipulation ne peut être envisagé. Le plasma des flets est toutefois conservé (-20°C) dans le but d'être éventuellement exploité lors de travaux ultérieurs. La technique ELISA a été étudiée au laboratoire de Biologie de la Reproduction des Poissons (INRA, Talence) lors d'une visite de quelques jours. Ce laboratoire utilise couramment cette technique pour évaluer l'effet estrogénique des aliments d'élevage élaborés à base de soja. Les composés sont testés notamment sur la truite arc-en-cielet l'esturgeon. Les différentes techniques immunologiques sont résumées dans le chapitre précédent (§ 3.3.2.).

5. RESULTATS

5.1. Méthodes histologiques

5.1.1. Histologie classique

L'histologie classique avec inclusion des gonades dans la paraffine donne de bons résultats pour l'observation des tissus gonadiques. La coloration en 4 étapes au trichrome de Masson permet, pour des coupes effectuées entre 5 et 7 µm, de discerner clairement les structures testiculaires.

5.1.2. Histologie au cryomicrotome

Les coupes effectuées au cryomicrotome sont plus aisées à réaliser. Mais du fait d'altérations tissulaires liées à la congélation, elles sont toutefois plus grossières et la netteté des tissus gonadiques se révèle médiocre pour la même épaisseur de tissus coupés. Comme le montre la figure 3, la coloration au trichrome de Masson sur des coupes de tissus testiculaires

congelées est inexploitable. Les produits colorants ne semblent pas avoir intégré les tissus biologiques et l'observation des structures reste délicate.

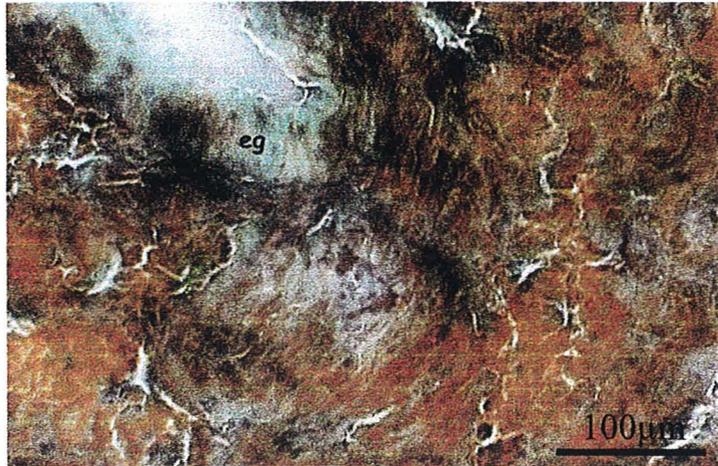


Figure 3 : Coupe histologique (5 μ m) de gonade mâle réalisée au cryomicrotome selon la coloration au trichrome de Masson. Les ergastoplasmes (eg) sont colorés en gris (Gr : x 125).

Les résultats obtenus par la coloration au trichrome en un temps sont légèrement plus satisfaisants mais ne permettent toujours pas d'interpréter les coupes testiculaires réalisées au cryomicrotome (fig. 4).

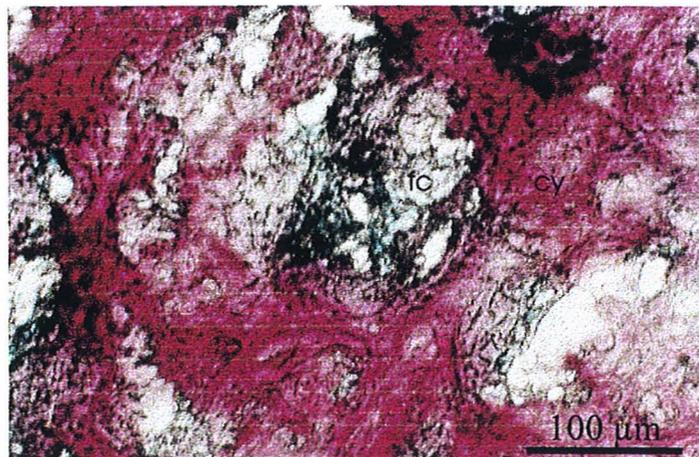


Figure 4 : Coupe histologique (5 μ m) de gonade mâle réalisée au cryomicrotome selon la coloration en un temps. Les noyaux et la plupart des cytoplasmes (cy) sont colorés en rouge, les fibres conjonctives (fc) en vert (Gr : x 125).

5.2. Histopathologie des gonades

L'ensemble des coupes présentées sont réalisées par la technique histologique classique avec inclusion dans la paraffine, le procédé de la coloration est celui du trichrome de Masson.

La figure 5 montre les lamelles ovigènes d'une femelle. Les ovocytes primaires et secondaires sont clairement visibles. Selon Billard, la coupe représente une référence de tissu ovarien sain en phase de repos biologique (com. pers.).

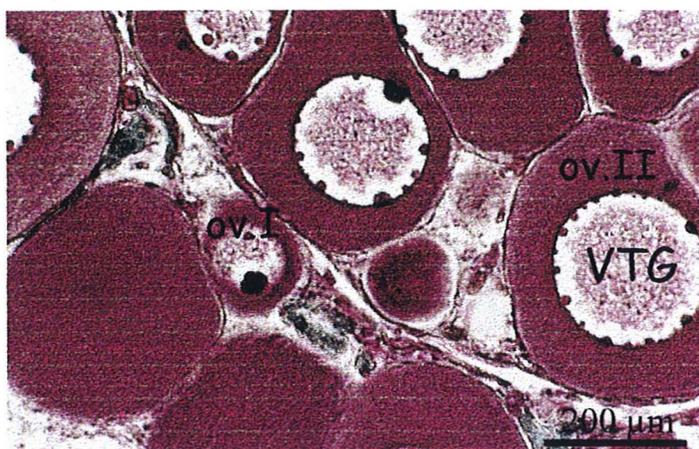


Figure 5 : Coupe histologique (7 µm) de lamelles ovigènes saines. Présence d'ovocytes primaires (ov. I) et secondaires (ov. II), la vitellogénine (VTG) s'accumule à l'intérieur des ovocytes (Gr: x 125).

Les observations histologiques réalisées sur les 3 individus mâles mettent en évidence l'existence de gonades mâles saines, 100 % des territoires de la figure 6 sont testiculaires.

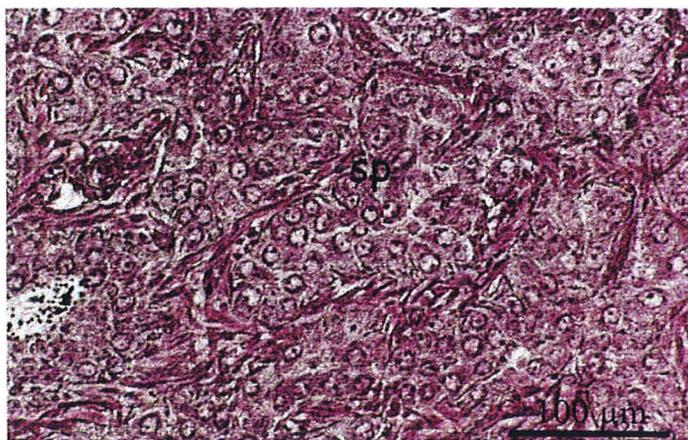


Figure 6 : Coupe histologique (7 µm) de tissus testiculaires sains. Les nombreux spermatozoaires (sp) sont clairement visibles dans les tissus gonadiques (Gr : x 125).

La figure 7 représente la coupe d'une gonade mâle pourvue d'un conduit testiculaire dans lequel les spermatozoïdes résidants proviennent de la phase antérieure de spermatogenèse. Il s'agit d'une période de repos sexuel complet.

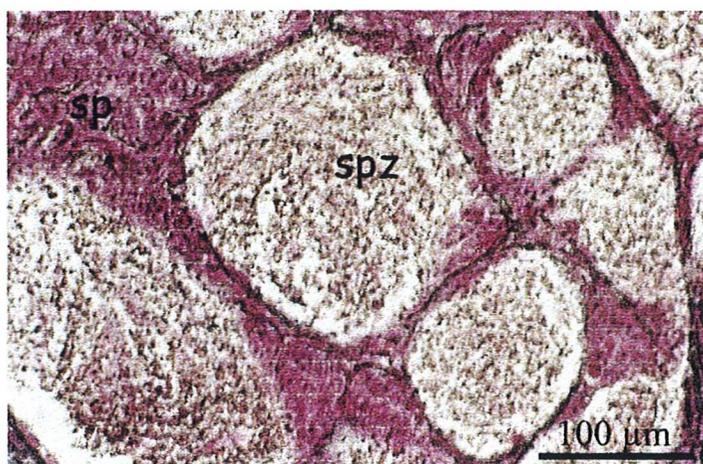


Figure 7 : Coupe histologique (10 μm) des conduits testiculaires contenant des spermatozoïdes (*spz*) résidants (Gr : x 125).

La figure 8 représente une gonade mâle saine et révèle que la plupart des spermatogonies souches accumulent dans leur cytoplasme une quantité non négligeable de matière dense.

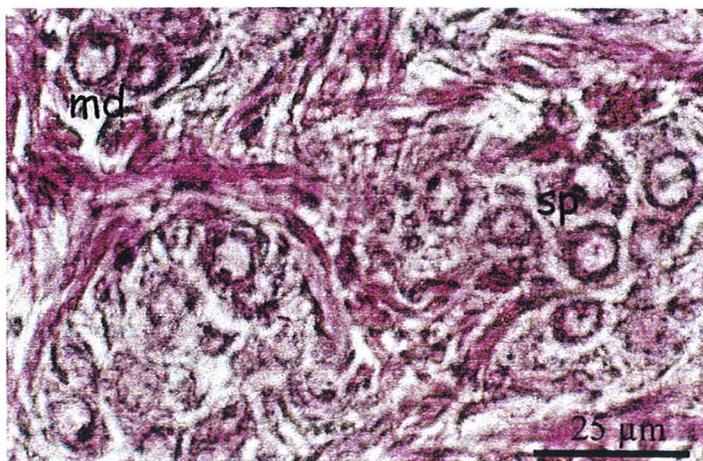


Figure 8 : Coupe histologique (7 μm) de tissus testiculaires. Présence de matière dense (*md*) dans le cytoplasme des spermatogonies souches (*sp*) (Gr : x 312,5).

6. DISCUSSION

L'action anthropique et les facteurs environnementaux peuvent influencer le sex ratio d'une population. En mer du nord, le sex ratio de la population de limande (*Limanda limanda*, Linné, 1758) s'oriente en faveur des mâles dans les régions centrale et nord-ouest de 1981 à 1995. En effet, une augmentation de l'effort de pêche depuis 1981 dans les régions considérées a tendance à accroître la capture et la disparition des femelles dont la croissance est plus rapide que celle des mâles (Lang *et al.*, 1995). Les facteurs environnementaux sont également capables d'orienter de façon naturelle la détermination sexuelle des individus vers le sexe mâle ou femelle.

Sur les prélèvements réalisés en mai 1999 en estuaire de la Loire, le sexe ratio révèle que 14.3 % des individus sont des mâles, soit 3 individus sur 21. Le sex ratio est le rapport des individus mâles sur l'ensemble des individus échantillonnés. Masson (1987) montre que le taux de masculinité ($T_m = \text{nb de mâles} \times 100 / \text{nb d'individus}$) chez le flet est directement lié au schéma migratoire et qu'il est différent selon le sexe, il n'est donc pas caractéristique de l'ensemble de la population de flets présent sur cette zone. Les résultats obtenus n'ont donc qu'une valeur indicative.

6.1. Méthodes histologiques

La méthode classique par inclusion des tissus dans la paraffine est la plus répandue et la plus couramment utilisée par les histologistes pour révéler les structures tissulaires. Elle nécessite néanmoins plus d'une semaine de préparation. Dans le but de parfaire le protocole expérimental, il est recommandé de ne pas utiliser de tissus congelés pour réaliser les coupes, la congélation dégrade les structures tissulaires. Le gain de temps obtenu par la technique de cryomicrotome permet un traitement de grandes séries d'échantillons alors que la méthode par inclusion limite le nombre d'observations possibles. Néanmoins, le procédé des coupes au cryostat nécessite de recueillir une à une les coupes effectuées si bien que l'obtention des séries pose des problèmes dont l'encombrement n'est pas le moindre. La méthode permet toutefois, de se dispenser de toute inclusion et d'obtenir des résultats plus rapidement que tout autre procédé. Elle permet également de couper des pièces n'ayant subi ni déshydratation, ni traitements par les solvants, ni passage à température élevée. C'est donc la technique privilégiée pour mettre en évidence les lipides et les enzymes. Les informations sur les protocoles de coloration à

partir de coupes effectuées au cryomicrotome sont relativement rares dans la littérature. La mise au point de cette technique est nécessaire et permettrait de gagner un temps considérable dans les manipulations réalisées.

A nos latitudes, la période de reproduction du flet s'étend de décembre à fin février (Miossec, 1981). Durant cette période, une élévation naturelle du taux de vitellogénine chez les femelles ne permet pas de confirmer une contamination estrogénique. De plus, les gonades contiennent des oeufs ou des spermatozoïdes en grande quantité et ne peuvent faire l'objet d'une observation morphologique précise. Au début de la période de reproduction et dans des conditions saines, les cellules germinales sont pourvues d'une double compétence, elles ont la capacité de devenir d'une part des spermatocytes et d'autre part des ovocytes, ceci en fonction de la stimulation hormonale ou chimique présente (Gimeno *et al.*, 1996). Il est souhaitable que la plupart des études destinées à révéler l'effet estrogénique des contaminants soient réalisées au début de la période de reproduction. En effet, à ce stade de maturité, les tissus gonadiques se développent et sont aptes à se différencier sexuellement en fonction des conditions du milieu. Lors de cette étude, la période de capture des individus (post période de reproduction) n'a pas été favorable à l'éventuelle observation des effets estrogéniques.

L'observation des gonades au microscope révèle que les 3 individus mâles capturés dans l'estuaire de la Loire en mai 1999 ne montrent pas de perturbations permettant de conclure à une contamination estrogénique. Il apparaît clairement que les tissus gonadiques sont typiquement masculins. Les cellules germinales sont destinées à rester à l'état de quiescence jusqu'à la prochaine période de reproduction où elles se différencient en gamètes mâles ou femelles. Les individus sont en phase de repos biologique. On remarque toutefois la présence de matière dense dans le cytoplasme des spermatogonies.

Les investigations menées en Baie de Seine par le laboratoire d'écotoxicologie du Havre (Minier, com verb, 1999) révèlent la présence d'ovotestis chez certains flets. Huit pour cent des individus mâles capturés présentent ce type de structure. Les individus étudiés ont été capturés au mois de septembre, juste avant la période de reproduction. Les gamètes mâles en réponse à une stimulation de type estrogénique, se sont différenciés en ovocytes durant le développement et la maturation des gonades. L'étude de la contamination en Baie de Seine a notamment permis de révéler de fortes concentrations en PCB dont la potentialité de

perturbation endocrinienne a été démontré (Toppari *et al.*, 1996 ; Tyler *et al.*, 1998).

Malgré l'absence de mise en évidence d'effets estrogéniques lors de notre étude, il s'avère nécessaire de déterminer avec exactitude l'existence ou non de caractéristiques féminisantes dans les testicules des individus et de se référer aux travaux déjà réalisés dans ce domaine (§ 1.2.). La littérature propose d'autres échelles de classement de l'intersexualité chez le poisson (Pereira *et al.*, 1992). Néanmoins, la méthode de reconnaissance décrite par Jobling *et al.* (1998) est précise et facile à évaluer. D'autres études ont rapporté que dans la population de flets soumis aux polluants de la rivière Mersey (Grande Bretagne), 17 % étaient pourvus d'ovocytes testiculaires au stade primaire (fig. 9).

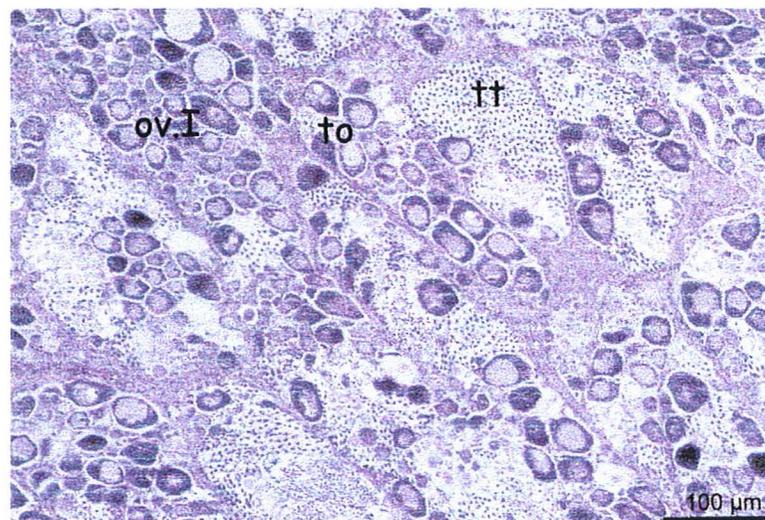


Figure 9 : Coupe histologique (5µm) de gonade mâle (*P. flesus*) "intersexe". Présence d'ovocytes primaires (ov.I). tt : territoires testiculaires ; to : territoires ovariens. D'après Matthiessen *et al.*, (1998).

Dans le cas d'une contamination estrogénique plus forte, les territoires ovariens et testiculaires sont clairement séparés et le sexe d'origine devient difficile à établir. Dans ce cas, relativement rare, les ovocytes peuvent atteindre le stade secondaire. On observe alors des gouttes visibles de jaune à l'intérieur même de la cavité ovocytaire (fig. 10).

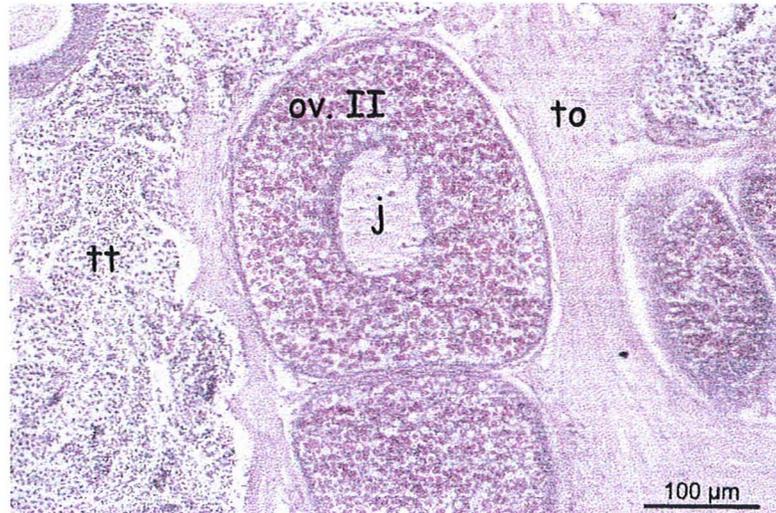


Figure 10 : Coupe histologique (5µm) de gonade mâle (*P. fesus*) "intersexe" dans le cas d'une contamination estrogénique forte. Présence de jaune (j) dans la cavité de l'ovocyte secondaire (ov. II) ; tt : territoire testiculaire ; to : territoire ovariens. D'après Matthiessen *et al.*, (1998).

L'apparition d'ovocytes testiculaires semble être le biomarqueur le plus performant et sans doute le plus évident à décrire pour mettre en évidence les perturbations estrogéniques. Néanmoins, la forme, l'aspect et la taille des gonades altérées varient d'une espèce à l'autre et en fonction du stade de maturité sexuel. Il s'avère nécessaire de connaître parfaitement l'histologie de l'espèce étudiée et ses fluctuations, en fonction du cycle de reproduction, avant d'aborder l'observation pathologique. Les stades précoces d'intersexualité ne sont pas toujours simples à observer. Chez les individus juvéniles, la faible maturité des gonades ne permet pas toujours de déceler les éventuelles anomalies morphologiques. Il est alors difficile de déterminer les effets immédiats des xéno-estrogènes.

6.2. Méthodes immunologiques

Une étude bibliographique approfondie sur les différentes méthodes immunologiques et les recommandations du laboratoire de la Biologie de la Reproduction des Poissons (INRA, Talence) permettent de comparer la méthode immuno-enzymatique et la méthode radio-immunologique.

La sensibilité et la spécificité des deux méthodes permettent d'examiner l'induction de vitellogénine et de protéine zona radiata à des stades précoces de maturité sexuelle. Ce dosage protéique constitue le seul

moyen capable de révéler l'exposition des individus immatures aux xéno-estrogènes.

La méthode RIA est plus sensible que l'ELISA dans la précision du dosage (Harries *et al.*, 1997). La limite inférieure de détection de vitellogénine par la méthode radio-immunologique est de 10 ng.ml⁻¹ de sérum sur le flet (Allen *et al.*, 1998). Néanmoins, le coût à l'achat des produits radioactifs est relativement élevé et c'est plus particulièrement le traitement des déchets à la fin des expérimentations qui accroît considérablement l'investissement financier. D'autre part, l'utilisation de certains révélateurs marqués peut détériorer le biomarqueur à doser. C'est notamment le cas de l'iode marqué, molécule couramment utilisée pour le dosage de vitellogénine chez la truite arc-en-ciel ou chez l'esturgeon (Benneteau, com. pers.). Ce marqueur est extrêmement volatile et sa manipulation nécessite un équipement et des installations conformes et appropriées. Le tritium (³H) a également été utilisé comme marqueur, mais l'analyse et le dosage sont lourds à mettre en oeuvre. Le produit a également l'inconvénient de dégrader la vitellogénine en induisant son vieillissement prématuré. Enfin, en terme de santé publique la manipulation de produits radioactifs s'avère dangereuse et risquée pour la santé humaine. La méthode ELISA est désormais plus utilisée et remplace souvent la méthode RIA (Specker & Anderson, 1994).

Dans la plupart des cas, les espèces étudiées présentent une spécificité pour chaque biomarqueur, il est alors indispensable d'avoir recours à un anticorps spécifique, ce qui demande plusieurs mois d'expérimentation (Copeland & Thomas, 1987).

L'étude réalisée par Arukwe *et al.*, (1997a) précise que la protéine zona radiata serait plus sensible que la vitellogénine à l'exposition de certains contaminants. Dans le cas du 4-nonylphénol (composé reconnu comme ayant des effets estrogéniques) la concentration minimale de détection de vitellogénine nécessite la présence de 25 mg 4-nonylphénol. kg⁻¹ de chair (*S. salar*). Alors que l'induction de protéine zona radiata est observée pour une concentration en produit beaucoup plus faible de l'ordre de 1 mg 4-nonylphénol. kg⁻¹. La protéine zona radiata peut représenter un outil de détection complémentaire dans la surveillance des pollutions estrogéniques. Toutefois, l'utilisation récente de cette protéine et le peu de travaux effectués dans ce domaine ne permettent pas encore de valider son utilisation en tant que biomarqueur.

6.3. Etudes expérimentales et environnementales

6.3.1. Approche *in vitro*

La méthode de culture d'hépatocytes est facile à mettre en application et offre l'avantage de pouvoir tester individuellement ou en mélange les produits potentiellement estrogéniques. Elle permet également d'évaluer l'éventuelle synergie d'un mélange de composés. Elle détermine clairement les mécanismes et les sites d'actions au niveau des récepteurs et permet de tester un grand nombre de produits en utilisant les tissus hépatiques de quelques individus seulement.

Néanmoins, les expériences *in vitro* ne permettent pas d'observer certains mécanismes physiologiques et leur potentiel toxique. En effet, les composés dits estrogéniques peuvent être bioaccumulés sous forme inactive dans les tissus adipeux. Ces mécanismes ne peuvent être observés *in vitro* car la structure hépatocytaire est incapable de bioactiver un composé proestrogénique sous forme inactive (Arukwe & Goksøyr, 1998). Une exposition directe aux polluants peut également provoquer l'apoptose des cellules hépatocytaires (Toomey *et al.*, 1999). Dans la plupart des cas, ces manipulations *in vitro* ne reflètent pas les conditions environnementales et la comparaison avec l'effet des polluants dans le milieu reste délicate.

6.3.2. Approche *in vivo*

Les techniques *in vivo* offrent l'avantage de pouvoir travailler sur du matériel biologique vivant et constituent un bon moyen de réaliser une étude à long terme. Ces techniques peuvent être couplées à l'observation histopathologique des gonades en fin d'étude. De plus, le prélèvement de sang et le dosage des biomarqueurs dans le plasma ne nécessite pas autant de manipulations et de précautions que la mise en culture des hépatocytes. Cette méthode offre également l'avantage de tester certains produits sur des individus juvéniles et de déterminer ainsi le stade précoce du développement capable d'induire la synthèse de vitellogénine, elle permet entre autre de travailler sur plusieurs générations.

Mais, la méthode invasive du prélèvement peut stresser les individus et provoquer une induction anormale d'hormones stéroïdiennes en réponse à cette agression. Bien que cette technique soit facile à mettre en oeuvre, elle ne reproduit pas les conditions du milieu naturel où d'autres facteurs sont capables d'influencer la synthèse des biomarqueurs.

6.3.3. Approche *in situ*

Les expériences réalisées *in situ* permettent de préserver les conditions environnementales et de tenir compte des paramètres susceptibles d'interférer avec les xéno-estrogènes. Elles permettent aussi de mesurer l'impact réel des contaminants dans les conditions environnementales réelles. Les octylphénols (alkylphénol) s'accumulent préférentiellement dans le sédiment riche en particule organique. Ces polluants agissent majoritairement sur les espèces benthiques de type filtreur (Johnson *et al.*, 1998b). Les recherches sur le flet montrent que cette espèce est une des plus exposées aux contaminants chimiques. En effet, les individus passent une grande partie de leur cycle de vie sur le sédiment où la plupart des contaminants y sont accumulés. La dilution des polluants provoquée par les pluies et par le mélange eau douce/eau de mer joue également un rôle dans la capacité estrogénique des composés en réduisant leurs effets (Harries *et al.*, 1997). Les investigations menées au large des côtes, mettent en évidence le fait qu'une légère dilution est suffisante pour annuler complètement le potentiel toxique des xéno-estrogènes. La stimulation endocrinienne serait donc minimale en mer et incomparable à celle rencontrée en eau douce ou saumâtre (Harries *et al.*, 1996).

De nombreuses études sont conduites et font l'objet d'une surveillance rigoureuse au niveau des points de rejets où les déchets urbains, domestiques et industriels sont libérés abondamment dans le milieu. Afin d'étudier les mécanismes *in situ*, les animaux sont placés en cage et déposés en amont et en aval des sites. Les résultats révèlent en général un effet toxique plus prononcé chez les individus situés dans la zone proche du point de rejet, puis le potentiel toxique s'amointrit au fur et à mesure de l'éloignement de la source des rejets (Harries *et al.*, 1996, 1997).

Dans des conditions *in situ*, la multitude des composés toxiques contenus dans les rejets ne permet pas de déterminer avec exactitude lequel d'entre eux induit des effets estrogéniques. L'identification des composés peut éventuellement être réalisée au moyen de différentes techniques analytiques (CLHP, absorption atomique, spectrographie de masse, etc...).

7. CONCLUSION

Les perturbations provoquées par les substances estrogéniques constituent un phénomène observé très récemment. Les études sur les mécanismes impliqués dans ces perturbations sont encore peu fréquentes. Néanmoins, l'ensemble des recherches effectuées sur les organismes aquatiques, en particulier sur les poissons, révèle que les effets estrogéniques peuvent être identifiés au niveau morphologique par l'observation histologique des gonades mais également au niveau physiologique par le dosage de biomarqueurs (vitellogénine et protéine zona radiata) grâce aux techniques immunologiques. La technique immuno-enzymatique (ELISA) offre l'avantage de ne pas utiliser d'éléments radioactifs, elle est plus couramment employée que la méthode de détection radio-immunologique (RIA).

Avant 1998, les groupes de recherches ont identifié les alkylphénols comme étant les principaux agents chimiques responsables des effets estrogéniques. Depuis cette date, les études dans le domaine se sont intensifiées et ont révélé le puissant potentiel estrogénique des substances naturelles ainsi que le rôle non négligeable joué par les hormones estrogènes de synthèse et notamment les constituants de la pilule contraceptive. Ceci, malgré les faibles concentrations de ces substances dans l'environnement.

Le prélèvement de trois flets mâles dans l'estuaire de la Loire en mai 1999 et la réalisation de coupes histologiques à partir des gonades de ces individus ont mis en évidence l'absence de caractéristiques féminisantes chez les mâles et ont révélé que la période de prélèvement correspondant au repos sexuel des individus ne permettait pas de déceler d'éventuelles perturbations endocriniennes.

Les expérimentations ont montré que la technique histologique classique par inclusion des échantillons dans la paraffine offrait de bons résultats dans la reconnaissance des structures gonadiques. Le procédé histologique, plus rapide, réalisé directement à partir de tissus congelés doit faire l'objet d'une mise au point minutieuse.

Dans la perspective de proposer la réduction des rejets de substances chimiques capables d'engendrer les perturbations endocriniennes, il est nécessaire d'identifier et de quantifier avec exactitude les principaux composés responsables.

L'évaluation des effets estrogéniques requiert la mise en oeuvre des approches *in vitro*, *in vivo* et *in situ*. Ces protocoles révèlent des aspects différents des effets de la contamination endocrinienne. Ils sont

complémentaires dans la détection et la compréhension des mécanismes impliqués dans ces perturbations et chacun d'entre eux doit être effectué sur une période de temps relativement longue afin d'évaluer les risques écologiques encourus par les populations. Il est également indispensable de prendre en compte et de tester chacun des paramètres environnementaux susceptibles d'influencer le potentiel toxique des substances exogènes.

Bien que la plupart des études soit menée sur une grande variété d'espèces, les recherches des effets en milieu marin se sont portées sur le flet, espèce euryhaline cantonnée au sédiment estuarien et de ce fait très exposée aux polluants apportés par les fleuves. Les travaux récents ont notamment montré que les flets mâles soumis à la même concentration de polluants que les mâles appartenant à la famille des salmonidés présenteraient dans le plasma un taux de vitellogénine plus élevé (Anonyme, 1999). Il semble donc souhaitable que les travaux futurs soient développés sur le flet en tant qu'espèce sentinelle standard.

Compte tenu de leur stade de développement avancé, la mesure de la vitellogénine et l'observation histologique des gonades constituent deux outils fiables d'exploration des effets, même s'ils demandent encore une certaine optimisation.

Les études d'exposition *in vitro* à des molécules, des mélanges de molécules ou des rejets bruts de station d'épuration, soupçonnés perturber l'équilibre endocrinien, sont à encourager notamment à travers l'exposition de juvéniles immatures (les frayères du flet sont situées sur les berges des estuaires) afin de suivre avec précision l'évolution des altérations engendrées par ces contaminants.

Enfin, les investigations *in situ* permettront à la fois de développer un système d'alarme ou de surveillance et d'estimer l'ampleur du phénomène et son impact éventuel sur les espèces et la ressource.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Allen Y., Scott A.P., Matthiessen P., Haworth S., Thain J.E., & Feist S., 1999. A survey of estrogenic activity in UK estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development on the flounder (*Platichthys flesus*). *Soumis à Env. Toxicol. Chem.*
- Anonyme., 1999. CSTEEN opinion on human and wildlife health effects of endocrine disrupting chemicals, with emphasis on wildlife and on ecotoxicology test methods. *Report of the Working Group on Endocrine Disrupters of the Scientific committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) of DG XXIV, Consumer Policy and Consumer Health Protection.* 74 pp.
- Arukwe A., & Goksøyr A., 1998. Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia*, **83** : 225-241.
- Arukwe A., Celius T., Walther B.T., & Goksøyr A., 1998. Plasma levels of vitellogenin and eggshell zona radiata proteins in 4-nonylphenol and o-p' DDT treated juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Marine Environ. Research*, **46** (1-5) : 133-136.
- Arukwe A., Förlin L., & Goksøyr A., 1997b. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16** (12) : 2576-2583.
- Arukwe A., Knudsen F.R., & Goksøyr A., 1997a. Fish zona radiata (eggshell) protein : a sensitive biomarker for environmental estrogens. *Environ. Health Perspect.*, **105** (4) : 418-422.
- Blackburn M.A., & Waldock M.J., 1995. Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Res.*, **29** : 1623-1629.
- Colborn, T. Vom Saal F.A., & Soto A.M., 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, **101** (5) : 378-84.
- Copeland P.A., & Thomas P., 1987. The measurement of plasma vitellogenin levels in a marine teleost, the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) by homologous radioimmunoassay. *Comp. Biochem. Physiol.*, **91B** (1) : 17-23.



- Donohoe R.M., & Curtis L.R., 1996. Estrogenic activity of chlordecone, *o,p'*-DDT and *o,p'*-DDE in juvenile rainbow trout : induction of vitellogenesis and interaction with hepatic estrogen binding sites. *Aquatic Toxicol.*, **36** : 31-52.
- Folmar L.C., Denslow N.D., Chow M., Crain D.A., Enblom J., Marcino J., & Guillette L.J.Jr., 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.*, **104** (10) : 1096-1101.
- Giam C.S., Chan H.S., Neff G.S., & Atlas E.L., 1978. Phtalates ester plasticizers : A new class of marine pollutant. *Science*, **199** : 419-421.
- Gibbs P.E., Pascoe P.L., & Burt G.R., 1988. Sex change in the female dogwhelk (*Nucella lapillus*) induced by tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol.*, **68** : 715-731.
- Gillesby B.E., & Zacharewski T.R., 1998. Exostrogens: mechanisms of action and strategies for identification and assessment. *Environ. Toxicol. Chem.*, **17** (1) : 3-14.
- Gimeno S., Gerristen A., Bowmer T., & Komen H., 1996. Feminization of male carp. *Nature*, **384** : 221-222.
- Gluth G., Freitag D., Hanke W., & Korte F., 1985. Accumulation of pollutants in fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81** (2) : 273-277.
- Hansen P. D., Von Westernhagen H., & Rosenthal H., 1985. Chlorinated hydrocarbons and hatching success in baltic herring spring spawners. *Marine Environ. Research*, **15** : 59-76.
- Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., & Routled P., 1996. A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15** : 1993-2002.
- Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T., & Zaman N., 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, **16** (3) : 534-542.
- Haux C., Björnsson B.Th., Förlin L., Larsson A., & Deftos L.J., 1988. Influence of Cadmium exposure on plasma calcium, vitellogenin and calcitonin in vitellogenic Rainbow trout. *Marine Environ. Res.*, **24** : 199-202.



- Janssen P.A.H., Lambert J.G.D., Vethaak A.D., & Goos H.J.Th., 1997. Environmental pollution caused elevated concentrations of oestradiol and vitellogenin in the female flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicol.*, **39** : 195-214.
- Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., & Sumpter J.R., 1998. Widespread sexual disruption in wild life. *Envir. Sci. Technol.*, **32** : 2498-2506.
- Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., & Sumpter J.R., 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.*, **103** : 582-587.
- Jobling S., Sheahan D., Osborne J.A., Matthiessen P., & Sumpter J.P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkyl-phenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, **15** : 194-202.
- Johnson A.C., White C., Besien T.J., & Jürgens M.D., 1998b. The sorption potential of octylphenol, a xenobiotic oestrogen to suspended and bed-sediments collected from industrial and rural reaches of three English rivers. *The Science of the total Environ.*, **210/211** : 271-282.
- Johnson L.L., Casillas E., Collier T.K., Mc Cain B.B., & Varanasi U., 1988. Contaminant effects on ovarian development in English Sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Can. J. Aquat. Sci.*, **45** : 2133-2146.
- Johnson L.L., Sol S.Y., Ylitalo G.M., Hom T., French B., Olson O.P., & Collier T.K., 1998. Precocious sexual maturation and other reproductive anomalies in english Sole from urban waterway. *International Council for the Exploitation of the Sea*, Copenhagen, Denmark., *ICES CM 1997/U:07*. 15 pp.
- Kelce W.R., Stone C.R., Laws S.C., Earl Gray L., Kemppainen J.A., & Wilson E.M., 1995. Persistent DDT metabolite *p,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, **375** : 581-585.
- Kime D.E., 1995. The effects of pollution on reproduction in fish. *Reviews in fish Biol. Fisheries*, **5** : 52-96.

- Koemman J.H., Köhler-Günter A., & Kurelec B., 1993. Applications and objectives of biomarkers research. In : Peakall D.B., Shugart L.R. (eds), Biomarkers. Research and Application in the assessment of Environmental Health. NATO Advanced Science Series, **H68**. Springer Verlag, Berlin, Heilderberg, 1-13.
- Lang T., Damm U., & Dethlefsen V., 1995. Changes in the sex ratio of north Sea dab (*Limanda limanda*) in the period 1981-1995. *International Council for the Exploitation of the Sea* Copenhagen, Denmark., *ICES CM/G : 25Ref. E*. 10 pp.
- Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.E., & Förlin L., 1999. Ethinyloestradiol an undesired fish contraceptive ? *Aquat. Toxicol.*, **45** : 91-97.
- Laubier L., 1990. La mer poubelle, Sciences et Avenir. **HS 78** : 32-35.
- Le Blanc G.A., & Bain L.J., 1997. Chronic toxicity of environmental contaminants : sentinels and biomarkers. *Environ. Health Perspect.*, **105** : 165-180.
- Lye C. M., Frid C.L.J., Gill M.E., & Mc Cormick D., 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder (*Platichthys flesus*) exposed to effluent from a sewage treatments works. *Mar. Pollut. Bull.*, **34** : 34-41.
- Masson G., 1987. Biologie et écologie d'un poisson plat amphihaline, le flet (*Platichthys flesus*) dans l'environnement ligérien. Thèse de 3ème cycle. Université de Nantes. 345 p.
- Martoja R., & Martoja-Pierson M., 1967. *Initiation aux techniques de l'histologie animale*. Masson publ., Paris, Fr., : 343 pp.
- Matthiessen P., Allen Y.T., Allchin C.R., Feist S.W., Kirby M.F., Law R.J., Scott A.P., Thain J.E., & Thomas K.V., 1998. Oestrogenic endocrine disruption in flounder (*Platichthys flesus*) from United Kingdom estuarine and marine waters. *EPA technical report*, 48 pp.
- Minchin D., Oehlmann J., Duggan C.B., Stroben E., & Keatingue M., 1995. Marine TBT antifouling contamination in Ireland, following legislation in 1987. *Mar. Pollut. Bull.*, **30** (10) : 633-639.
- Miossec L., 1981. *Impacts de la pollution pétrolière due à " l'Amoco-Cadiz " sur la biologie des poissons plats de l'Aber Benoit et de l'Aber Wrac'h*. Thèse Doct. Sci., Univ. Bretagne Occidentale, Brest, Fr. 143 pp.
- Morcillo Y., Borghi V., & Porte C., 1997. Survey of organotin compounds in the Western Mediterranean using molluscs and fish as sentinel organisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **32** : 198-203.

- Pelissero C., Bennetau B., Babin P., Le Menn F., & Dunogues J., 1991b. The estrogenic activity of certain phytoestrogens in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **38** : 293-299.
- Pelissero C., Le Menn F., & Kaushick S., 1991a. Estrogenic effect of dietary soya bean meal on vitellogenesis in cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **83** : 447-457.
- Pereira J.J., Mercaldo-Allen R., Kuropat C., Luedke D., & Sennefelder G., 1993. Effect of cadmium accumulation on serum vitellogenin levels and hepatosomatic and gonadosomatic indices of winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **24** : 427-431.
- Pereira J.J., Ziskowski J., Mercaldo-Allen R., Kuropat C., Luedke D., & Gould E., 1992. Vitellogenin in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from long Island sound and Boston harbour. *Estuaries*, **15** : 289-297.
- Pifferrer F., & Donaldson E.M., 1989. Gonadal differentiation in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*, **77** : 251-262.
- Reis-Henriques M.A., Cruz M.M., & Pereira J.O., 1997. The modulating effect of vitellogenin on the synthesis of 17- β -estradiol by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary. *Fish Physiol. Biochem.*, **16** : 181-186.
- Shukla J.P., & Pandey K., 1984a. Arsenic induced structural changes during the ovarian cycle of a freshwater perch, *Colisa fasciatus* (Bloch & Schneider). *Bull. Inst. Zool. Acad. Sinica*, **23** : 69-74.
- Shukla J.P., & Pandey K., 1984b. Impaired spermatogenesis in arsenic treated freshwater fish, *Colisa fasciatus* (Bloch & Schneider). *Toxicol. Lett.*, **21** : 191-195.
- Sohoni P., & Sumpter J.P., 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J. Endocrinol.*, **158** (3) : 327-339.
- Specker J.L., & Anderson T.R., 1994. Developing an ELISA for a model protein-vitellogenin. *Biochem. Molecular Biol. of fishes*, **3** : 568-578.
- Sumpter J.P., & Jobling S., 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Perspect.*, **103** : 173-178.
- Sumpter J.P., 1995. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Dep. Biol. and Biochem.*, **82-83** : 737-742.



- Ten Hallers-Tjabbes C.C., Kemp J.F., & Boon J.P., 1994. Imposex in Whelks (*Buccinum undatum*) from the open North Sea : relation to shipping traffic intensities. *Mar. Pollut. Bull.*, **28** (5) : 311-313.
- Toomey B.H., Monteverdi G.H., & Di Giulio R.T., 1999. Octylphenol induces vitellogenin production and cell death fish hepatocytes. *Environ. Toxicol. Chem.*, **18** (4) : 34-739.
- Toppiari, J., Larsen, J. C., Christiansen, P., Gwercman, A., Grandjean, P., & Guillette, L. J., 1996. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Envir. Health Perspect.*, **104**(4) : 741-803.
- Tyler C.R., Jobling S., & Sumpter J.P., 1998. Endocrine disruption in wildlife : a critical review of the evidence. *Crit. Rev. Toxicol.*, **28** : 319-361.
- Tyler C.R., Sumpter J.P., & Bromage N.R., 1990b. An *in vitro* culture system for studying vitellogenin uptake into ovarian follicles of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Zool.*, **255** : 216-231.
- Tyler C.R., Sumpter J.P., & Witthames P.R., 1990a. The dynamics of oocyte growth during vitellogenesis in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol. Reprod.*, **43** : 202-209.
- Van Den Hurk R., & Lambert J.G.D., 1982. Temperature and steroid effects on gonadal sex differentiation in rainbow trout. *In proceedings of the international Symposium on Reproductive physiology of Fish*. Wageningen, the Netherlands. 69-72.
- Wester P.W., 1991. Histopathological effects of environmental pollutants β -HCH and methyl mercury on reproductive organs in freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100** : 237-239.
- White R., Jobling S., Hoare S. A., Sumpter J.P., & Parker M.G., 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology.*, **135** : 175-182.
- Wingfiel J.C., & Grimm A.S., 1977. Seasonal changes in plasma cortisol, testosterone and oestradiol 17 β in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **31** : 1-11.
- Yano T., & Matsuyama H., 1986. Stimulatory effects of PCB on the metabolism of sex hormones in carp hepatopancreas. *Lab. Fish. Chem.*, **52** : 1847-1852.