

Evaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens sur les milieux aquatiques (SURVAQUA)

S. AÏT-AÏSSA¹, F. BRION¹, H. BUDZINSKI³, C. CASELLAS⁵, A. DAVID⁵, J. GARRIC², O. GEFFARD², E. GOMEZ⁵, N. HINFRAY¹, C. MINIER⁶, C. MOUNEYRAC⁴, P. NOURY², O. PALLUEL¹, J-M. PORCHER¹

¹INERIS, Unité "Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*", Parc Technologique ALATA, BP 2, 60550 VERNEUIL-EN-HALATTE

²Cemagref, Laboratoire d'écotoxicologie, Lyon.

³ISM/LPTC, UMR 5255, Université de Bordeaux 1.

⁴UCO - Centre d'Étude et de Recherche sur les Écosystèmes Aquatiques, Angers.

⁵Université de Montpellier 1, UMR 5569 « Hydrosociences ».

⁶Université du Havre, Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA)

L'objectif de ce programme pluridisciplinaire était de définir et d'appliquer une démarche expérimentale permettant l'évaluation de l'impact des perturbateurs endocriniens (PE) sur les milieux aquatiques dulçaquicoles et estuariens. Cette démarche a consisté à évaluer, de manière combinée, la contamination des milieux et les effets induits *in situ* sur les organismes. Différents sites ont été sélectionnés en raison de leur typologie de contamination (agricole, urbaine, industrielle) et/ou de leur configuration particulière (amont/aval d'un site de rejet, restauration d'un milieu impacté par une STEP, etc.).

Les activités PE dans le milieu (sédiment) et dans les organismes (invertébrés, bile de poissons) ont été suivies à l'aide d'outils bio-analytiques (tests *in vitro* d'activité hormonale sur cultures cellulaires et levures) et d'analyses chimiques des micropolluants organiques et des stéroïdes sexuels. Les effets *in situ* sur les invertébrés et les poissons ont été évalués en mesurant des variables biologiques au niveau individuel (capacité de reproduction pour les invertébrés, biomarqueurs, histologie des gonades).

Principaux résultats

La plus grande partie des techniques proposées étant disponible dans un ou plusieurs des laboratoires partenaires de ce projet, les **développements méthodologiques** ont concerné plus particulièrement les invertébrés, pour lesquels, contrairement aux poissons on ne dispose que de peu d'informations sur les critères d'effets des PE.

Sur crustacés, des études au laboratoire ont permis de caractériser le cycle de reproduction des gammarus (*Gammarus fossarum*) et de développer la mesure de l'expression du gène codant pour la vitellogénine comme biomarqueur de la perturbation endocrinienne. L'intérêt de cette mesure comme marqueur d'exposition aux PE a été montré à l'aide de deux molécules modèles (nonylphénol et cyprotérone). Ces travaux seront poursuivis d'une part, pour caractériser et quantifier les protéines de réserve par une méthode analytique LC/MS/MS, et d'autre part pour évaluer le pouvoir discriminant de la vitellogénine en milieu naturel.

Sur Gastéropodes, deux cibles potentielles des PE ont été choisies : les stéroïdes et la vitelline. Trois espèces de gastéropodes ont été sélectionnées : *Potamopyrgus antipodarum*, *Valvata piscinalis* et *Lithoglyphus naticoides*. Les premiers résultats obtenus par LC-MS et RIA confirment la présence d'hormones stéroïdiennes en quantité quantifiable chez les trois espèces. Chez *P. antipodarum*, où l'on ne dispose que de femelles parthénogénétiques, la testostérone ne semble pas présente sous forme estérifiée contrairement à la progestérone qui en l'état de nos résultats se présente à 80 % sous cette forme. La prochaine étape du travail concernera la variation temporelle des concentrations hormonales sur les organismes du milieu.

Les protéines Vg-like ont été quantifiées directement par densitométrie sur gels d'électrophorèse et indirectement par les

méthodes des phosphates alkali-labiles (ALP) et des lipides liés aux protéines (PBL). Le dosage des PBL est apparu mieux adapté à la mesure de Vg-like chez les gastéropodes. Ainsi, chez *L. naticoides*, espèce sexuée et à sexes séparés, nous avons pu montrer que la teneur en PBL et le ratio PBL/ALP étaient associés à des bandes protéiques (300kD) spécifiques des œufs et des femelles. L'exposition de *P. antipodarum* et *V. piscinalis* à du bisphénol A (BPA), de l'octylphénol ou du tributylétain (TBT) a donné des résultats encourageants, qui permettent d'envisager l'utilisation des PBL et du ratio PBL/ALP comme biomarqueurs de stress de la reproduction.

Sur poissons, le travail méthodologique a consisté principalement à comparer ou à harmoniser les protocoles disponibles chez les différents partenaires (méthode de prélèvement poisson, dosage de l'EROD). Un dosage de la vitellogénine spécifique du cheveine a été développé. De plus, le dosage de l'activité aromatasase, enzyme qui catalyse la conversion irréversible des androgènes en œstrogènes, et cible potentielle pour les PE, a été développé et validé dans le cerveau et les gonades des chevaines et des gardons.

Plusieurs **études sur le terrain** ont permis d'appliquer les outils disponibles chez les différents partenaires du projet dans des contextes variés (sites dulçaquicoles et estuariens sélectionnés en raison de leur typologie de contamination ou de leur configuration particulière).

Les sédiments de l'ensemble des sites échantillonnés ont été étudiés à l'aide d'outils bio analytiques (tests *in vitro* sur cellules et sur levure, essai EROD *in vivo* sur larves de *Danio*). Des activités HAP-like et dioxin-like sont détectées et quantifiées dans tous les échantillons étudiés, suggérant une forte imprégnation du milieu par des ligands du récepteur Ah. Des différences intersites ont également été mises en évidence. A noter que les deux sites dulçaquicoles de référence sont parmi les moins actifs en termes de BaP-EQs et TCDD-EQs, ce qui conforte le choix de ces sites comme référence. Différents sites localisés en aval d'activités humaines apparaissent très actifs, comme par exemple le Rhône à Givors (pollution

industrielle et urbaine), la Deule à Don (site industriel Metal Europe), le Lez en aval de Montpellier (impacts urbains) ou la Nonette à Chantilly (impacts agricole et urbain). En milieu estuarien, certains points de la Seine et de la Loire sortent très actifs alors que le site de Port du Bec (référence) apparaît également contaminé par des composés inducteurs d'EROD. Ces résultats sont globalement confirmés par le test EROD sur larve de *Danio rerio* (à l'exception de la Drôme à Saillans qui provoque des inductions significatives dans ce test), qui se révèle donc apte à détecter la présence de substances inductrices au sein de sédiments de toute nature et origine.

Les activités œstrogéniques ont été mesurées dans les extraits de sédiment par le test MELN. Globalement, des activités comprises entre 0.03 et 2 ng d'E2 EQ/g ont été mesurées avec des différences intersites qui s'expliquent aisément par le contexte des différents sites. Les sites de référence Drôme, Lez Amont et Port du Bec sont assez peu actifs. A l'inverse, des activités plus fortes sont détectées sur des sites soumis à des pressions anthropiques comme la Nonette, la Jalle d'Eysines, le Rhône, ou encore les sites localisés en aval de Montpellier (Lez aval, lagunes de Méjean et d'Arnel). Les niveaux détectés sur les sites impactés sont du même ordre de grandeur que ceux qui ont été rapportés dans certains sites Européens, en utilisant le même type de modèle cellulaire. Aucune activité androgénique ou anti-androgénique n'a été détectée. Par contre, la mesure de l'activité aromatasase *in vitro* en présence d'extraits de sédiments des sites du Rhône, de la Jalle et de la Nonette a mis en évidence la présence de composés inhibiteurs de l'aromatasase dans les sédiments.

La comparaison avec les analyses chimiques ciblant des familles de polluants prioritaires a montré une forte contribution des HAPs dans les réponses mesurées par le test EROD. Toutefois, des analyses chimiques supplémentaires (e.g. alkylphénols, stéroïdes) seraient nécessaires afin d'identifier les polluants actifs détectés par le test MELN sur certains sites.

Deux espèces d'invertébrés ont été étudiées en milieu estuarien : *Scrobicularia plana* et *Neiris diversicolor*. Chez les bivalves, on observe une maturité sexuelle précoce dans les sites impactés. L'interprétation des résultats sur l'influence du site, du stade de maturité sexuelle et du sexe sur les niveaux en réserves énergétiques et en hormones stéroïdiennes reste complexe, toutefois, une meilleure compréhension de la reproduction de *S. plana* permettra de mieux appréhender les impacts des contaminants environnementaux. L'état de santé général et la reproduction chez *N. diversicolor* sont également affectés par le degré de pression anthropique des sites d'origine des vers.

Différents paramètres liés à la perturbation endocrinienne ont été mesurés sur deux espèces de poisson (*Rutilus rutilus* et *Leuciscus cephalus*). Les mesures d'EROD hépatique ont confirmé le caractère ubiquiste de la contamination par les HAPs et Dioxin-like déjà observé dans les extraits de sédiment. Chez les poissons mâles on observe des augmentations de la synthèse de vitellogénine, qui se révèle comme un excellent marqueur d'exposition aux œstrogènes mimétiques susceptibles de différencier les sites. L'identification de poissons intersexués a également été observée, et peut être considérée comme une manifestation frappante d'une perturbation endocrinienne touchant les organes reproducteurs même si le débat permettant de statuer sur le taux naturel d'occurrence n'est pas clos. En conclusion cette étude a permis de mettre en évidence la présence de perturbations endocriniennes chez le gardon sur les sites de Don, Poses et Coëtmiex. Sur chevaines aucun des sites étudiés n'apparaît comme exempt de poissons potentiellement exposés en particulier au regard des niveaux de vitellogénine mesurés.

La mesure de l'activité aromatase (AA), a été mise en place sur gardon et chevaine. L'activité aromatase cérébrale a été mesurée au cours de l'ensemble du cycle de reproduction du gardon et confirme le lien entre cycle de reproduction et activité aromatase cérébrale. L'AA sur les chevaines et les gardons s'est révélée être

perturbée sur différents sites. La corrélation observée entre les AA cérébrales et l'état de maturité de la gonade suggère un caractère prédictif d'effets délétères sur la reproduction du biomarqueur AA, même si en l'état actuel des connaissances, l'interprétation des résultats reste complexe.

Conclusion

Outre la mise en place d'un certain nombre d'outils d'évaluation de la contamination des milieux aquatiques par les PE (tests sur invertébrés, aromatase chez le poisson, tests *in vitro* d'activités œstrogénique et androgénique), ce programme a permis de mettre en évidence la présence d'effets PE sur un certain nombre de sites français.

Mots clefs

biosurveillance, réseau de laboratoires, effets œstrogéniques, impacts

Publications

David A., Gomez E., Aït-Aïssa S., Casellas C., Fenet H. Impact of urban wastewater discharges on sediments of a small Mediterranean river and associated coastal environment: assessment of estrogenic and dioxin-like activities, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, accepté.

Gagnaire B, Gagné F., André C., Blaise C., Abacci A., Budzinski H., Dévier MH., Garric J. 2009. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods : Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. Aquatic Toxicology, 92 : 155-167.

Mouneyrac C., Linot S., Amiard J-C., Amiard-Triquet C., Métais I., Durou C., Minier C., Pellerin J. 2008. Biological indices, energy reserves, steroid hormones and sexual maturity in the infaunal bivalve *Scrobicularia plana* from three sites differing by their level of contamination. General and Comparative Endocrinology, 157, 133-141.

Mouneyrac C., Perrein-Ettajani H., Amiard-Triquet C. The use of fitness, reproduction and burrowing behaviour of the polychaete *Nereis diversicolor* in the assessment of estuarine sediment quality. Environmental Pollution, accepté.

Hinfray N., Palluel O., Piccini B., Sanchez W., Aït-Aïssa S., Noury P., Gomez E., Geraudie P., Minier C., Brion F., Porcher J.M. 2010. Endocrine disruption in wild population of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. Science of Total Environment. 408, 2146-2154.