

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

Wilfried Sanchez¹, Jean-Marc Porcher¹, Perrine Maltret² 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. 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*) 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

Deux sites ont fait l'objet d'études particulières. 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).

2.2. Prélèvements

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 preconditionnée 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 redissous 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. 30 gardons ont été prélevés à Viry-Châtillon fin août 2007 tandis que 20 épinoches et 27 gardons ont été échantillonnés au mois de septembre 2007 à Villecresnes. 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.

2.3. 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 des récepteurs à l'œstradiol (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 %, PMSF1 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

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. Cependant une forte toxicité des extraits a entraîné une forte mortalité des levures. Les doses létales ont été obtenues pour des quantités de toxiques associés à moins de 20 milligrammes de sédiments (Tableau 1). La plus forte toxicité a été observée pour les extraits du site d'Épinay sur Orge où les composés associés à moins de 2 mg de sédiments ont suffi à tuer les levures. Cette toxicité est 10 fois plus forte que celle observée en amont de Limours.

Afin de limiter la toxicité des extraits, une nouvelle extraction sur phase solide a été réalisée. Les composés retenus sur colonne puis élués par le méthanol ont alors permis une évaluation de l'activité œstrogénique des extraits (Tableau 1). Les résultats indiquent que l'activité résultante 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. Ces évaluations sous-estiment certainement les concentrations réelles.

Tableau 1 : Toxicité et activité œstrogénique 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 par mg de sédiment extrait.

Sites	Concentration des extraits ayant entraîné la mortalité des cellules (µL/mL)	Concentration de sédiments ayant entraîné la mortalité des cellules (mg poids sec/mL)	Activité œstrogénique* (ngE2Eq/g PS)
Villemoisson s/Orge	6,0	18,5	0,42
Épinay s/Orge	3,0	12,0	0,08
Arpajons	12,5	37,5	0,08
Limours amont	25,0	75,0	< L.D.
Limours aval	12,5	37,5	0,08
Étang Vaugrineuse	6,0	18,5	0,42
Athis-Mons	6,0	18,5	1,83
STEP Vaugrineuse	6,0	18,5	0,01

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

* : après seconde extraction (voir matériels et méthodes)

3.2. Mesure des effets sur les poissons

3.2.1. Epinoches

L'activité EROD mesurée chez les épinoches est de $6,2 \pm 2,1$ pmol/min/mg de protéines. La comparaison de cette valeur aux valeurs basales définies chez cette espèce (i.e. $34,1 \pm 8,6$ pmol/min/mg de protéines, Sanchez et al., sous presse) révèle une induction forte² 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., sous presse). On note également l'absence d'induction de spiggin chez les épinoches femelles traduisant alors l'absence d'effet androgénique chez les poissons échantillonnés.

3.2.2. Gardons

Seule l'analyse histologique a été réalisée sur les gardons. Celle-ci s'est concentrée sur les gonades dont le développement peut être apprécié par l'indice gonadosomatique (GSI). Alors que tous les individus étaient matures et de bonne taille (215 et 197 cm respectivement à Viry-Châtillon et Villecrenes), une nette différence peut être observée entre les deux populations (Tableau 2). Le GSI des mâles prélevés à sur l'Orge n'est que de 1.8%, ce qui près de ma moitié de celui observé à Villecrenes ou dans d'autres rivières de Haute-Normandie (Minier et al., 2000). Le GSI des femelle est aussi réduit mais pas de façon significative par rapport aux données de Haute-Normandie.

Tableau 2 : Caractéristiques liées au sexe et au développement gonadiques des deux populations de gardons de Villecrenes et de Viry-Châtillon. GSI : gonado-somatic index.

Sites	GSI ♀ (%)	GSI ♂ (%)	Sex-ratio	Intersexués (%)
Viry-Châtillon	3,7 (± 0,7)	1,8 (± 0,2)	53,3	6,3
Villecrenes	6,9 (± 2,0)	3,4 (± 3,0)	25,9	14,3

² L'activité EROD maximale mesurée suite à une exposition de 72 heures à $2,7$ µM de β-naphtoflavone est de $128,2 \pm 72,9$ pmol/min/mg de protéines (Sanchez et al., 2008).

Un individu provenant de chacun des sites comportait des ovotestis. Le niveau d'intersexualité était dans chacun des cas peu sévère avec seulement quelques ovocytes au sein d'un tissu mâle. Compte-tenu du faible nombre de mâles pêchés à Villecresnes (7), le pourcentage d'intersexués est assez élevé.

Des prévalences importantes de foyers nécrotiques et d'invasions mélanomacrophagiques ont été observées chez les mâles des deux populations (Tableau 3). Dans chaque cas, au moins un individu sur quatre est touché. Chez les femelles, des foyers inflammatoires ont été visualisés chez 20% des individus de Viry-Châtillon.

Tableau 3 : Pathologies observées sur coupes histologiques chez deux populations de gardons de Villecresnes et de Viry-Châtillon.

Sites	Nécroses (%)	Mélanomacrophages (%)	Foyers inflammatoires (%)	Parasites (%)
Viry-Châtillon	25,0	25,0	21,4	0
Villecresnes	42,9	28,6	4,3	0

4. Conclusions

Le présent rapport fait état des premiers résultats d'une étude qui vise à relier la présence de contaminants à des effets sur les populations de poissons. Alors que l'objectif était de mettre en évidence la présence de perturbateurs endocriniens dans l'environnement, le fait marquant des résultats des études *in vitro* est la toxicité des extraits des sédiments prélevés. Les cultures de levures des tests YES et YAS ont été tuées rapidement par les extraits bruts. Cette toxicité a largement masqué la présence de composés hormonaux-actifs et la présence de xéno-œstrogènes n'a finalement pu être révélée qu'après extraction en phase solide. Les concentrations obtenues, souvent en-deçà du nanogramme d'équivalents œstradiol, sont vraisemblablement minorées par la « purification » des extraits.

Les biomarqueurs mesurés sur les tissus et fluides des épinoches indiquent clairement la présence d'agonistes du récepteur Ah (aryl-hydrocarbène) et du récepteur à l'œstradiol dans l'environnement des poissons. Les niveaux enregistrés, que ce soit pour l'activité EROD ou pour le taux de vitellogénine plasmatique, sont cohérents avec les observations effectuées sur ce site les années précédentes (Sanchez et al., 2008b ; Sanchez et al., sous presse) et confirment le caractère fortement contaminé de la rivière.

Les analyses histopathologiques effectuées sur les gardons confirment la présence d'effets des contaminants sur les individus. Les effets toxiques se traduisent de façon importante par les foyers

nécrotiques observés dans les gonades d'un quart des poissons mâles examinés. Les foyers mélanomacrophagiques et inflammatoires peuvent avoir une étiologie multiple. La prévalence des ces derniers chez les gardons femelles (20%) est très significative et semble en mesure de réduire la fertilité des poissons. Enfin, la présence de poissons intersexués met en évidence que des perturbateurs endocriniens contribuent à la dérégulation du système endocrinien.

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. *Analisis.* 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., Porcher J.-M. 2008b. Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, **43** (1), 65-70.
- Sanchez W., Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream : implication for environmental biomonitoring. *Environment International*. Sous presse.
- Sanchez W., Katsiadaki I., Piccini B., Ditché J.-M., Porcher J.-M. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring : a multiparametric approach. *Environment International*. Sous presse.