

Recherche de perturbations endocriniennes sur les poissons du bassin versant de l'Orge

Wilfried Sanchez¹, Perrine Maltret², Jean-Marc Porcher¹ et Christophe Minier^{2*}

¹ Unité d'évaluation des risques écotoxicologiques, INERIS, BP2, Parc ALATA, 60550 Verneuil en Halatte, France

² LEMA, EA 3222, Université du Havre, 25, rue Philippe Lebon, 76058 Le Havre, France

* Personne à contacter : C. Minier, minier@univ-lehavre.fr

1. Résumé

Le bassin versant de l'Orge présente des sédiments faiblement contaminés par des composés oestrogéniques. Cependant ces composés sont présents dans les fluides des gardons tels que la bile gardons et sont responsables d'effets notables. La concentration de vitellogénine plasmatique induite chez les mâles prélevés à Viry-Châtillon est comparable à celle rencontrée chez les poissons vivant en aval à Poses ou à Rouen (supérieure à un millier de ng/mL). De plus, des poissons intersexués sont présents dans la population. La concentration de vitellogénine plasmatique est cependant faible à Villeneuve Saint Georges. Les composés oestrogéniques identifiés dans la bile des gardons correspondent à des stéroïdes naturels (oestradiol, estrone) et synthétiques (éthynyl-oestradiol) tandis que la présence d'alkyl-phénols et leurs dérivés est fortement soupçonnée.

2. Introduction

L'activité métabolique, la reproduction, le développement et le comportement des individus sont régulés par le système endocrinien des organismes vivants. Celui-ci fait intervenir un nombre important de molécules appelées hormones ayant des structures et des modes d'action complexes. Or, un nombre important de composés utilisés par l'industrie, l'agriculture ou la population humaine sont suspectés de pouvoir interagir avec le système endocrinien des hommes et de la faune sauvage conduisant à des effets tels que des cancers, des altérations des fonctions neurologiques ou reproductrices (Colborn *et al.*, 1993 ; Toppari *et al.*, 1996). Ces composés sont dénommés « perturbateurs endocriniens (PE) » et sont susceptibles d'avoir des effets à long terme sur les individus et les populations.

Plus de 550 composés différents ont été identifiés comme PE avérés ou potentiels parmi l'ensemble des produits chimiques susceptibles d'être présents dans l'environnement (CEE, 2001). La nouvelle réglementation sur les produits chimiques (REACH), mentionne de façon explicite ces composés qui représentent un risque particulier. Cependant ces mêmes textes ne décrivent pas les tests et méthodes permettant de les identifier ou d'en quantifier les effets. La multiplicité des cibles et des effets, combiné à la possibilité d'interaction à très faibles doses et/ou à des moments particuliers du développement rend particulièrement complexe l'appréciation des actions des PE sur le vivant. Cette difficulté est encore plus évidente lorsque l'on veut en étudier les effets sur les populations naturelles dans leur environnement. Contrairement aux études en laboratoire, on ne peut que difficilement contrôler la multiplicité des facteurs interférants (facteurs physiques, physiologiques et complexité de l'exposition à de multiples composés chimiques).

La démarche adoptée dans le présent travail consiste donc à étudier un ensemble de paramètres qui peuvent s'agencer dans un tout cohérent. La première étape consiste à mettre en évidence la présence de PE dans l'environnement puis dans les organismes. Alors, différents effets sont recherchés dans les organismes vivants de l'environnement contaminés. Ces effets regroupent des actions au niveau moléculaire, cellulaire et physiologique afin d'interpréter les observations de façon logique (et selon le « poids de l'évidence »).

Parmi l'infinie variété des combinaisons composés chimiques - interactions avec un système biologique, l'attention s'est focalisée sur les composés susceptibles d'interférer avec les réponses du système endocrinien via des récepteurs hormonaux. En particulier, deux systèmes ont été retenus, le récepteur aux œstrogènes et celui aux androgènes, respectivement étudiés grâce à des systèmes de levures recombinantes YES (yeast estrogen screen) et YAS (yeast androgen screen). Deux espèces de poissons endémiques aux sites d'étude ont été aussi retenues. En effet, les populations de poissons sont des cibles particulières des PE, et le gardon (*Rutilus rutilus*) et l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*)

Programme PIREN-Seine : Perturbations endocriniennes chez les poissons

permettent d'explorer les effets de xéno-œstrogènes et xéno-androgènes au niveau moléculaire et physiologique (Jobling et al., 1998, Minier et al., 2000 ; Sanchez et al., 2008a, Katsiadaki et al., 2007).

2. Matériels et méthodes

2.1. Sites d'étude

Le bassin de l'Orge est le principal objectif des travaux. Il est décrit par ailleurs dans les rapports de l'action Piren-Seine (voir documents associés).

Le site du Réveillon à Villecresnes est situé sur un bassin versant essentiellement voué à des activités rurales et agricoles mais sur lequel les zones pavillonnaires et d'activités présentent une importante croissance depuis plusieurs années. Au niveau de la zone de prélèvement sites, le Réveillon se présente comme de petits cours d'eau de plaine qui subit une pression urbaine dense (i.e. plus de 10% de la superficie est urbanisée et la densité de population est supérieure à 200 habitants/km²) responsable de la dégradation du milieu. Le Réveillon présente des populations d'épinoches et de gardons abondantes qui explique en partie la forte dégradation du peuplement piscicole (Indice Poisson Rivière = 43,17).

Différents sites de la Seine ont été échantillonnés en 2008. Il s'agit de Villeneuve Saint Georges, Epinay sur Seine et Triel sur Seine.

2.2. Prélèvements et préparations

2.2.1. Sédiments

Les sédiments ont été prélevés parmi les 5 premiers centimètres puis lyophilisés. 3 grammes de sédiments sec ont ensuite été extraits dans 5 mL de méthanol (deux fois successivement) par sonication 30 secondes à 50 watts.

Un aliquote (400 µL) des extraits a été dissous dans de l'eau ultrapure puis extrait sur phase solide (200-mg, Waters Oasis HLB Extraction Cartridge, Milford, MA, USA) préalablement pré-conditionnée avec 3 mL de méthanol puis 3 mL d'eau ultrapure additionnée de 0,1% d'acide acétique. Les colonnes ont été éluées avec 2 fois 3 mL de méthanol qui ont été alors combinés et évaporés sous vide puis dissous de nouveau dans 1 mL de méthanol avant d'être analysés par les test YES et YAS (voir plus loin).

2.2.2. Poissons

Les gardons, (*Rutilus rutilus*), et les épinoches (*Gasterosteus aculeatus*) ont été capturés par pêche électrique. Après anesthésie, les poissons ont été mesurés et pesés. Des échantillons de sang ont été prélevés à partir de la veine caudale à l'aide d'une seringue hypodermique puis (uniquement pour les gardons) centrifugés à 5000 rpm pendant 5 min à 4°C. Les plasmas des gardons et les sangs des épinoches ont alors été conservés à -80°C jusqu'à analyse. Des échantillons de foie et de liquide biliaire ont été collectés et immédiatement congelés puis conservés à -80°C. Les gonades ont été disséquées, pesées et conservées dans du formol à 4% et pH 7,4 pour l'analyse histologique. L'indice gonadosomatique (GSI), révélateur du potentiel reproducteur des poissons, a été calculé par le rapport: poids des gonades / (poids

corporel total - poids des gonades) x 100. Chez l'épinoche, le rein a été prélevé, pesé, congelé puis stocké à -80°C avant le dosage de la spiggin.

2.2.3. Chromatographie liquide haute pression (HPLC)

Une méthode HPLC en phase inverse a été utilisée pour fractionner les extraits de sédiments et de bile de poissons. Les échantillons ont été séparés sur un système HPLC (Waters Ltd system) comprenant une pompe, un échantillonneur automatique, un système de détection spectrophotométrique (Model 996, Waters Ltd). Des standards d'oestradiol (E2), d'éthynyl-oestradiol (EE2), d'estrone (E1), de nonyl-phénol (NP), de 6- α -hydroxy estradiol, de β -estriol, de 16- α -hydroxy estrone et de bisphenol-A ont été utilisés. Des aliquotes de 100 μ L ont été injectés dans la colonne Novapak C18 (particules de 5 μ m; 250 x 4,6 mm; Waters Ltd). Les solvants de la phase mobile étaient de l'eau acidifiée avec de l'acide acétique à 0,2% (A) et de l'acétonitrile (B) dans une proportion initiale (A:B) de 69:31. La séparation a été réalisée à température ambiante sous un débit de 1 mL/min avec un gradient de solvants programmé de la façon suivante : 0 minute (69:31); 35 minutes (65:35); 50 minutes (0:100); 80 minutes (0:100). 60 fractions ont été recueillies et analysées par le test YES.

2.3. Analyses biologiques

2.3.1. Test YES et YAS

L'activité œstrogénique, liée aux composés présents a été déterminée par le test YES (yeast estrogen screen) tandis que les activités androgéniques et anti-androgéniques ont été déterminées par le test YAS (yeast androgen screen). Ces bioessais ont été validés pour la détection d'un large panel d'agonistes ou d'antagonistes des récepteurs à l'oestradiol (E2) ou à la testostérone (Routledge et Sumpter, 1996 ; 1997).

Les extraits ainsi que les blancs ont été dilués en cascade, ajoutés dans une microplaque et laissés quelques minutes à température ambiante pour que l'éthanol s'évapore. Une gamme de concentrations d'E2, d'hydroxytestostérone et de flutamide a été utilisée comme control positif. Les levures et le milieu de culture contenant du chlorophénol β -D-galactopyranoside (CRPG) ont été ajoutés dans les puits et la plaque mise à incuber pendant 3 à 5 jours. L'absorbance de chacun des échantillons a été mesurée à 540 nm, corrigée par rapport aux témoins et comparée à la courbe étalon. L'oestrogénicité mesurée a ainsi été exprimée en équivalent oestradiol (E2Eq). En accord avec les mesures publiées, la valeur moyenne effective pour l'E2 était d'environ 100 pM. L'oestrogénicité totale de chaque échantillon a alors été rapportée par unité de volume ou de masse d'échantillon.

2.3.2. Biomarqueurs

Dosage de la vitellogénine : La quantification des concentrations de vitellogénine plasmatique de gardons a été réalisée en utilisant un protocole immunochimique (ELISA) validé chez diverses espèces cyprinidés (Tyler et Sumpter, 1990). Les échantillons ont été fixés sur les parois des puits de microplaques puis incubés dans une solution contenant un anticorps polyclonal anti-vitellogénine de carpe (Biosense) pendant une heure à 37°C. Après lavage, les anticorps liés à la vitellogénine ont été révélés par incubation dans une solution contenant des anticorps anti-lapin couplés à la peroxydase puis dans une solution contenant du o-phenyl-enediamine (OPD). Le développement de couleur jaune a alors été mesuré par spectrophotométrie à 490 nm. La concentration en vitellogénine circulante chez l'épinoche a été mesurée grâce à un ELISA compétitif spécifique développé par Sanchez *et al.* (2007). Le standard utilisé pour ce dosage est de la vitellogénine d'épinoche purifiée selon une méthode chromatographique mise au point par Brion *et al.* (2000). Les anticorps sont des anticorps polyclonaux dirigés contre la vitellogénine d'épinoche (Biosense).

Dosage de la spiggin : La quantité de spiggin est déterminée dans le rein. Préalablement au dosage, les échantillons sont solubilisés dans un tampon Tris-HCl pH 8,5 100 mM, urée 8 M, β -mercaptoéthanol 200 mM, EDTA 10 mM, SDS 2 %, PMSF 0,2 mM) par chauffage pendant 2 heures dans une étuve à 105°C. Le dosage de la spiggin est réalisé par ELISA compétitif avec une préparation de reins fortement induits comme standard et un anticorps polyclonal dirigé contre une séquence peptidique propre à la spiggin de l'épinoche Sanchez *et al.*, 2008a).

Dosage de l'activité EROD : L'activité EROD hépatique est déterminée sur des fractions post-mitochondriales de foie selon la méthode spectrofluorimétrique développée par Flammarion *et al.* (1998). Le dosage qui est réalisé dans des micro-plaques noires, est basé sur la transformation, en présence de NADPH, de la 7-éthoxyrésorufine en résorufine fluorescente. La formation de la résorufine est suivie par fluorimétrie à 585 nm, avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm. La quantité de résorufine formée est déterminée contre une gamme standard de résorufine.

2.3.3. Histopathologie

Des échantillons de gonade (3 sections par gonade) ont été déshydratés par des bains successifs d'alcool puis imprégnés de paraffine (56C Shandon). Les tissus ont alors été inclus dans la paraffine puis sectionnés à 5 μ m. Les sections ont été fixées sur lames histologiques puis déshydratées, colorées par un mélange éosine/hématoxiline et montées avec de l'Histomount. Les coupes ont alors été analysées par microscopie optique.

¹ Le PMSF (Phényl Méthyl Sulfonide Fluorure) est un inhibiteur des protéases qui évite la digestion des protéines de l'échantillon par des protéases endogènes.

3. Résultats

3.1. Quantification des PE

3.1.1. *Sédiments*. Les extraits méthanoliques des sédiments ont fait l'objet d'une étude de la présence de composés agonistes ou antagonistes des récepteurs à l'œstradiol et à la testostérone (Tableau 1). Les résultats indiquent que l'activité oestrogénique est très faible et généralement inférieure au nanogramme d'équivalent œstradiol par gramme de sédiment (ngE2Eq/g). Seul le site d'Athis-Mons révèle une activité de près de 2 ngE2Eq/g qui est alors conséquente.

L'activité androgénique s'est révélée négative sur l'ensemble des extraits. L'activité anti-androgénique a été positive uniquement à Epinay et au niveau de la station d'épuration de Vaugrigneuse. Les niveaux d'activité sont cependant assez faibles.

Tableau 1 : Activité œstrogénique, androgénique et anti-androgénique des extraits méthanoliques des sédiments observés sur levures *Saccharomyces cerevisiae*. L'absence de croissance des levures dans les puits a été mesurée par absorbance à 620 nm. L'activité œstrogénique est exprimée en équivalent œstradiol (E2) par mg de sédiment extrait, l'activité androgénique est exprimée en équivalent testostérone (T) par mg de sédiment extrait, l'activité anti-androgénique est exprimée en équivalent flutamide (Flu) par mg de sédiment extrait.

Sites	Activité œstrogénique (ngE2Eq/g PS)	Activité androgénique (ngTEq/g PS)	Activité anti-androgénique (µgFluEq/g PS)
Villemoisson s/Orge	0,42	< L.D.	< L.D.
Epinay s/Orge	0,08	< L.D.	0,5
Arpajons	0,08	< L.D.	< L.D.
Limours amont	< L.D.	< L.D.	< L.D.
Limours aval	0,08	< L.D.	< L.D.
Etang Vaugrigneuse	0,42	< L.D.	< L.D.
Athis-Mons	1,83	< L.D.	< L.D.
STEP Vaugrigneuse	0,01	< L.D.	0,62

< L.D. : en dessous de la limite de détection

3.1.21. *Biles*. Les biles de gardons prélevés à Viry-Châtillon et à Poses ont été analysées pour leur potentiel œstrogénique. Les résultats montrent des niveaux d'activité conséquents et comparables sur les deux sites. Les valeurs moyennes, respectivement de 0,34 et 0,43 ng/L ($\pm 0,04$ et 0,03) indiquent une présence importante de composés œstrogéniques pour des poissons mâles.

3.2. Identification des PE

La nature des composés œstrogéniques présents dans les biles de gardons a été analysée par mesure du potentiel œstrogénique des échantillons obtenus par fractionnement HPLC. Le profil obtenu indique la présence de 3 à 4 types de composés actifs différents (Figure 2). Sur la base des temps d'éluion, le composé contribuant le plus à l'œstrogénicité est l'oestradiol (temps d'éluion 27-29 minutes). L'oestrone et l'éthinyl-oestradiol étaient aussi présents (temps d'éluion 38 et 41 minutes) tandis qu'un faible pic à 56 minutes permet de suspecter la présence d'alkyl-phénols ou de leurs dérivés.

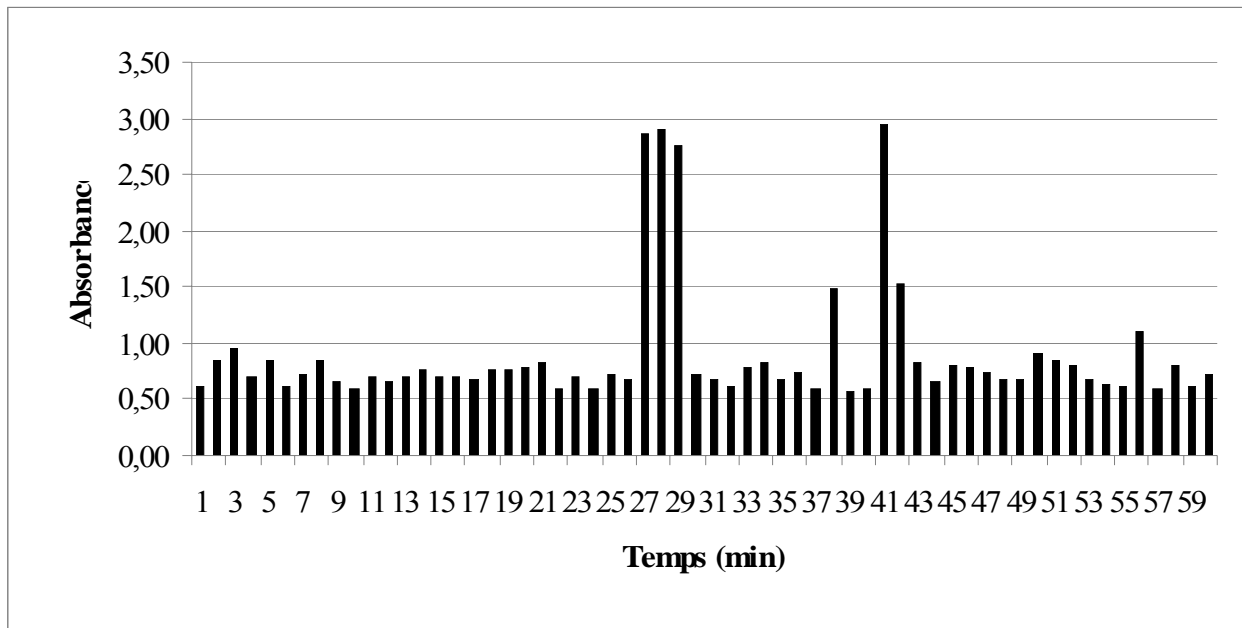


Figure 2 : Profil HPLC d'œstrogénicité de la bile de gardons prélevés à Viry-Châtillon. Sur la base des temps d'éluion, les composés œstrogéniques correspondent à l'oestradiol (E2), l'éthinyl-œstradiol (EE2), l'oestrone (E1) et des alkyls-phénols (NP).

3.2. Mesure des effets sur les poissons

3.2.1. *Epinoches*

L'activité EROD mesurée chez les épinoches est de $34,1 \pm 8,6$ pmol/min/mg de protéines. La comparaison de cette valeur aux valeurs basales définies chez cette espèce (i.e. $6,2 \pm 2,1$ pmol/min/mg de protéines, Sanchez et *al.*, 2008b) révèle une induction forte de cette activité enzymatique probablement causée par une exposition à des agonistes du récepteur des hydrocarbures aromatiques. Le dosage de la vitellogénine circulante chez les poissons mâles révèle des concentrations de $10,3 \pm 14,5$ µg/mL, une valeur qui indique une probable exposition à des composés oestrogéno-mimétiques puisque chez des poissons échantillonnés hors de la période de reproduction dans des conditions de référence, la vitellogénine n'est pas détectée (Sanchez et *al.*, 2008b). On note également l'absence d'induction de spiggin chez les épinoches femelles traduisant alors l'absence d'effet androgénique chez les poissons échantillonnés.

L'analyse histologique du tissu gonadique met en évidence la présence d'un phénomène d'intersexe chez les poissons mâles. On peut également noter la présence de nécroses et de fibroses chez les poissons femelles.

3.2.2. Gardons

Aucun gardon mâle n'a pu être prélevé sur les sites d'Epinay et de Triel. Ils n'étaient que 4 sur le site de Villeneuve-Saint Georges. Le sex-ratio, très en défaveur de mâles sur ces sites, n'a cependant que peu de sens puisque les échantillons étaient peu conséquents : respectivement, 14, 8 et 6 gardons à Villeneuve-Saint Georges, Epinay et Triel.

L'analyse histologique n'a pu montrer la présence de gardon intersexué sur les sites de la Seine mais uniquement à Viry-Châtillon (6% des mâles). Le faible nombre de mâles ne permet cependant pas de conclusion définitive.

L'analyse histologique des ovaires a mis en évidence la présence de globules lipidiques dans des ovocytes primaires à Epinay chez 50% des femelles. Cette accumulation lipidique est inédite pour des ovocytes primaires de petite taille.

La quantification de vitellogénine chez les mâles n'a pu être effectuée que pour les poissons de Villeneuve. Les résultats semblent indiquer que la contamination oestrogénique est faible sur ce site. En effet, les niveaux, bien que supérieurs à ceux d'un site de référence (Géraudie et *al.*, soumis), restent faibles (117 ng/mL) et bien inférieurs à d'autres sites de la Seine tels que Poses ou Rouen. A l'inverse le niveau mesuré à Viry-Châtillon est comparable à d'autres sites situés en aval de la Seine tels que Poses et Rouen.

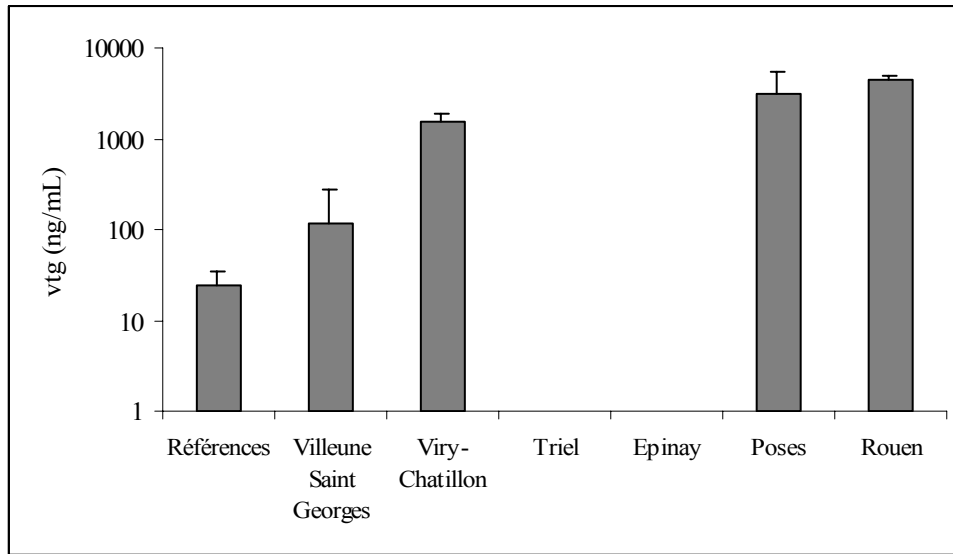


Figure 3 : Concentration de vitellogénine plasmatique (vtg) chez les gardons prélevés en différents sites

4. Conclusions

La présente étude indique que des composés œstrogéniques sont présents dans le bassin versant de l'Orge et en Seine. Ces composés sont désormais extrêmement répandus dans les eaux de surface et seraient trouvés dans 80% des échantillonnages réalisés pour peu qu'ils soient recherchés. Les concentrations trouvées dans les sédiments sont cependant assez faibles dans le bassin versant de l'Orge. Seul l'échantillon prélevé à Athis-Mons a révélé une concentration relativement conséquente et supérieure au ng par mL. Les gardons montrent cependant des capacités de bioconcentration importantes pour certains composés œstrogéniques (Smith et Hill, 2003) et les biles analysées indiquent la présence à la fois d'œstrogènes naturels (œstradiol et œstrone) et synthétiques (éthinyloestradiol) tandis que les détergents du type alkyl-phénols pourraient contribuer aux réponses mesurées.

Associée à cette présence de composés hormono-actifs, une somme d'effets très significatifs semblent perturber la physiologie des poissons. Les gardons mâles expriment de la vitellogénine, une phospholipoprotéine permettant la constitution des réserves vitellines et susceptible de limiter la fertilité des mâles qui ne peuvent facilement l'éliminer (Nash et al., 2005). Les niveaux présents à Viry-Châtillon sont importants, supérieurs au $\mu\text{g/mL}$, et similaires aux concentrations plasmatiques trouvées dans les plasmas de gardons proches de l'estuaire, à Poses. Au contraire, les concentrations mesurées à Villeneuve Saint Georges sont relativement faibles puisqu'elles sont dix fois moins fortes et seulement légèrement supérieures à celles rencontrées dans des milieux très peu contaminés (Géraudie et al., soumis). Un autre effet très significatif réside dans la présence de poissons intersexués. Bien que le nombre de ces gardons présentant des ovotestis soit faible puisque l'échantillonnage n'a pas permis d'étudier une population très

importante (au plus 16 mâles par site), leur présence indique l'occurrence de perturbations du système hormonal important pour la reproduction et le développement des vertébrés.

5. Remerciements

Les auteurs remercient toutes les personnes qui ont contribué à l'échantillonnage et en particulier les responsables de la coordination de ces opérations.

6. Références

- Brion, F., Rogerieux, F., Noury, P., Migeon, B., Flammarion, P., Thybaud, E., Porcher, J.M. 2000. Two step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mychiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Journal of Chromatography B* 737: 3-12.
- CEE. 2001.
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J. 1998. Statistical Analysis of Cyprinid Ethoxyresorufin-O-deethylase Data in a Large French Watershed. *Ecotoxicol Environ Saf* 40: 144-153.
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 2498-2506.
- Katsiadaki Ioanna, Sanders Matthew, Sebire Marion, Nagae Masaki, Soyano Kiyoshi, Scott Alexander. 2007. Three-spined stickleback: an emerging model in environmental endocrine disruption. *Environ Sci.* 14 (5):263-283.
- Minier C., Caltot G., Leboulenger F. & Hill E.M. 2000. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analusis.* 28 : 801-806.
- Routledge E.J, Sumpter J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 241-248.
- Routledge E.J, Sumpter J.P. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity *J. Biol. Chem.*, 272, 3280-3288.
- Sanchez, W. 2007. Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.) : un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. Thèse de doctorat du Muséum national d'Histoire Naturelle, 149p + annexes.
- Sanchez W., Goin C., Brion F., Olsson P.E., Goksøyr A., Porcher J.M. 2008a. A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. *Comp. Biochem. Physiol.* C147, 129-137.
- Sanchez W., Piccini B., Dítche J.-M., Porcher J.-M. 2008b. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream : implication for environmental biomonitoring. *Environment International.* 34, 791-798.