

Université de Nantes  
UFR de Pharmacie

**Ecole Doctorale VENAM**

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**Evaluation de la contamination de l'estuaire de la Loire  
par des perturbateurs endocriniens:  
un risque potentiel pour la reproduction d'une espèce en danger: l'anguille Européenne  
(*Anguilla anguilla* L.) ?**

THESE DE DOCTORAT

Discipline: Pharmacie- Spécialité: Ecotoxicologie

*présentée et soutenue publiquement par*

**Isabelle Blanchet-Letrouvé**

*le: 23 Septembre 2014 devant le jury ci-dessous*



- Président:** Professeur Jean LAROCHE, Université de Brest.
- Rapporteurs:** Professeur Eric FEUNTEUN, Muséum National d'Histoires Naturelles. Directeur du Centre de Recherche et d'Enseignement sur les Systèmes COTiers, Dinard.  
Professeur Laure GIAMBERINI, Université de Lorraine, Metz.
- Examineurs:** Monsieur Noël MATHIEU, Ingénieur Général de l'Agence de l'Eau, Orléans/ DREAL.
- Invités:** Monsieur Pierre ELIE, Chercheur IRSTEA (en retraite). Cestas.  
Mme Sylvie DUFOUR, Directrice de l'Unité du Muséum National d'Histoires Naturelles, Paris.
- Directrice de thèse:** Professeur Catherine MOUNEYRAC, UCO, Angers.  
**Co-directrice de thèse:** Professeur Christine HERRENKNECHT, Université de Nantes.  
**Co-encadrante:** Maitre de Conférence Laurence POIRIER, Université de Nantes.



*Evaluation de la contamination de l'estuaire de la Loire en Perturbateurs Endocriniens*

*A la liberté d'être soi...*

*A ma liberté d'Etre,...et d'être.*



# *REMERCIEMENTS*

*En toute simplicité et toute humilité*

## *MERCI*

*Afin d'éviter toute hypocrisie, j'ai choisi des remerciements par ordre alphabétique, dans toute la neutralité et l'objectivité qu'il impose.*

*Il permet en outre de s'affranchir du drame archaïque et de la légitimité fictive de l'ordre numérique.*

*Au delà de cet ordre, alphabétique, moral et hiérarchique, je me glisse à l'ombre de ce mot reconfortant pour y retrouver solidarité, professionnalisme, amitié, humanité et loyauté, distillés sans calcul par toutes mes rencontres au cours de ces quelques années de vie, indélébiles.*

## *MERCI*

*Mot intemporel, immortel, modulable en intensité, ponctuation de la vie, indémodable, indéformable mais suffisamment élastique pour y loger toutes les intonations...même les plus sarcastiques.*

*MERCI, message chargé de sens, de contre-sens et de non-sens mais jamais à sens unique.*

*J'éviterais donc les mercis polis, formatés, guindés, fâchés, frustrés, intéressés, usés ou démesurés, pour me recentrer sur les mercis colorés, libérés, amicaux, loyaux et enthousiastes.*

## *MERCI à VOUS*



**Amiard Jean- Claude** (Directeur de recherche CNRS en Ecotoxicologie, MMS, accompagnateur de terrain pour certains prélèvements sédimentaires en estuaire de Loire)

**Amiard-Triquet Claude** (Directrice de recherche CNRS en Ecotoxicologie, une rencontre décisive pour les premiers pas de cette thèse; deux passionnées, deux enthousiastes, ...)

**Association des pêcheurs de Loire**, un partenariat indissociable de ce travail car porteur de projet, très investi dans la partie technique de cette thèse en la présence de **Didier Masset, Yannick Perreau, Nathalie Porcher, Louis Vilaine Bruno Yvaniouk, Régis Blandin, et Gaëtan Bonnet**, sans oublier l'allier de nos pêches nocturnes, le Davy. Une réelle envie de "ponter" chercheurs et professionnels de la pêche, avangardistes en la matière.

**Aumaille Odile**, Facultés des Sciences, ma formatrice privilégiée à l'histologie, réalisation et coloration de coupes, et un investissement colossal dans la réalisation des coupes de gonades de flets!, sans oublier une bienveillance chaleureuse bien agréable.

**Baloche Sylvie**, MNHN Paris, technicienne de laboratoire, formatrice patiente et bienveillante en biologie moléculaire et en particulier dans l'apprentissage de la technique pointue de q RT PCR.

**Couderc Mickael**, un binôme bienvenu dans le travail des dissections et le partage de ce vaste sujet, une coloration masculine indéniablement salvatrice dans cette environnement très féminin!

**DREAL**, Direction Régionale de l'Environnement Aquatique et littoral, un ensemble de professionnels ressource disponible dans mes investigations sur les contaminants en Loire.

**Dufour Sylvie**, Directrice de recherche, MNHN Paris, un accueil chaleureux, une disponibilité sans faille, des encouragements sincères et un professionnalisme et un humanisme exemplaires. Une valorisation de mon travail sans cesse renouvelée et très réconfortante pour aider à vaincre mes angoisses...

**Elie Pierre**, Directeur de recherche à l'IRSTEA, Bordeaux, mon professeur particulier à l'extraction, l'inclusion, la coloration, le ponçage et la lecture des otolithes d'anguilles, sans faille dans ces encouragements et sans réserve dans la communication de ses passions: recherche et poissons.

**Feunteun Eric**, Professeur du Museum National d'Histoires Naturelles, station marine de Dinard (CRESCO), une rencontre et des échanges fructueux lors de l'Assemblée Générale de l'Association des Pêcheurs de Loire, membre du jury de cette thèse en tant que rapporteur.

**Fleurence Joel**, Directeur adjoint de l'Ecole Doctorale, Université de Nantes, un accueil positif de recherche, malgré le défi de l'âge, et quelques dissonances...

**Fossi-Tankoua Olivia**, doctorante à l'époque et maintenant Docteur, une amitié et des conseils avisés dans les moments difficiles de ce travail.

**Giamberini Laure**, Professeur des Universités, Laboratoire interdisciplinaire des environnements continentaux, Metz, une rencontre lors du congrès de la SETAC de Milan, un petit air de nostalgie puisque j'ai effectué mon DEA en Ecotoxicité à l'Université de Metz, membre du jury de cette thèse en tant que rapporteur

**Gorraguer Marie-Odile**, DTM (Direction des Territoires et de la Mer) de Loire-Atlantique, une personne ressource disponible et professionnelle dans mes investigations sur les contaminants en Loire.

**Herrenknecht Christine**, Professeur en Chimie, Université de Pharmacie, une co-directrice de thèse soucieuse de la rigueur écrite de ce travail, présente dans les moments difficiles de cette thèse.



**Kamari Abderrahman**, Ingénieur laboratoire, investi dans les analyses en HPLC et chromatographie.

**Laroche Jean**, Professeur des Universités, Université occidentale de Brest, un accueil ouvert et dynamique dans son laboratoire pour un apprentissage de la dissection du flet, des échanges scientifiques fructueux dans un cadre exceptionnel, membre du jury de cette thèse en tant qu'examineur.

**Le Bizec Bruno**, Directeur de l'ONIRIS-LABERCA et Professeur, un accueil agréable dans son laboratoire, des propositions toujours intéressantes lors des comités de pilotage de ce travail, des encouragements toujours à propos et bien venus dans les moments de doute...

**Letrouvé-blanchet**, ma tribu, pour lesquels les sacrifices ont été sans doute les plus pesants, d'un côté comme de l'autre, et qui m'ont appris, une fois de plus, l'ART de conjuguer et de jongler entre "mes" différentes missions!!

**Lycée Jacques Prévert**, Savenay, des collègues aux élèves pour lesquelles j'ai pu parfois avoir moins de patience et de disponibilités, (surtout dans les corrections "tardives" de copies!...) en passant par ma hiérarchie pour leur acceptation d'emplois du temps quelquefois modifiés.

**Mathieu Noël**, Ingénieur Général des Ponts, des Eaux et des Forêts, ancien Directeur Général de l'Agence de l'eau Loire Bretagne, Chargé de mission à l'Inspection Générale et Territoriale 3 Ouest au Ministère chargé de l'écologie, dont la présence en tant qu'examineur honore mon jury de thèse

**Minier Christophe**, Directeur de recherche, Professeur, Université du Havre, membre de mon comité de pilotage, toujours intéressé par le sujet des Perturbateurs Endocriniens!

**Mouneyrac Catherine**, Directrice de recherche IBEA, Professeur, UCO d'Angers, Directrice de ce travail de thèse, un apprentissage à la rédaction spécifique des publications et un réel professionnalisme, soucieuse de la finalisation de ce travail, sans laquelle la thèse n'aurait pu se poursuivre dans les moments délicats.

**Poirier Laurence**, co-encadrante de thèse, maitre de conférence, "chatouilleuse" de combativité pour me donner envie et courage à finaliser ce travail, sans jamais pratiquer la politique du jugement. Une efficacité, une pertinence et une loyauté professionnelles et surtout des échanges très fructueux dans la construction de cette thèse et des publications correspondantes. Sans aucun doute, celle qui y a cru le plus...entre cafés et chocolats! Une amitié à jamais...

**Pouchus Jean-François**, directeur de MMS, Université de Nantes, un accueil positif dans son unité de recherche, malgré le défi de l'âge et des remises à niveau nécessaires!

**SMIDAP**, Syndicat Mixte Interprofessionnel organisme de la région, en la présence de **Erwan Le Floch**, une oreille attentive et professionnelle sur nos projets.

**Vénisseau Anaïs**, Responsable adjointe Unité Contaminants au LABERCA- ONIRIS.

**Vergnoux-Zalouk Aurore**, un coin de bureau, des PCBs et autres HAPs, et voilà que se tricotent des fils intergénérationnels qui illuminent les journées de doute. Allier efficacité et plaisir dans le travail, la clé de la réussite?...

**L'ensemble de l'équipe MMS** pour le prêt de matériels, de salles, nécessaires aux dissections, à l'inclusion du matériel biologique, des photographies en microscopie photonique, à l'extraction des lipides...et tous les encouragements de couloirs!

**L'équipe de l'INERIS** en la personne de **Sélim Haït -Aïssa**.



# SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>4</b>
<b>SOMMAIRE</b>	<b>7</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>13</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>14</b>
<b>LISTE DES PHOTOGRAPHIES</b>	<b>15</b>
<b>LISTE DES IMAGES</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>18</b>
<b>AVANT PROPOS</b>	<b>19</b>
<b>CONTEXTE DE L'ETUDE</b>	<b>23</b>
<i>Présentation des objectifs et études envisagées</i>	<b>24</b>
<i>I/- Les perturbateurs endocriniens : Définition, sources et mécanismes d'action</i>	<b>30</b>
<b>1. Les Perturbateurs endocriniens: une définition en constante évolution</b>	<b>30</b>
<b>2. Le système endocrinien et les Vertébrés</b>	<b>32</b>
2.1. La spécificité de la fonction endocrine liée à la reproduction.	33
2.2. Les stéroïdes hormonaux	34
2.3. Spécificité de la fonction endocrine reproductive chez les poissons Téléostéens	38
2.4. Un cas très original: l'anguille européenne " <i>Anguilla anguilla</i> "	40
<b>3. Les Perturbateurs Endocriniens: origines et sources potentielles d'exposition</b>	<b>43</b>
3.1. Des espèces chimiques fortement rémanentes: les Polychlorobiphényles ou PCBs	44
3.1.1. Structure physico-chimique des PCBs	44
3.1.2. Principales sources de PCBs	45
3.2. Les Polychlorodibenzo-dioxines (PCDD) et Les Polychlorodibenzo-furanes (PCDF)	48
3.2.1. Structure physico-chimique des PCDD et PCDF	48
3.2.2. Principales sources de PCDD et PCDF	49
3.2.3. Propriétés physico-chimiques	49
3.3. D'autres perturbateurs endocriniens potentiels: les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	51
3.3.1. Structure physico-chimique des HAP	51
3.3.2. Principales sources de HAP	54
<b>4. Les Perturbateurs endocriniens: quels modes d'action ?</b>	<b>57</b>



4.1. Les récepteurs en jeu	58
4.1.1. Les récepteurs des oestrogènes (ER)	60
4.1.2. Les récepteurs des androgènes (AR)	61
4.1.3. Les récepteurs des dioxines (AhR)	61
4.2. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires	63
4.3. Autres voies suspectées	66
4.3.1. Influence du parasitisme	66
4.3.2. Influence des évènements hypoxiques	67
<b>II/- Les perturbateurs endocriniens et l'évaluation du risque pour l'environnement: quels outils?</b>	<b>69</b>
<b>1. Des analyses chimiques spécifiques et quantitatives.</b>	<b>71</b>
1.1. De la colonne d'eau	71
1.2. Des sédiments et des particules sédimentaires	71
1.3. Du biota	72
<b>2. Des marqueurs biologiques et biochimiques. de l'organisme à la molécule</b>	<b>73</b>
2.1. Des biomarqueurs à l'échelle macroscopique.	73
2.1.2. Des indices biométriques	74
2.1.3. Des altérations de l'appareil reproducteur	74
2.2. Des biomarqueurs à l'échelle cellulaire	75
2.2.1. Hépatohistologie	75
2.2.2. Gonadohistologie	75
2.3. Des biomarqueurs à l'échelle moléculaire	76
2.3.1. Une lipoprotéine spécifique des femelles matures: la vitellogénine	76
<b>2.3.1.1. Définition et propriétés de la vitellogénine (Vg).</b>	76
<b>2.3.1.2. Variation de la concentration plasmatique de Vg et exposition à des contaminants</b>	77
<b>2.3.1.3. Induction et quantification des ARN m de la Vg</b>	77
2.3.2. Une enzyme indispensable à la synthèse d'oestrogènes: l'aromatase	78
<b>2.3.2.1. Définition et propriétés de l'aromatase</b>	78
<b>2.3.2.2. Induction et quantification de l'aromatase</b>	79
<b>3. Des bioessais: tests cellulaires <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i></b>	<b>79</b>
3.1. Des tests de bio-analyse <i>in vitro</i>	79
3.2. Des tests de criblage <i>in vivo</i>	80
<b>4. La présence de PE: quels traitements ou remédiations possibles ?</b>	<b>84</b>
4.1. En ce qui concerne les PCB	84
4.2. En ce qui concerne les HAP et leurs métabolites	85
4.3. En ce qui concerne d'autres perturbateurs endocriniens au sens large.	86



<b>III/ Les perturbateurs endocriniens en milieu aquatique, une exposition avérée et des effets tangibles?</b>	<b>90</b>
1. Les estuaires, des écosystèmes synaptiques anthropisés	90
1.1. Des généralités hydrodynamiques et sédimentaires	90
1.2. Des comparaisons inter estuariennes	91
<b>2. L'estuaire de la Loire, une exposition potentielle à des perturbateurs endocriniens?</b>	<b>93</b>
2.1. Un état des lieux	93
2.2. Un fonctionnement dynamique spécifique	95
2.3. Interactions entre les différents compartiments écosystémiques en jeu	100
<b>3. Comportements et devenir des Perturbateurs Endocriniens dans les écosystèmes aquatiques</b>	<b>105</b>
3.1. En ce qui concerne les PCB:	105
3.2. En ce qui concerne le comportement des HAP en milieu aquatique, l' influence de la matrice sédimentaire	108
3.3. En ce qui concerne la biodisponibilité des HAP chez les poissons	111
3.4. En ce qui concerne la bioaccumulation des HAP chez les poissons: écotoxicologie	112
<b>4. L' espèce sentinelle retenue : L'anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i></b>	<b>114</b>
4.1. L'anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i> : un cycle de vie et une biologie hors du commun	114
4.2. Une espèce sémelpare en danger	120
4.3. Les effets des contaminants sur l'anguille européenne:	122
4.4. Une stratégie de préservation en cours	123
<b><i>PARTIE 2</i></b>	<b>125</b>
<b><i>STRATEGIE DE RECHERCHE</i></b>	<b>125</b>
<b><i>I. INTRODUCTION</i></b>	<b>126</b>
<b><i>II. Approche de la zone d'étude</i></b>	<b>126</b>
1. Méthode d'investigation	126
2. Les différents sites d'échantillonnage sédimentaires	127
3. Définition de la zone d'étude, la zone de balancement des marées de l'estuaire de la Loire	128
<b><i>III/ Des sédiments estuariens potentiellement exposés par des contaminants de type PE</i></b>	<b>130</b>
1. Méthodologie des prélèvements de sédiments en estuaire de Loire.	131
2. Lyophilisation des sédiments	131
3. Evaluation de la présence de perturbateurs endocriniens à partir de tests sur lignées cellulaires	133
3.1. Préparation des échantillons par Accelerated Solvent Extraction (ASE)	133



3.2. Tests in vitro sur cultures cellulaires	135
3.2.1. Culture cellulaire et tests des échantillons	136
3.2.2. Préparation du test luciférase	137
3.2.3. Préparation des cellules	138
3.2.4. Préparation des solutions	138
3.2.5. Tests ICI et préparation des solutions	139
<b>4. Identification et quantification des contaminants analysés dans les sédiments</b>	<b>139</b>
4.1. Extraction des sédiments lyophilisés à l'ASE 350	140
4.1.1. Extraction des HAP	141
4.1.2. Préparation des extraits à analyser	141
4.2. Analyse des extraits sédimentaires par HPLC-Fluo	142
4.2.1. Matériel utilisé	142
4.2.2. Paramètres de l'analyse en HPLC-Fluo	142
4.2.3. Analyse des HAP par HPLC-Fluo	143
<b><i>IV- Une imprégnation potentielle des organismes ligériens en PE</i></b>	<b>145</b>
<b>1. Choix et échantillonnage de l'espèce sentinelle sur la zone d'étude</b>	<b>145</b>
<b>2. Paramètres biologiques des organismes échantillonnés</b>	<b>145</b>
2.1. Biométrie de l'espèce sentinelle par site	145
2.2. Infestation par le parasite <i>Anguillicola crassus</i>	147
2.3. Estimation de l'âge des organismes par otolithométrie	148
2.4. Histologie gonadique	149
2.4.1. Extraction des gonades	149
2.4.2. Réalisation et observation des coupes histologiques	150
Suite aux trois coupes réalisées en duplicat, et positionnées en histocette dans le liquide de Bouin, les coupes sont déshydratées et incorporées dans la paraffine.	150
<b>3. Les contaminants analysés dans les matrices biologiques .</b>	<b>151</b>
3.1. Extraction et quantification des PCB et des PCDD/F	151
<b>4. Des biomarqueurs d'effets de perturbation endocrine</b>	<b>152</b>
4.1. Une lipoprotéine de la maturité sexuelle femelle : la vitellogénine (Vg)	153
4.2. Une enzyme nécessaire à la synthèse d'oestrogènes en androgènes: l'aromatase	153
4.3. Un outil performant et hautement sensible ( qRT PCR)	154
4.3.1. Principe général de la PCR quantitative en temps réel : q RT PCR	154
4.3.2. Préparation des échantillons	154
4.3.3. Extraction des ARN totaux de tissus hépatiques d'anguilles	155
L'extraction des ARN totaux se réalise selon la technique au Trizol (phénol + isocyanate de guanidine).	155
4.3.4. Détection et quantification des produits amplifiés au cours de la réaction de polymérisation	156



<b>PARTIE 3</b>	<b>159</b>
<i>Des sédiments potentiellement contaminés par des Perturbateurs Endocriniens</i>	<b>159</b>
<b>I-INTRODUCTION</b>	<b>160</b>
<b>II. Sédiments estuariens et résultats physico-chimiques</b>	<b>161</b>
1. Granulométrie des échantillons	<b>161</b>
2. Composition en carbone organique total (COT)	<b>162</b>
<b>III- Sédiments et contamination potentielle à des perturbateurs endocriniens</b>	<b>163</b>
1. Une activité oestrogénique	<b>167</b>
2. Une activité anti-androgénique	<b>167</b>
4. Une activité dioxine-like	<b>168</b>
<b>PARTIE 4</b>	<b>173</b>
<i>Imprégnation des muscles d'anguilles européennes par les Polychlorobiphényles, corrélations avec les paramètres biométriques</i>	<b>173</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>174</b>
<b>II. Tendances paramétriques de la fraction de population échantillonnée en estuaire de Loire</b>	<b>176</b>
1- Des descripteurs biométriques	<b>176</b>
2- Une imprégnation globale en PCB	<b>179</b>
<b>III. Article 1 "Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (<i>Anguilla anguilla</i>) from the Loire estuarine continuum. Spatial and biological variabilities" in <i>Science of the Total Environment</i></b>	<b>181</b>
<i>En conclusion</i>	<b>192</b>
<b>PARTIE 5</b>	<b>195</b>
<i>Des effets potentiels des contaminants sur la fonction de reproduction chez <i>Anguilla anguilla</i></i>	<b>195</b>
<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>196</b>



<i>II. Article 2 "Vg mRNA induction in an endangered fish species (Anguilla anguilla) from the Loire Estuary (France)" paru dans Ecotoxicological and Environmental Safety</i>	<b>198</b>
<i>III- Article 3 " Fate of PCBs during development and sexual maturation of European eel. correlations between contaminant levels and reproduction parameters.(Anguilla anguilla),</i>	<b>212</b>
<i>Conclusion</i>	<b>245</b>
<i>PARTIE 6</i>	<b>248</b>
<i>CONCLUSIONS et PERSPECTIVES DE RECHERCHE</i>	<b>248</b>
<i>I- Conclusion générale</i>	<b>249</b>
<i>II- Perspectives de recherche</i>	<b>253</b>
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	<b>260</b>
<i>ANNEXES</i>	<b>283</b>



## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1. Cycle de vie catadrome de l'anguille européenne "Anguilla anguilla "</i>	26
<i>Figure 2. Une vision théorique des relations entre pertinence écologique et réponses de biomarqueurs à l'induction par des contaminants. Adapté et modifié de Adams et al.; (1989).</i>	26
<i>Figure 3. Structures chimiques comparatives des hormones stéroïdiennes et de leur précurseur, le cholestérol</i>	34
<i>Figure 4. Biosynthèse des Stéroïdes à partir du cholestérol (adapté de Sciencebio.com)</i>	35
<i>Figure 5. Réaction d'aromatisation de la testostérone en œstradiol sous l'action du cytochrome P450 ou aromatasase.</i>	36
<i>Figure 6. Schéma d'action d'une Hormone stéroïde ou d'un xénoestrogène mimétique via des récepteurs. Activation illégitime de la voie de signalisation du RE (récepteur des œstrogènes) par le récepteur de la dioxine activé (d'après Massaad et Barouki, 1999)</i>	36
<i>Figure 7. Axe gonadotrope de la fonction de reproduction chez les poissons Téléostéens. Schéma modifié et adapté (d'après M. Legendre et B. Jalabert)</i>	39
<i>Figure 8. Cycle de vie de l'anguille européenne "Anguilla anguilla L." (d'après Schmidt, 1992; Klecker and Mc Cleave, 1985).</i>	40
<i>Figure 9. Position des atomes de chlore dans la molécule de PCB</i>	44
<i>Figure 10. Propriétés physico-chimiques et usages industriels des PCB</i>	45
<i>Figure 11. Structure chimique des dioxines (2,3,7,8-tétrachloro-1,4-dioxine (TCDD)) et des dibenzofuranes</i>	48
<i>Figure 12. Propriétés physico-chimiques et usages industriels des PCDD/Furanes</i>	49
<i>Figure 13. Propriétés physico-chimiques et origines industrielles des HAP</i>	52
<i>Figure 14. Synthèse des groupes de composés chimiques susceptibles d'induire entraînant une perturbation endocrine..et de leurs origines respectives,</i>	56
<i>Figure 15. activation illégitime des récepteurs à des ligands endogènes par des facteurs environnementaux, d'après (Massaad and Barouki 1999)</i>	59
<i>Figure 16. Activation illégitime de la voie de signalisation du RE (récepteur des oestrogènes) par le récepteur de la dioxine activé (d'après Massaad et Barouki, 1999).</i>	62
<i>Figure 17. Mécanisme des xénoestrogènes face aux oestrogènes endogènes dans une cellule</i>	65
<i>Figure 18. Synthèse des sources potentielles d'exposition à des PE, mécanismes d'action connus ou suspectés en jeu. Légendes: Récepteurs: Rcpt; Effets induits;</i>	68
<i>Figure 19. Schématisation de la synthèse des oestrogènes à partir du cholestérol dans la glande surrénale.</i>	78
<i>Figure 20. Variabilité des réponses d'un même contaminant, en fonction du compartiment dans lequel il évolue (air, eau, sédiments, biota), de la matrice dans laquelle il est analysé, et en fonction des autres substances en présence.</i>	83
<i>Figure 21. Couplages interactifs des compartiments biochimiques et écosystémiques au sein de l'estuaire de la Loire; chaque étoile représente un contaminant de type perturbateur endocrinien, plus ou moins toxique.</i>	89
<i>Figure 22. Evolution de la population en Loire Atlantique. Source : Insee - modèle Omphale (scénario central)</i>	94



<i>Figure 23. Synthèse des interactions théoriques au sein d'un système estuarien dynamique</i>	102
<i>Figure 24. Propriétés physico-chimiques des contaminants agissant sur leur potentiel de bioaccumulation adapté de (Norstrom and Letcher 1996)</i>	106
<i>Figure 25. Mécanismes de contamination et de dépuraction au niveau d'un organisme, adapté de (D. Mackay and A. Fraser 2000).</i>	107
<i>Figure 26. Aire de répartition de l'anguille européenne (A.a L. 1758), adaptée de Germain (1927) pour l'aire continentale et SCHMIDT (1924) pour la répartition océanique des larves.</i>	118
<i>Figure 27 : Zone de prélèvement des sédiments et des organismes cibles : de St Nazaire à Varades, 100 km correspondant à la zone estuarienne.</i>	132
<i>Figure 28. Principe du test sur lignées cellulaires à partir d'un extrait sédimentaire</i>	136
<i>Figure 29. Matériel d'extraction et d'analyse des sédiments</i>	140
<i>Figure 30 : Identification des HAP, de leur temps de rétention et couples de longueurs d'onde utilisés</i>	144
<b>Figure 31. Synthèse de la stratégie scientifique adoptée pour répondre à la problématique globale</b>	<b>Erreur !</b>
<b>Signet non défini.</b>	
<i>Figure 32. Méthologie des tests cellulaires réalisés sur les différents extraits sédimentaires.</i>	160
<i>Figure 33. Granulométrie des sédiments prélevés au niveau des 12 sites échantillonnés ( Estuaire de Loire)</i>	161
<i>Figure 34. Pourcentage en Carbone Organique Total (COT) des sédiments prélevés au niveau des 12 sites échantillonnés</i>	162
<i>Figure 35. Pourcentage en COT des sédiments prélevés sur les 11 sites échantillonnés (absence du site témoin positif)</i>	162
<i>Figure 36. Activités cellulaires des sédiments</i>	166
<i>Figure 37. Teneurs en HAP exprimées en ng/g PS (bleu) et ng/mg de COT (rouge) dans les différents sites de prélèvement.</i>	170
<i>Figure 38. Cartographie des classes de tailles des anguilles en fonction des sites échantillonnés (Varades en amont, Nantes en situation intermédiaire et St Nazaire, en aval)</i>	176
<i>Figure 39. Relation taille (cm) - poids (en g) de l'ensemble des anguilles échantillonnées (de Mai 2009 à Novembre 2010)</i>	177
<i>Figure 40. Estimation de la fréquence des sexes le long de l'estuaire de la Loire</i>	178
<i>Figure 43. Relation poids frais des échantillons d'anguilles en fonction de la matière grasse présente dans les muscles (n=65)</i>	179
<i>Figure 42. Niveaux de contamination des anguilles échantillonnées en PCBdl en <math>ng.g^{-1}</math> de poids frais (PF), en fonction du sexe et des stades de développement</i>	193
<i>Figure 43. Evolution de l'expression de l'aromatase hépatique en fonction du rapport gonado-somatique (IGS), en U.A.</i>	210

## LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1. Tableau récapitulatif des principales données physico-chimiques concernant le pyrène</i>	53
--	----



Tableau 2: Structure chimique des HAP définis comme polluants prioritaires par l'US EPA	53
Tableau 3: Caractéristiques des sites échantillonnés et STEU correspondantes: quantité et qualité des effluents, vétusté des installations, respect des normes européennes, capacité en équivalent/habitant	128
Tableau 4: protocole utilisé pour l'extraction en ASE des sédiments (INERIS, 2009).	133
Tableau 5 : Paramètres du RapidVap utilisés pour l'évaporation des extraits sédimentaires (INERIS, 2009).	134
Tableau 6 : protocole utilisé pour l'extraction en ASE des sédiments dans l'objectif de la détermination des teneurs en HAP.	141
Tableau 7 : Gradient d'éluion utilisé pour l'analyse des HAP	143
Tableau 9: Données biométriques des anguilles échantillonnées (site de Varades); Mai 2009- Novembre 2010.	284
Tableau 10: Données biométriques des anguilles échantillonnées (site de Nantes); Mai 2009- Novembre 2010.	285
Tableau 11: Données biométriques des anguilles échantillonnées (site de Cordemais)	286

## LISTE DES PHOTOGRAPHIES

Photographie 1: Larve leptocéphale d'anguille européenne; IFREMER.	115
Photographie 2: Civelles stade II pêchées en entrée d'estuaire de Loire (Janvier 2012).	115
Photographie 3: Femelle d'anguille européenne en cours d'argenture (Anonyme)	116
Photographie 4: Matériel utilisé lors de l'extraction par ASE	135
Photographie 5: Biométrie d'une anguille (longueur en cm) le long d'une toise en bois.	146
Photographie 6: Dissection d'une anguille européenne et extraction des organes après biométrie.	146
Photographie 7: Vérification de l'état parasitaire de la vessie natatoire; infestation par le nématode <i>Anguillicola crassus</i>	147
Photographie 8: Extraction des otolithes depuis la tête d'une anguille. Cliché I. Blanchet-Letrouvé	148
Photographie 9: Dissection des gonades chez un individu femelle; masse blanchâtre très allongée, accolée au muscle et lobulée. Cliché. I. Blanchet-Letrouvé	149
<b>Photographie 10:</b> Observation microscopique de coupes histologiques de gonade femelle au microscope optique (oocytes de 100 $\mu$ environ). Clichés (I. Blanchet-Letrouvé)	150
Photographie 11: Matériel utilisé pour la q RT PCR. A: Thermocycler Biométra, dans lequel est inséré le portoir circulaire (B) contenant l'ensemble des capillaires en verre où les dilutions ont été déposées. C: suivi informatique instantané de l'évolution du run au cours des 40 cycles de polymérisation, pour l'ensemble des échantillons en duplicat. (Museum National d'Histoires Naturelles, Paris); Clichés: I. Blanchet-Letrouvé.	158
Photographie 12: Gonade mâle en cours de maturation sexuelle	254



## LISTE DES IMAGES

<i>Image 1. Zone d'étude aval, de l'embouchure de l'estuaire (St Nazaire)</i>	96
<i>Image 2. Partie centrale de la zone d'étude, (amont et aval de Paimboeuf)</i>	97
<i>Image 3. Estuaire interne, où le réseau hydraulique est plus complexe, la pente du lit beaucoup plus raide.</i>	97
<i>Image 4. Visualisation générale de la zone d'étude estuarienne, de l'embouchure (St Nazaire, aval) à la limite de remontée dynamique des eaux salées (Varades, amont)</i>	129
<i>Image 5. Observation microscopique d'un otolithe d'anguille. Cliché Mouneix, (1981).</i>	148



## Liste des publications

Blanchet-Letrouvé I., Lafont A.G., Poirier L., Baloché S., Zalouk-Vergnoux A., Dufour S., Mouneyrac C. (2013). Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 103–113.

Blanchet-Letrouvé I., Zalouk-Vergnoux A., Vénisseau A., Couderc M., Le Bizec B., Elie P., Herrenknecht C., Mouneyrac C., Poirier L. (2014). Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum : spatial and biological variabilities. *Science of the Total Environment*, 472, 562–571.

Blanchet-Letrouvé I., Couderc M., Zalouk-Vergnoux A., Elie P., Herrenknecht C., Dufour S., Le Bizec B., Mouneyrac C., Poirier L. (2014). Fate of PCBs during development and sexual maturation of European eel: correlations between contaminant levels and reproduction parameters. *Aquatic toxicology*, soumise.

## Liste des communications

**Contamination estimation of Loire estuary by Endocrine Disruptors**". Paris. Février 2011.

Blanchet-Letrouvé I.<sup>1</sup>, Fossi Tankoua O.<sup>1</sup>, Poirier L.<sup>1</sup>, Aït-Aïssa S.<sup>2</sup>, Budzinski H<sup>4</sup>, Herrenknecht C.<sup>1</sup>, Mouneyrac C.<sup>1</sup>.

**Evaluation of the contamination of the Loire estuary by EDCs**". SETAC Europe. Milan. Mai 2011.

Blanchet-Letrouvé I.<sup>1</sup>, Fossi Tankoua O.<sup>1</sup>, Poirier L.<sup>1</sup>, Aït-Aïssa S.<sup>2</sup>, Budzinski H<sup>4</sup>, Herrenknecht C.<sup>1</sup>, Mouneyrac C.<sup>1</sup>.

**Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum. spatial and biological variabilities** .PRIMO; FARO. Mai 2013.

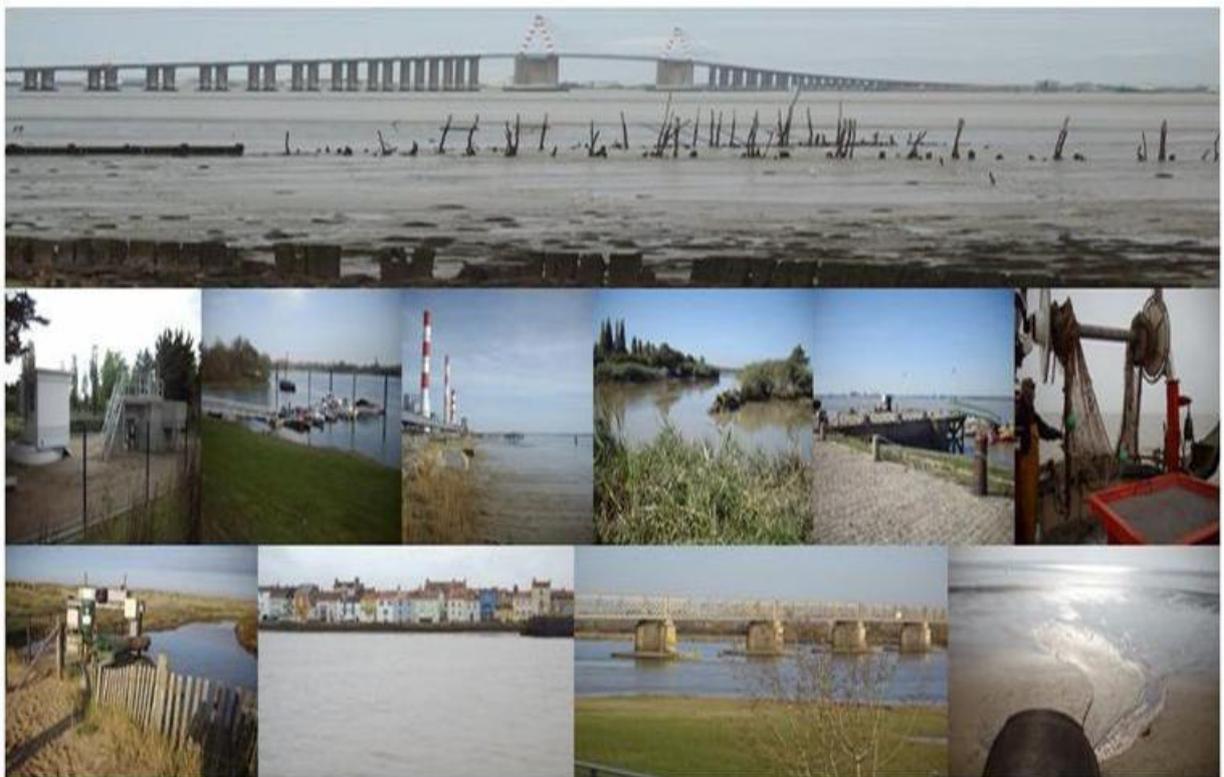
I. Blanchet-Letrouvé<sup>1\*</sup>, A. Zalouk-Vergnoux<sup>1</sup>, A. Vénisseau<sup>2</sup>, M. Couderc<sup>1</sup>, B. Le Bizec<sup>2</sup>, P. Elie<sup>4</sup>, C. Herrenknecht<sup>1</sup>, C. Mouneyrac<sup>3</sup>, L. Poirier<sup>1</sup>

**Contamination of Loire estuary sediments by endocrine disruptors and impact on the European eel** SETAC Europe. Glasgow. Mai 2013.

Isabelle Blanchet-Letrouvé<sup>1</sup>, Olivia Fossi Tankoua<sup>1</sup>, Laurence Poirier<sup>1</sup>, Sélim Aït-Aïssa<sup>2</sup>, Christine Herrenknecht<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>3</sup>, Sylvie Baloché<sup>4</sup>, Sylvie Dufour<sup>4</sup>, Catherine Mouneyrac<sup>3</sup>



# INTRODUCTION



## AVANT PROPOS



**1962–2012** : 50 années de recul depuis l'annonce du « Silent spring » de Rachel Carson, ouvrage soulignant pour la première fois les effets à retardement des pesticides sur la reproduction des animaux et en particuliers des oiseaux, prémisse d'une réflexion qui donnera naissance à la notion de perturbateur endocrinien. En effet,

**30 ans plus tard**, l'appel de Wingspread (Colborn and Clement 1992) avance le lien entre la présence de contaminants et des interférences avec les systèmes hormonaux. La définition de perturbateur endocrinien prend forme (Colborn and Clement 1992; Hotchkiss et al. 2008; Colborn 1993)) et évolue sous l'égide de l'OMS. Depuis, de nombreuses études, tant sur la faune sauvage que sur l'Homme, ont validé la présence de perturbations endocrines dans le monde (Zoeller et al. 2009; WHO 2002). Cependant, en milieu naturel, les liens de causes à effets restent très difficiles à démontrer en raison de la multifactorialité des paramètres en jeu et des mélanges complexes de contaminants.

A ce titre, les études épigénétiques ainsi que les études épidémiologiques représentent des enjeux majeurs dans le déchiffrement des effets sur le succès reproductif (Anway and Skinner 2008), en mettant en évidence un effet transgénérationnel sur la descendance, sans effet préalable visible sur les ascendants (Evans 2011; Evans et al. 2007). Ainsi, les dernières études en écotoxicologie mettent en avant la nécessité d'un changement de paradigme (WWF 2011) dans les concepts de toxicologie basés sur "à une dose, un effet", car les notions de durée d'exposition, de fenêtres d'exposition des organismes échantillonnés mais surtout de cocktails de contaminants, sont déterminants dans les effets observés.

En effet, il est très difficile de déterminer avec précision comment un perturbateur endocrinien (PE) donné provoque un effet spécifique, car ceci résulte de la combinaison de divers facteurs comme:

- ✓ le délai entre l'exposition et l'apparition des effets (probablement plusieurs décennies et générations)
- ✓ les périodes critiques au cours du développement embryonnaire et de la phase pré pubertaire (pouvant être très courtes);
- ✓ l'exposition des différents organismes à un grand nombre de mélanges complexes de substances chimiques au cours de leur vie



- ✓ les interactions des perturbateurs endocriniens entre eux et avec les hormones produites naturellement dans le corps; mais aussi avec d'autres contaminants tels que certains métaux ou encore les toxines
- ✓ l' action de perturbateurs endocriniens souvent à des concentrations extrêmement faibles et pouvant avoir un effet plus important à faible dose qu'à forte dose
- ✓ les limites des connaissances du système hormonal chez les organismes vivants
- ✓ En ce sens, la stratégie européenne vise à la protection de la santé humaine (article 35 de la Charte des droits fondamentaux) et le principe de précaution (article 191 du traité sur le fonctionnement de l'Union européenne (TFUE)) peut donc être pleinement appliqué. En 2001, la législation existante ne tenait pas nécessairement compte des effets néfastes des perturbateurs endocriniens sur la santé humaine, et la Commission au Conseil et au Parlement européen a donc proposé une nouvelle stratégie composée d'actions à court, moyen et long termes afin de prendre en compte ce problème. **Communication de la Commission au Conseil et au Parlement européen, du 14 juin 2001, sur la mise en œuvre de la stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens (COM(2001) 262).**

En 2009, une liste européenne prioritaire comportant 568 substances et 9 hormones de synthèse ou naturelles a été dressée, ainsi qu' une liste d'actions visant à évaluer les effets néfastes à long terme et/ou retardés (Trade Union Priority List for REACH Authorisation 2010). En effet, les perturbateurs endocriniens sont considérés comme des substances suscitant un niveau de préoccupation tel que :

- ✓ Des effets peuvent se manifester sur plusieurs générations par l'intermédiaire d'effets épigénétiques, entraînant des conséquences sociétales considérables.
- ✓ Une absence d'effets linéaires existe en raison des effets à faibles doses
- ✓ L'additivité des effets avec d'autres perturbateurs endocriniens augmente la probabilité d'un risque inacceptable pour la population
- ✓ Les substances chimiques de synthèse sont susceptibles d'altérer le fonctionnement du système endocrinien car elles sont fortement dispersées dans l'environnement.

Les substances incluses dans la liste prioritaire établie dans le cadre de la stratégie communautaire sont classées dans la catégorie 1, quand il existe une preuve d'activité perturbatrice endocrinienne sur au moins une espèce vivante, ou bien dans la catégorie 2, quand la preuve d'une activité biologique en rapport avec les perturbations endocriniennes est établie au moins sur quelques études in vitro.



Les recherches menées actuellement sur la perturbation endocrinienne fournissent régulièrement de listes actualisées de substances qui possèdent ces propriétés. Environ 2 250 substances possédant ces propriétés ont été recensées dans le monde entier (ISTAS).

En Juin 2013, les enjeux de santé publique et de protection de la biodiversité ont été confirmés par le récent rapport conjoint de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et du Programme des Nations-Unies pour l'Environnement (PNUE). En effet, cette étude du PNUE et de l'OMS, soulignent certains liens entre exposition aux perturbateurs endocriniens chimiques et plusieurs problèmes de santé. Notamment, ces substances chimiques peuvent contribuer à la survenue de la cryptorchidie chez le jeune garçon, (absence d'un ou des deux testicules dans le scrotum), du cancer du sein chez la femme, du cancer de la prostate, du cancer de la thyroïde, ainsi que de troubles du développement du système nerveux, d'un déficit de l'attention ou d'une hyperactivité chez l'enfant. Les auteurs du rapport s'inquiètent aussi de l'impact des perturbateurs endocriniens chimiques sur la faune. Par exemple, en Alaska (États-Unis d'Amérique), il se peut que l'exposition à ces substances chimiques contribue à la survenue de malformations congénitales, de cas d'infécondité et de malformations des bois dans certaines populations de cervidés. La diminution de la population de certaines espèces de loutres et d'otaries est peut-être due aussi, en partie, à l'exposition à plusieurs mélanges de PCB, au DDT (insecticide) et à d'autres polluants organiques persistants, ainsi qu'à des métaux tels que le mercure. Parallèlement, on a constaté qu'une interdiction ou une restriction de l'utilisation de substances chimiques perturbant le système endocrinien, entraînaient la reconstitution des populations d'animaux sauvages et une réduction des problèmes de santé (WHO 2012).

Dans le cadre du règlement REACH, il est proposé d'élaborer des critères permettant de transposer l'interprétation des résultats scientifiques en mesures législatives concrètes qui doivent reposer sur des restrictions ou des autorisations prenant en compte les considérations socio-économiques, en y associant un plan de substitution, et ce, en fonction du principe de précaution et dans la plus grande transparence (WHO 2012).

En parallèle, la France s'est engagée, depuis février 2013, dans un plan national faisant résonance aux travaux de la commission européenne pour élaborer une **Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE)**, en réunissant divers acteurs publics et privés: cette stratégie priorise l'innovation et la substitution, notamment par la promotion de



la chimie verte et des alternatives non chimiques, l'information et la sensibilisation du grand public. Enfin, pour renforcer, adapter et pérenniser les moyens de l'expertise et de la recherche publiques sur les PE, il paraît nécessaire d'entamer une réflexion sur la contribution financière des entreprises génératrices (ex : chimie, agrochimie) ou vectrices (ex : agroalimentaire, fabricants de biens de consommation) de risques chimiques.

Conjointement, la société civile composée de **27** organisations ont publié un Manifeste et une pétition publique appelant le gouvernement à adopter une stratégie ambitieuse de réduction des expositions des populations et des écosystèmes aux perturbateurs endocriniens.

En outre, devant l'augmentation du nombre de cancers, de troubles cérébraux et thyroïdiens ainsi que des problèmes de reproduction, 89 scientifiques de santé publique du monde entier, ont signé la déclaration du Berlaymont de 2013 sur les perturbateurs endocriniens, afin de demander une réglementation plus stricte de l'UE sur certains produits chimiques utilisés dans la vie quotidienne.

*"Des méthodes d'essai agréées et validées au niveau international n'existent pas pour de nombreux effets des perturbateurs endocriniens, même si les outils et les méthodes de laboratoire sont disponibles, et c'est un problème", a déclaré la professeure Susan Jobling de l'université de Brunel au Royaume-Uni.*

En ce qui concerne le contrôle de l'utilisation des produits chimiques, la déclaration demande également l'établissement d'un programme de recherche sur les perturbateurs endocriniens ciblé sur des évaluations de l'exposition, l'identification de produits chimiques comportant des propriétés endocriniennes perturbatrices, ainsi que le développement préclinique en vue de créer des modèles de laboratoire, et de développer la recherche pour contribuer aux études sur la santé humaine.

*"Même si des doutes subsistent, la recherche financée par la Commission a grandement contribué à la confirmation de la vraisemblance de nuisances graves et irréversibles provenant de perturbateurs endocriniens" a déclaré le professeur Åke Bergman de l'université de Stockholm en Suède.*

Le débat n'est donc plus entre discours alarmistes des uns, frilosité ou incrédulité des autres; on assiste bien à l'avènement d'une prise de conscience collective, scientifique, politique et citoyenne de la présence de PE, des risques pour l'environnement et de l'ensemble des espèces le constituant, dont l'Homme.



Le 21<sup>ème</sup> siècle se recentre donc sur l'Humanité, la Biosphère et la préservation de la biodiversité (décennie 2011–2020), comme un bouclier contre cette nouvelle crise biologique et géologique suspectée (Leaky and Lewin 1996; Wilson 1996; Barbault 2006).

Une course contre la montre, peut-être; un défi majeur de notre Histoire, sans doute, une responsabilité citoyenne de chacun, sûrement.

A ce titre, en France, l'Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques (OPECST) a approuvé le rapport du sénateur Gilbert Barbier "Les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution "(Barbier 2009).

Ainsi, la communauté des décideurs rejoint la communauté des scientifiques dans ce nouvel enjeu que constituent la présence de contaminants émergents dans l'environnement et à terme, un risque sérieux pour les écosystèmes, la biodiversité et la santé publique.

Ce travail de thèse s'inscrit dans ces objectifs de partage en connaissances scientifiques à partir d'échanges interdisciplinaires, tout en cherchant à évaluer la contamination potentielle de l'estuaire de la Loire en Perturbateurs Endocriniens. Parallèlement, cette étude vise à estimer le risque reproductif pour une espèce aquatique, écologiquement et économiquement importante, aujourd'hui menacée d'extinction et potentiellement exposée à ce type de contaminants: l'anguille Européenne *Anguilla anguilla*.

## CONTEXTE DE L'ETUDE

Milieu particulièrement vulnérable, l'estuaire de la Loire est soumis à de multiples variations (hydraulique, salinité, température, oxygénation, turbidité,...), et doit répondre à des enjeux économiques, sociaux et politiques par les activités qui s'y développent directement ou indirectement (pêche, maraîchage, industries, agriculture, élevage, urbanisation et densification de l'habitat...). Malgré ces différentes pressions, ce milieu estuarien n'en reste pas moins une zone à forte productivité, synaptique entre le fleuve lui-même, plus en amont, et le milieu marin, au large de St Nazaire. S'y développent en berges ou en îles, des vasières et des roselières exceptionnelles, où niche, hiverne, et s'alimente une faune avicole et limicole tout aussi exceptionnelle, et ce, grâce à la richesse en insectes et poissons du secteur (Perraudeau and Després 2009).

Cependant, cet écosystème, lui même résultat d'un ensemble d'écosystèmes qui s'imbriquent, subit, directement ou non, des modifications liées à l'exposition chronique, voire



accidentelle, de polluants divers interagissant les uns avec les autres. Les effets induits sur les organismes de l'écosystème peuvent ainsi osciller entre antagonisme et synergie, en passant par l'inhibition ou encore le mimétisme.

Parallèlement, à l'heure d'une vaste consultation publique sur la qualité physico-chimique et biologique des eaux dans notre région Pays de la Loire, les objectifs régionaux et nationaux pour 2015/2020 sont de réduire les pollutions agricoles, industrielles et domestiques, mieux traiter les eaux usées des industries et des communes, retrouver des zones humides et des rivières vivantes (www. le contrat de plan Etat-Région 2014-2020). Ce plan Loire IV, s'inscrit dans une nouvelle ambition qui correspond à une stratégie à l'horizon 2035, correspondant à trois plans sur sept ans. Il est l'instrument d'une politique partagée entre l'État, les collectivités et les acteurs institutionnels ou associatifs, portant sur le bassin de la Loire.

La mosaïque d'activités anthropiques développée au sein même de l'estuaire de la Loire, s'inscrit aussi dans une biodiversité remarquable défendue dans le cadre du SDAGE (Schéma Directeur de Gestion et d'Aménagement des Eaux de Loire - Bretagne 2010/2015; Document Agence de l'Eau Loire-Bretagne, 2007) ainsi que par la Directive Européenne ERU (eaux résiduaires urbaines).

Il apparaît donc opportun de se préoccuper de l'influence de contaminants dits " émergents", répertoriés comme perturbateurs endocriniens au niveau de l'écosystème "estuaire de la Loire", milieu récepteur d'effluents diffus ou de stations d'épuration urbaines implantées plus ou moins directement sur ses rives. Ces contaminants " émergents " sont ceux pour lesquels l'évaluation des risques qui leur sont potentiellement associés, n'a pas encore été suffisamment murie pour justifier de leur intégration dans des dispositions réglementaires; leur présence n'étant donc pas surveillée de façon pérenne dans les milieux (INERIS et al. 2009).

### **Présentation des objectifs et études envisagées**

La démarche scientifique de cette étude repose sur un diagnostic de l'ensemble des stations d'épuration et de leur capacité épurative vis-vis de la population raccordée (associée parfois à des industries ou autres entreprises), le long des 100 km de rives estuariennes de Saint-Nazaire à Varades, en passant par Nantes. De l'embouchure de l'estuaire à la station de pompage d'eau potable d'Ancenis, il existe environ 42 stations d'épuration urbaines (STEU) raccordées plus ou moins directement à la Loire ou à ses zones humides, auxquels s'ajoutent



des effluents diffus, correspondant à des assainissements autonomes domestiques, ou à des zones artisanales spécifiques.

Cette zone d'étude correspond à la zone de remontée de la marée dynamique, au-delà de la limite de salinité des eaux en Loire (Ménanteau and Gallice 2002; Ménanteau 2004). D'ailleurs, ces limites évoluent sensiblement depuis 1913, en raison des surcreusements réalisés en estuaire pour conserver un chenal d'accès à de gros bateaux. En effet, l'influence de la marée dynamique est remontée de 30 km entre 1903 et 1976 (jusqu'à Anetz, en 2009), et celle de la salinité de 20 km entre 1950 et 1973 (Perraudau and Després 2009). Ainsi, la prise d'eau en Loire afin d'alimenter en eau potable, Nantes, et le sud du département de Loire-Atlantique, a-t-elle été reportée de 16 km en amont afin de prélever une eau moins salée.

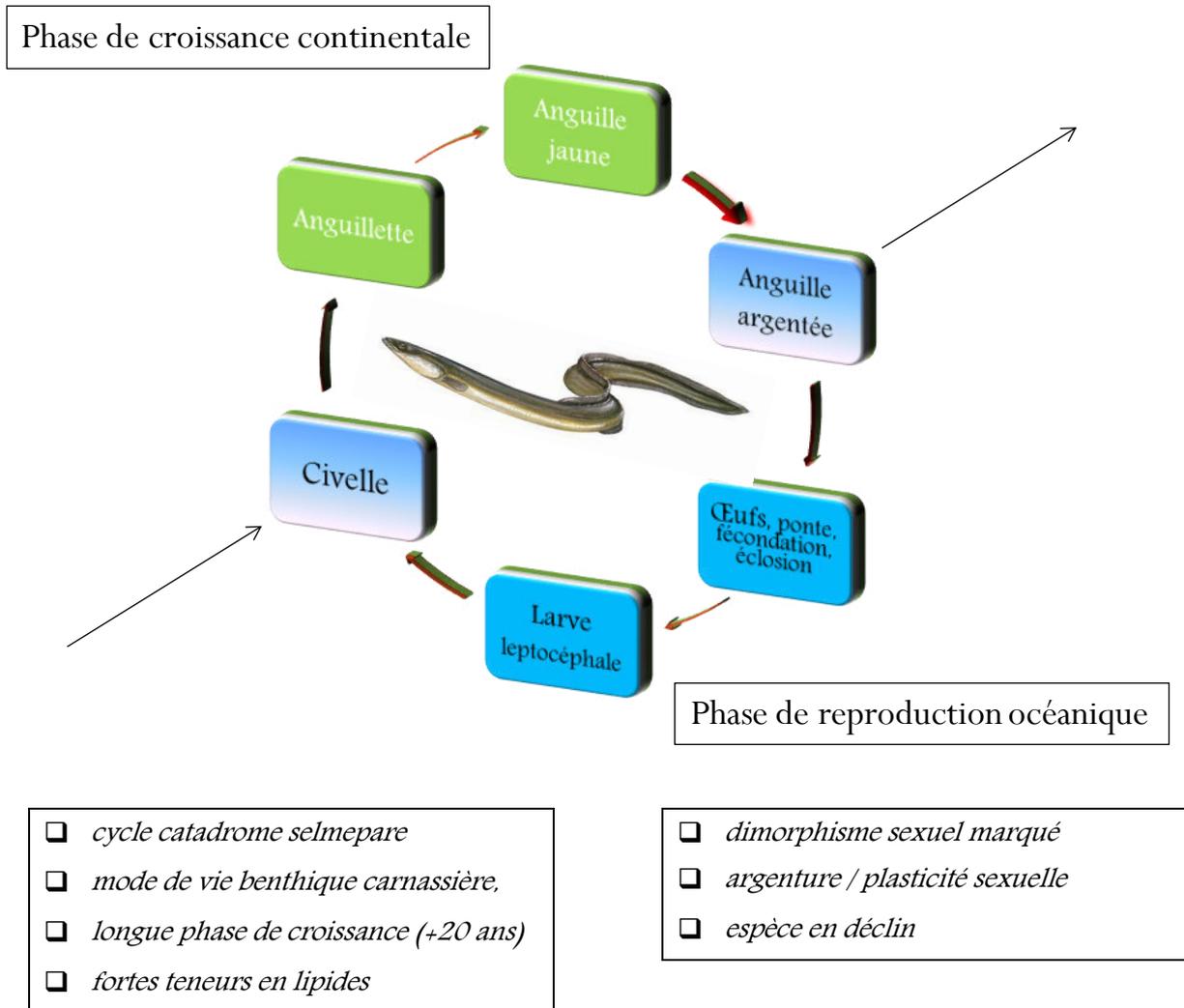
Ce diagnostic a permis de cibler des points de collecte de sédiments à proximité de rejets de station d'épuration, et d'établir un choix dans les sites à échantillonner, considérant les sédiments comme la **mémoire des eaux** sus-jacentes, et **concentrateurs de contaminants**. En effet, les sédiments constituent un compartiment où de nombreux contaminants s'adsorbent, pouvant ainsi, sur des échelles de temps non déterminées, constituer une source supplémentaire de polluants (Eggleton and Thomas 2004 ).

Un état des lieux a donc été réalisé afin d'évaluer le niveau de contamination des sédiments ligériens (notamment en perturbateurs endocriniens de type polychlorobiphényles PCB, polychlorodibenzodioxines/furanes (PCDD/PCDF) et hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Il conviendra ensuite d'établir, à partir des résultats obtenus, le lien entre l'exposition à de potentiels perturbateurs endocriniens, et leur imprégnation au sein de deux matrices biologiques (muscles, gonades) de l'anguille européenne. Cette espèce (*Anguilla anguilla* L.) a été choisie comme espèce sentinelle en raison de sa représentativité d'une partie de l'écosystème estuarien, de son incidence économique sur l'activité de pêche, ainsi que pour son écologie particulière. En effet, l'anguille européenne est caractérisée par un cycle catadrome (figure 1), une place de super prédateur amphihaline thalassotrope, un mode de vie benthique et une longue phase de croissance (plus de 20 ans), terminée par une unique période de reproduction (sémelparité). L'originalité de son cycle de vie et sa reproduction peu connue, la rendent particulièrement vulnérable face à l'ensemble des pressions qu'elle subit; elle est donc devenue une espèce menacée à l'échelle du globe, et a été classée en



2008, en Annexe II de la convention sur le Commerce international des espèces de faune et de flore sauvages, menacées d'extinction (inscrite à l'annexe II de la CITES le 13 mars 2009), car évaluée « en danger critique d'extinction » au niveau mondial et en France.



**Figure 1:** Cycle de vie catadrome de l'anguille européenne "*Anguilla anguilla*"

L'ensemble des données récoltées vise à mettre en évidence d'éventuelles perturbations de la fonction de reproduction chez cette espèce, et à valider ou non l'anguille en tant que "sentinelle" pertinente pour l'estuaire de la Loire, et plus généralement pour les écosystèmes estuariens. En effet, à l'échelle du globe, les estuaires constituent une ressource biologique extraordinaire mais sont, en parallèle, les plus exposés aux contaminants (Romaña 1994).

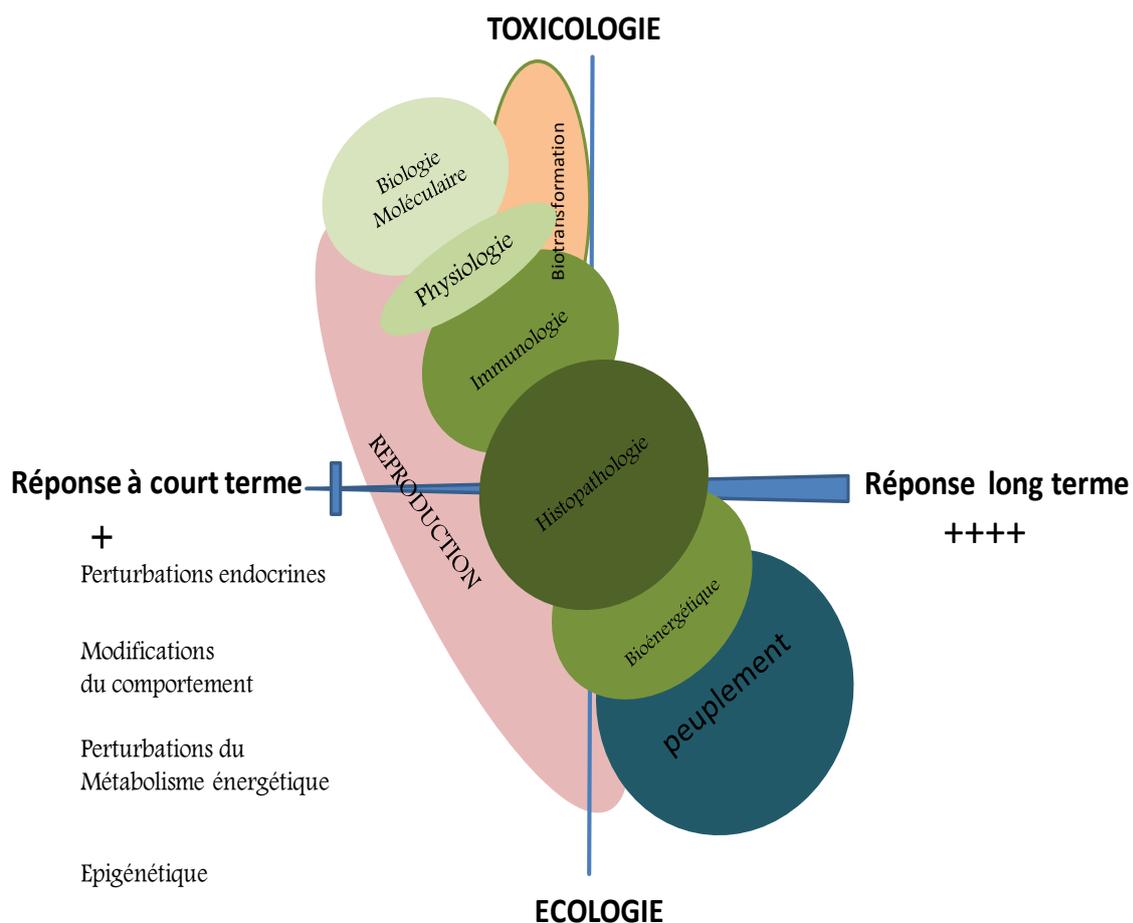
Dans ce contexte, la fonction de reproduction influence et affiche l'état de santé d'une population sur le long terme; ainsi, toute modification d'un organisme à l'échelle individuelle, entraîne-t-elle à terme, des modifications à l'échelle populationnelle, dont les réponses évoluent selon un curseur temporel (Figure 2). Ce curseur indique que, plus les



disfonctionnement de la fonction de reproduction sont observés tôt (au niveau biochimique), plus les effets biologiques visibles à long terme sur un organisme, puis sur la population entière, pourront être détectés et anticipés. A ce titre, des marqueurs particuliers permettront d'investiguer les niveaux biochimique (induction de l'expression génique de la vitellogénine et de l'aromatase), et cellulaire (histologie des gonades), jusqu'à l'organisme dans son intégralité (indices biométriques).

Il est probable que les réponses écotoxicologiques obtenues soient plus ou moins lisibles, compte tenu de l'inertie inhérente à la complexité et à la dynamique des écosystèmes, qui rendent difficile l'observation de perturbations à court terme, et encore plus difficile leur remédiation.

Le principe de précaution est alors un outil permettant d'intervenir en amont, pour prévenir d'éventuels effets non encore démontrés, mais difficiles à empêcher, ou impossibles à inverser, comme l'intersex par exemple (Jobling et al. 2005).



**Figure 2.** Une vision théorique des relations entre pertinence écologique et réponses de biomarqueurs à l'induction par des contaminants. Adapté et modifié de Adams et al.; (1989).



**En résumé**, selon une problématique globale relative à la présence de perturbateurs endocriniens, ce travail de thèse propose donc de répondre aux questions suivantes:

- ✓ Existe-t-il des perturbateurs de la fonction endocrine reproductrice (PE) dans les sédiments de l'estuaire de la Loire?
- ✓ Comment une espèce de poisson dite "sentinelle" répond-elle à d'éventuelles perturbations endocrines, de l'adulte au juvénile (préciser les potentielles atteintes à la reproduction)?
- ✓ Peut-on corrélérer l'exposition à ces perturbateurs endocriniens et leur bioaccumulation éventuelle sur cette espèce ciblée (*Anguilla anguilla*), à des anomalies de paramètres reproductifs?

et de réaliser en complément les objectifs suivants:

- ✓ Contribuer à l'évaluation de la qualité du système estuarien dans un objectif d'amélioration des pratiques d'épuration et de préservation des enjeux économiques
- ✓ Enrichir les connaissances relatives à l'estuaire de la Loire et contribuer aux comparaisons inter-estuariennes au niveau national et international .

La **première partie** de cette étude présentera donc la synthèse bibliographique nécessaire à une approche globale et synthétique de la problématique écotoxicologique posée.

La **deuxième partie** de l'étude abordera la stratégie de recherche tant au niveau du terrain qu'en laboratoire.

Une **troisième partie** permettra d'évaluer l'exposition des organismes à des contaminants de type perturbateurs endocriniens (PE), au regard de tests cellulaires, d'analyses qualitatives et quantitatives des sédiments de l'estuaire de la Loire, tandis que la **quatrième partie** présentera la contamination des organismes échantillonnés en milieu naturel sur 2 matrices (muscles et



gonades), en association avec l'utilisation de biomarqueurs appropriés, comme l'expression de la vitellogénine par exemple.

Dans une **cinquième partie**, des corrélations seront recherchées entre les différents paramètres biologiques et les dosages analytiques, afin de proposer une discussion écotoxicologique relative à des effets sur la fonction de reproduction de l'organisme "phare" choisi: l'anguille européenne, espèce en déclin.

En dernier lieu, l'ensemble des résultats sera synthétisé, et des perspectives de recherche présentées.

En parallèle, et de manière plus appliquée, ce travail a cherché à:

- ✓ Fédérer scientifiques, professionnels de la pêche et du traitements des eaux autour d'un même projet visant à positionner le niveau de reconquête de la qualité du milieu.
- ✓ Contribuer à assurer la préservation des enjeux économiques du secteur de la Loire et de son estuaire au niveau de la pêche (ressource piscicole) en précisant les atteintes potentielles à la fonction de reproduction de l'anguille européenne "*Anguilla anguilla*".
- ✓ Apporter des éléments objectifs visant à l'amélioration des pratiques d'épuration des eaux usées par les services concernés.



PARTIE 1

*SYNTHESE*

*BIBLIOGRAPHIQUE*



## I/- Les perturbateurs endocriniens : Définition, sources et mécanismes d'action

### 1. Les Perturbateurs endocriniens: une définition en constante évolution

Le concept de modificateurs ou perturbateurs du système hormonal revient à l'équipe de Colborn, dès 1992 (Colborn and Clement 1992), (Colborn and Clement 1992); cependant (Kavlock 1999) définit comme PE, *" toute substance ou mélange exogène interférant avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles in vivo responsables du maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et du comportement et induisant des effets nocifs sur un organisme intact, ses descendants ou les (sous) populations"*.

En 1998, le groupe de travail du comité scientifique concernant la toxicité, l'écotoxicité et l'environnement (CSTEE) réuni à Washington, s'accorde sur la définition suivante : *"un perturbateur endocrinien est une substance exogène ou un mélange qui altère une ou des fonctions du système endocrine et cause, en conséquence, des effets sanitaires néfastes sur un organisme, sa progéniture ou une (sous) population"*. Il précise qu' *"un perturbateur endocrinien potentiel est une substance exogène ou un mélange qui possède des propriétés qui sont susceptibles de mener à une perturbation endocrine sur un organisme, sa progéniture ou une (sous) population"* (Vos et al. 2000).

Devant la multiplication des études tant environnementales que relatives à la santé humaine, de nouveaux concepts émergent, mettant en exergue les difficultés à définir les perturbateurs endocriniens et les subtilités de leurs probables effets. A ce titre, (Multigner and Kadhel 2008) soulignent dans un ouvrage "Perturbateurs endocriniens: concepts et réalité", que des substances exogènes possédant des propriétés hormonales pouvant conduire à une perturbation endocrinienne, ne peuvent être qualifiées aussi facilement de Perturbateurs Endocriniens car cette définition *"ne discerne pas les substances qui produiraient un effet nocif de celles qui produiraient une perturbation transitoire et réversible de l'équilibre physiologique endocrinien"*.

Les incertitudes et questionnements, encore nombreux et complexes, sur une définition encore trop vague et ne présentant pas clairement des critères raisonnables et validables, retardent l'adoption de politiques de prévention et de gestion des risques environnementaux



et sanitaires. Ces interrogations sont, entre autres, relatives aux systèmes hormonaux différents de ceux des stéroïdes sexuels et sur des pathologies comme l'obésité ou le diabète de type II qui seraient induits de manière indirecte. Les notions de synergie « pouvant résulter d'expositions simultanées à de multiples substances chimiques présentant des activités hormonales variées et/ou suspectées d'agir par des mécanismes divergents au niveau cellulaire » sont aussi d'actualité. Le questionnement concernant la nature des relations doses-effets est parallèlement soulevé et "d'aucuns évoquent qu'à de faibles doses, ces substances pourraient entraîner des effets non observables à des niveaux d'exposition plus élevés". A cela s'ajoutent les questionnements relatifs aux fenêtres d'exposition d'un organisme au cours de sa vie.

C'est en ce sens que l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) et le Programme des Nations-Unies pour l'Environnement (PNUE) ont réalisé un rapport conjoint et complet sur les PE, "State of the science of endocrine disrupting chemicals", publié le 19 février 2013 à Nairobi. Celui-ci appelle à une réforme profonde de la gestion des produits chimiques et désigne la perturbation endocrinienne comme une « menace mondiale » pour la santé humaine et l'environnement, rappelant les enjeux environnementaux des perturbateurs endocriniens, fortement suspectés dans l'effondrement des populations de plusieurs espèces animales (WHO 2012).

Ainsi, un retrait des substances reprotoxiques était prévu dès 2013 en Europe et la Commission européenne devait définir réglementairement les critères des perturbateurs endocriniens permettant cette exclusion: cette mission a été confiée à l'Efsa (Autorité européenne de sécurité des aliments). Cependant, cette démarche a été reportée à 2014, sans définition de date butoir ([actu-environnement.com](http://actu-environnement.com)).

Le Parlement européen devrait donc voter, au cours de l'année 2014, un rapport intitulé "Protection de la santé publique contre les perturbateurs endocriniens" dans lequel une définition européenne réglementaire des PE est attendue, car inexistante à l'heure actuelle (voir partie introductive).

Le règlement REACH quant à lui, (règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques, entré en vigueur le 1er juin 2007) rationalise et améliore l'ancien cadre réglementaire de l'Union européenne (UE) sur les produits chimiques); l'article 57 définit notamment le régime d'autorisation des substances extrêmement préoccupantes (substances very high concern reach: SVHC). Les PE en font



partie et doivent pouvoir être définis de manière précise et détectés par des tests validés pour conduire à leur exclusion du fait de leur caractère CMR (Cancérigènes, Mutagènes, Reprotoxiques).

Au regard de ces enjeux, la Direction Générale "Environnement" de la Commission Européenne a également été invitée à se pencher sur la future définition réglementaire des PE.

Pour conclure, la notion de perturbateur endocrinien (PE) est en pleine évolution et nécessite une clarification visant à légiférer sur leur présence, leur toxicité et leur écotoxicité, au sein des différents environnements, clarification qui permettra en parallèle, la mise en œuvre de textes législatifs nécessaires à la préservation de la santé publique et de la biodiversité.

Dans l'attente d'une vision plus "argumentée" d'un perturbateur endocrinien, la liste des substances définies par la Commission Européenne (publiée en 2010) servira de support à cette étude (Trade Union Priority List for REACH Authorisation 2010).

Ce concept de PE sous-entend un lien direct avec les systèmes hormonaux.

## **Qu'en est-il du système endocrine et de son fonctionnement chez les Vertébrés ?**

### **2. Le système endocrinien et les Vertébrés**

Chez les Vertébrés, le système endocrine est sous la dépendance d'un certain nombre d'hormones sécrétées par des glandes (hypothalamus, hypophyse, thyroïde, pancréas, surrénales, ovaires et testicules...), molécules relativement bien conservées phylogénétiquement dans le règne animal (Crim, 1979 ; Burzawa-Gérard, 1981; (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal 1991). Ces hormones de structures diverses et complexes (glycoprotéines, polypeptides, stéroïdes, catécholamines, aminoacides modifiés...), sont transportées par le sang, pour aller agir sur des cellules cibles, à distance de leurs lieux de production. Elles réagissent à des récepteurs spécifiques, soit à l'état libre, soit liées à des transporteurs protéiques, et ce, à très faible concentration (ng ou pg/ml) afin de contrôler ou réguler de manière très fine, les fonctions essentielles de l'organisme comme la croissance et le développement, le métabolisme énergétique, la reproduction, mais aussi le développement neuronal et le comportement.



La synthèse de ces hormones nécessite l'activation du transcriptome, puis son affinage au niveau du protéome. A toutes les étapes de cette synthèse protéique, des interactions diverses peuvent être déjouées, des rouages accentués ou invalidés; en d'autres termes, chaque réaction chimique au sein d'une cascade biochimique peut être suractivée, inhibée ou partiellement réalisée.

## Qu'en est-il de la spécificité de la fonction endocrine liée à la reproduction ?

### 2.1. La spécificité de la fonction endocrine liée à la reproduction.

Processus clé de la conservation de la biodiversité et génératrice de brassage génétique, la reproduction met en jeu un ensemble complexe d'hormones qui interagissent entre elles, mais surtout qui interviennent de façon spécifique et à des concentrations différentes en fonction du cycle physiologique et reproductif de l'espèce considérée. La synthèse de ces hormones dites stéroïdiennes est souvent en lien direct avec des facteurs environnementaux, trophiques (De Vlaming, 1974) ou sociaux (densité-dépendance par exemple) .

**La reproduction** au sens strict fait essentiellement intervenir l'axe hypothalamo-hypophysaire et les **hormones stéroïdes** correspondantes; cependant le succès reproductif, quant à lui, sollicite d'autres fonctions endocrines comme la fonction thyroïdienne, nécessaire à la constitution de réserves lipidiques, au comportement sexuel, au développement embryonnaire, à la détermination génétique et phénotypique du sexe.

Parmi les différentes fonctions endocrines, la reproduction apparaît comme la plus complexe en raison d'interactions entre les différentes glandes endocrines mais surtout en raison de la cyclisation temporelle et spatiale de cette fonction au cours de la vie d'un organisme. En effet, cette fonction est assurée par des boucles de régulation finement orchestrée, dont la plus subtile correspond à une rétrocontrôle positif des hormones oestrogéniques sur l'axe hypothalamo-hypophysaire.

La fonction de reproduction assure en outre **un rôle pivot** en intervenant dans de nombreux processus, comme la synthèse des hormones sexuelles, les réponses génétiques, le métabolisme énergétique et le comportement. Cette fonction de reproduction fournit donc une palette de renseignements tant écologiques qu'écotoxicologiques, à l'échelle de l'individu et de la population.

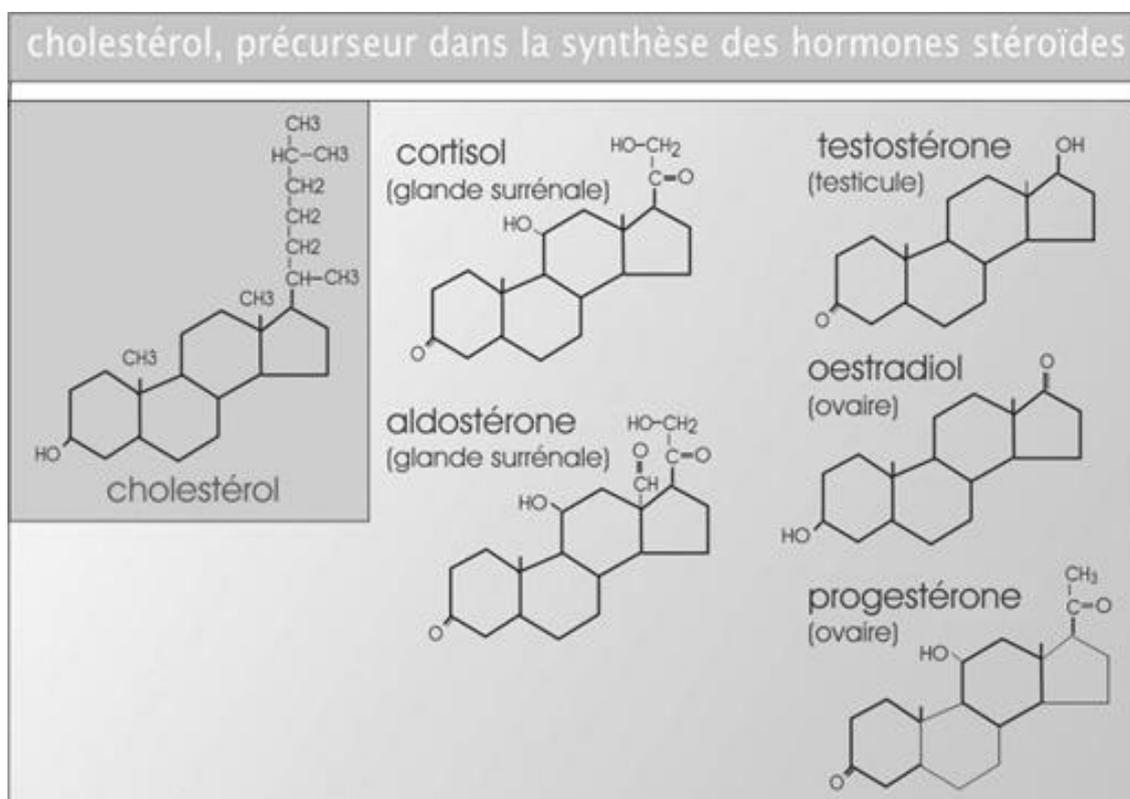


Il existe d'ailleurs un déterminisme hormonal du sexe pouvant être modulé par des facteurs environnementaux en relation avec la fenêtre temporelle du déterminisme génétique.

Qu'en est-il des hormones stéroïdiennes et de leur mode d'action ?

## 2.2. Les stéroïdes hormonaux

Les hormones stéroïdiennes constituent un groupe de composés biologiquement actifs synthétisés à partir du cholestérol et ayant en commun un noyau cyclopentanoperhydrophenanthrenique (figure 3).

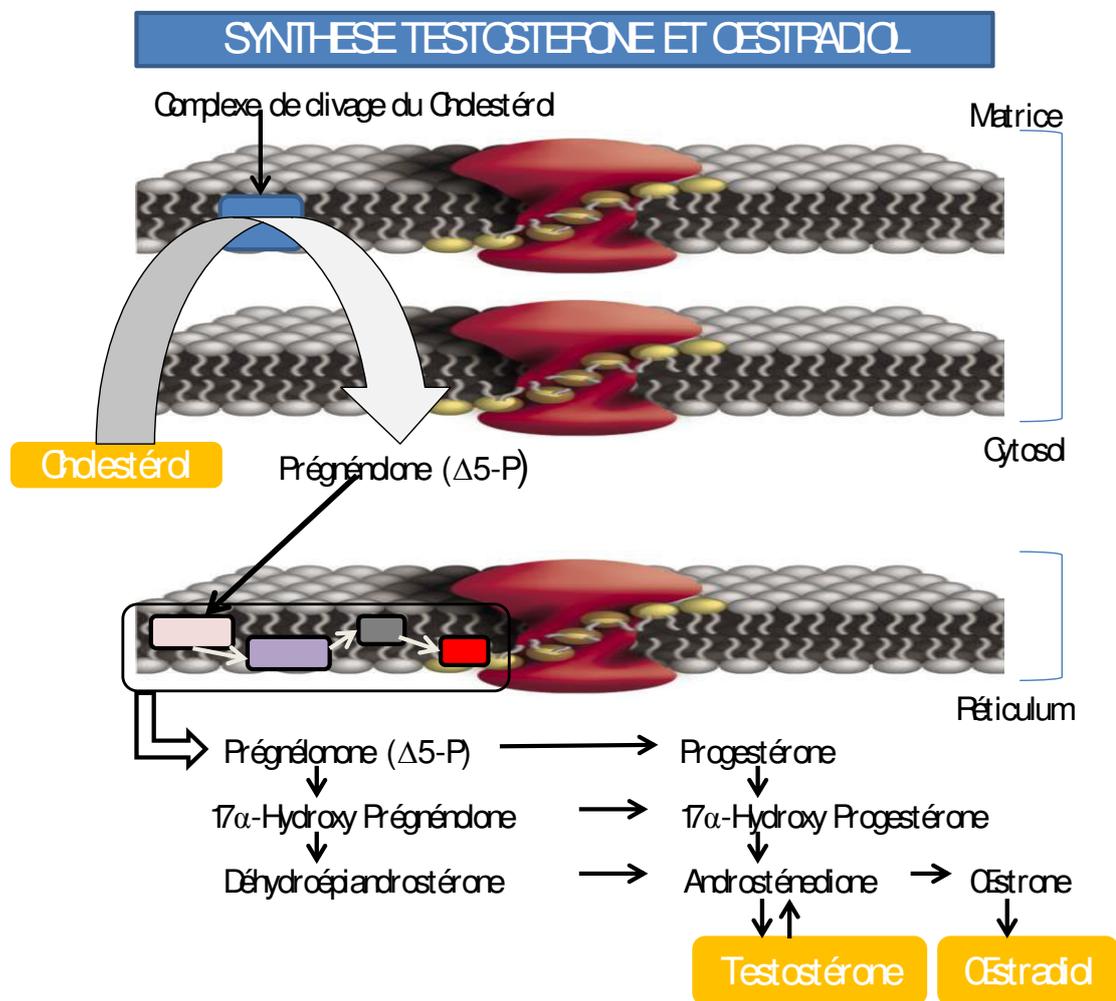


**Figure 3.** Structures chimiques comparatives des hormones stéroïdiennes et de leur précurseur, le cholestérol

Les stéroïdes naturels sont sécrétés par le cortex surrénalien, les testicules, les ovaires et le placenta chez les Vertébrés, et incluent les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les androgènes et les oestrogènes. Les glucocorticoïdes (cortisol) sont produits par les glandes surrénales en réponse à des facteurs de stress tels que le bouleversement émotionnel, l'exercice physique, la chirurgie, la maladie ou la famine chez l'Homme. Les estrogènes



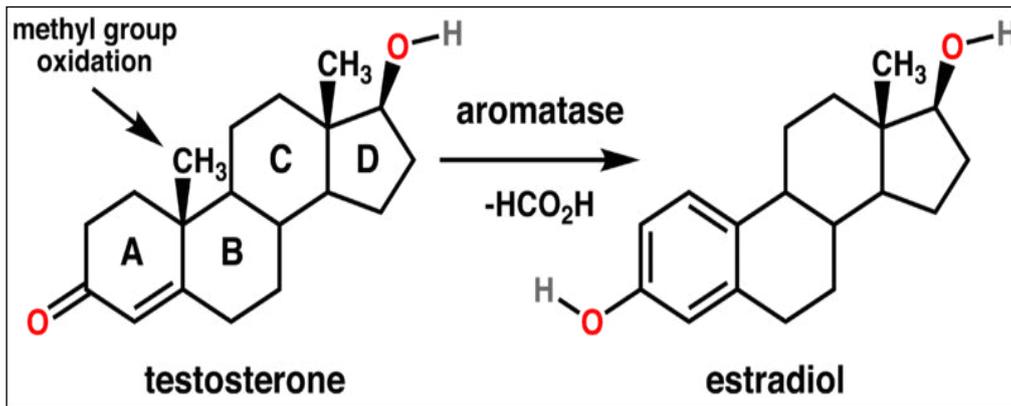
(œstradiol, estrone et estriol) sont principalement des hormones femelles, indispensables au maintien de la santé des tissus reproducteurs comme les seins, la peau et le cerveau chez l'Homme. Les progestatifs (progestérone) peuvent être considérés comme des équilibrateurs hormonaux, permettant en particulier de réguler la concentration des œstrogènes et des androgènes (testostérone, déhydroépiandrostérone et l'androstènedione) et jouant un rôle important dans la régénération des tissus, notamment la peau, les os et les muscles (Ying et al. 2002). Les principales hormones de la reproduction (testostérone (T) et œstradiol (E<sub>2</sub>)) sont synthétisées selon le mécanisme suivant (Figure 4):



**Figure 4:** Biosynthèse des Stéroïdes à partir du cholestérol (adapté de Sciencebio.com)

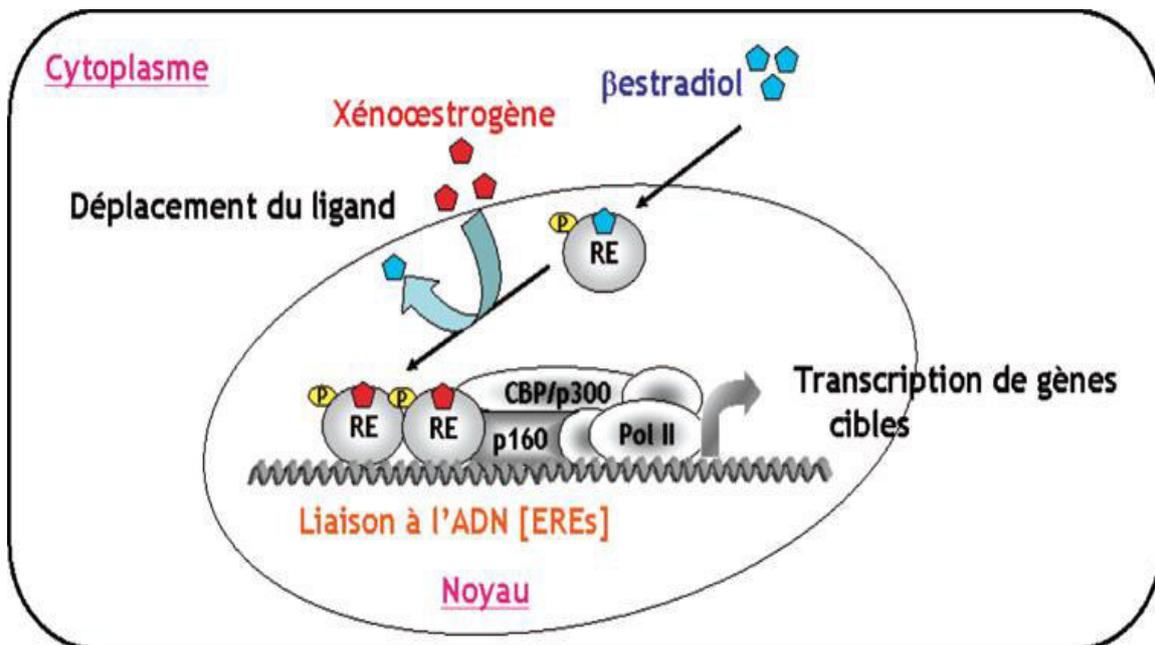
Ces deux hormones sont liées par une aromatisation dispensée par une enzyme clé, appartenant aux groupes des cytochromes: l'aromatase.





**Figure 5.** Réaction d'aromatation de la testostérone en œstradiol sous l'action du cytochrome P450 ou aromatase.

Toutes les hormones stéroïdiennes exercent leur action en passant à travers la membrane plasmique et en se liant à des récepteurs intracellulaires. Toutefois, des analogues structuraux appelés xénoœstrogènes, peuvent se substituer aux ligands naturels et mimer, bloquer ou suractiver la transcription de gènes, et par conséquent, la synthèse de protéines spécifiques (Figure 6).



**Figure 6.** Schéma d'action d'une Hormone stéroïde ou d'un xénoœstrogène mimétique via des récepteurs. Activation illégitime de la voie de signalisation du RE (récepteur des œstrogènes) par le récepteur de la dioxine activé (d'après Massaad et Barouki, 1999)

**Au niveau environnemental,** les stéroïdes sont retrouvés dans les effluents des stations d'épuration des eaux usées (STEU) et dans les eaux de ruissellement (Miège et al. 2009; Ternes et al. 1999). Ils proviennent majoritairement des urines humaines imprégnées suite à



l'ingestion de médicaments à base d'hormones stéroïdiennes, mais peuvent aussi provenir d'eaux usées d'élevages, voir de piscicultures. Ils sont ensuite rejetés dans l'environnement aquatique via les rejets des effluents des STEU, ainsi que par l'eau de pluie qui entraîne dans les rivières, les stéroïdes contenus dans la litière de volaille et le fumier, appliqués par l'Homme sur les terrains agricoles, pour fertiliser les terres. La présence des hormones stéroïdiennes dans le milieu aquatique est donc autant d'origine naturelle (molécules fabriquées par les organismes vivants eux-mêmes) qu'anthropique (molécules de synthèse). Cependant, les œstrogènes sont excrétés principalement sous forme de conjugués inactifs de l'acide sulfurique et glucuronique. Bien que les stéroïdes conjugués ne possèdent pas une activité biologique directe, ils peuvent agir comme des réservoirs d'hormones précurseurs pouvant être reconvertis en stéroïdes libres par des bactéries dans l'environnement. En raison de la présence de micro-organismes dans les eaux usées et les STEU, ces conjugués inactifs de stéroïdes oestrogéniques sont clivés, et les stéroïdes oestrogéniques actifs sont libérés dans l'environnement (Ternes et al. 1999). Concernant les hormones de synthèse comme le 17  $\alpha$ -éthynylestradiol (EE<sub>2</sub>) (présent dans les pilules contraceptives), ou l'ensemble des molécules utilisées en cancérothérapie uro-génitale, elles sont uniquement d'origine anthropique (Ying et al. 2002).

**Au niveau de l'environnement aquatique**, les hormones stéroïdiennes issues des rejets diffus des eaux usées ou des rejets de station d'épuration se déposent sur les sédiments après un transport dans la colonne d'eau, *via* des courants fluviaux ou marins. Dans l'eau, les hormones stéroïdiennes sont dégradées rapidement, mais en raison d'un coefficient de partage octanol/eau (K<sub>ow</sub>) supérieur à 3, les stéroïdes, molécules hydrophobes, ont tendance à s'adsorber facilement sur les sédiments et à y rester. (Robinson et al. 2009) estiment la demi-vie de l' E<sub>2</sub> et de l'EE<sub>2</sub> dans l'eau, de 1 à 5 jours (respectivement 1 jour et 3 à 5 jours). Ces deux stéroïdes présentent en revanche une biodégradation plus lente dans les milieux anaérobies comme les sédiments où leurs demi-vies sont alors respectivement de 4 jours à plus de 20 jours (Ying and Kookana 2003).

**Quelles sont les particularités des poissons Téléostéens par rapport aux autres Vertébrés quant au système hormonal lié à la fonction reproductive ?**



### 2.3. Spécificité de la fonction endocrine reproductive chez les poissons Téléostéens

Comme chez les autres vertébrés, la reproduction des Téléostéens est un phénomène cyclique régulé par des paramètres externes environnementaux, le plus souvent saisonniers (température et photopériode), et par un rythme physiologique interne sous la dépendance de facteurs hormonaux. Cependant, les **spécificités liées au milieu aquatique**, et donc à la physiologie des Poissons, impliquent un système endocrine original, lui-même variable en fonction des familles de Poissons. En effet, la sexualité des Poissons se caractérise par une grande plasticité dans leurs modalités d'expression comme le gonochorisme primaire ou secondaire (état d'un individu capable de produire un seul type de gamètes, les sexes sont donc séparés), l'hermaphrodisme, ou l'intersexualité, ainsi que par une labilité de la différenciation sexuelle et de l'activité fonctionnelle des gonades; elle est aussi caractérisée, dans la plupart des cas, par une absence de soins parentaux après la ponte (Bruslé and Bruslé 1983).

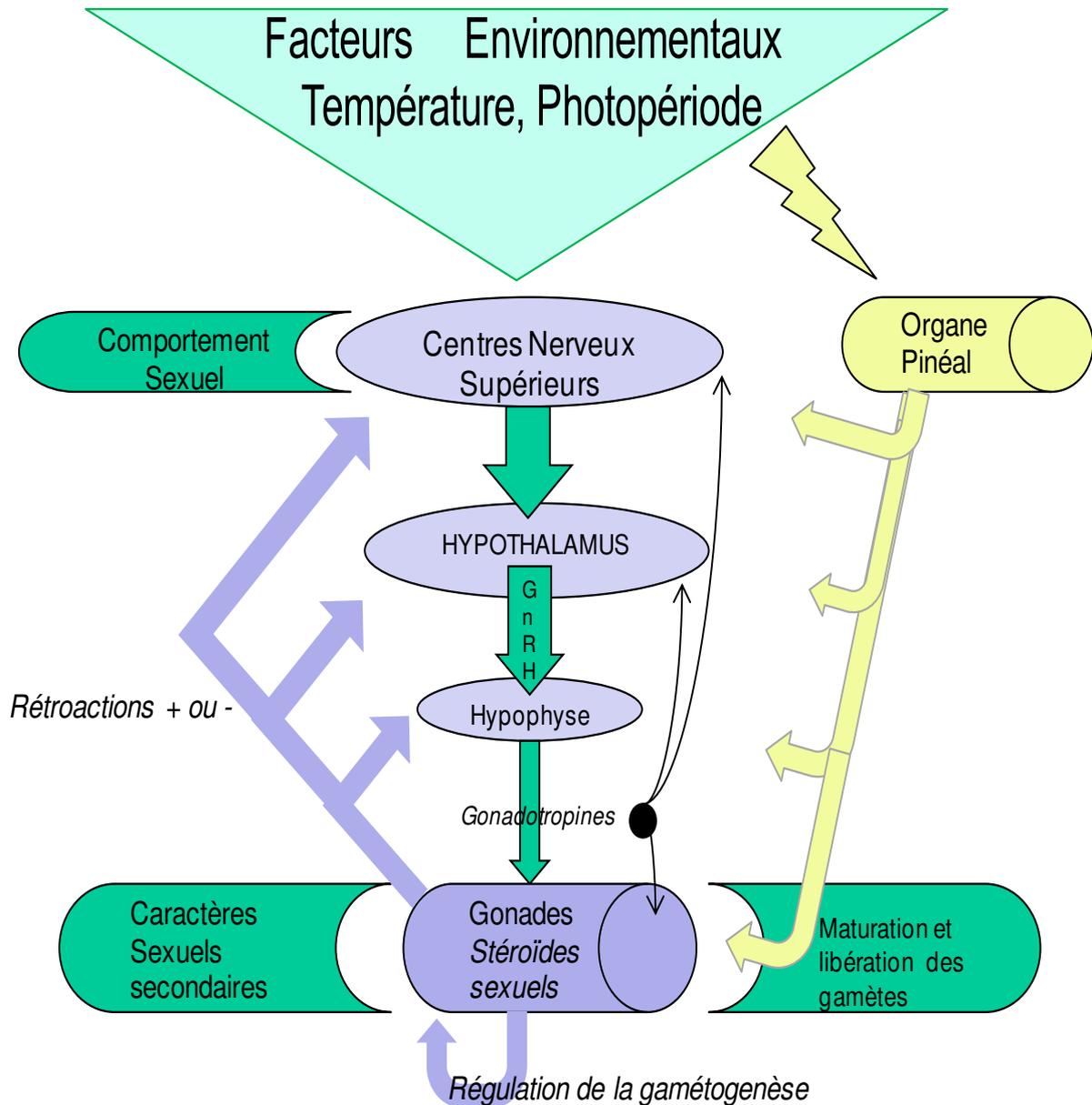
De nombreuses études relatives aux rôles des facteurs internes sur la reproduction des poissons Téléostéens ont permis de mettre en évidence les aspects hormonaux de la reproduction (Thomé et al. 2012; Jalabert 2005 ; de Vlaming et al. 2007; Fontaine et al. 1964), ainsi que l'implication du système neuro-endocrinien, et plus particulièrement le rôle du complexe hypothalamo-hypophysaire en tant qu'élément de liaison entre facteurs environnementaux et organes reproducteurs.

**Comparativement aux autres vertébrés**, les Téléostéens ne possèdent pas d'éminence médiane entre l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure; ils possèdent par contre une innervation directe de l'adénohypophyse (Ball and Batten 1981.), mais cette différence dans l'organisation de l'anatomie cérébrale, ne modifie pas le contrôle exercé par les neurones dopaminergiques sur la sécrétion des hormones hypophysaires comme la prolactine, la thyroid stimulating hormone (TSH), la corticotropin (ACTH), la growth hormone (GH) ou encore l' $\alpha$  MSH (Wong et al. 1993). Cependant, il persiste de nombreuses zones d'ombre dans la complexité des mécanismes en jeu qui, malgré tout, peuvent être schématisés selon la figure 7 (Hoar et al. 1969; 1983.).

De nombreuses avancées scientifiques relatives à la différenciation, la maturation et l'ovulation des oocytes de poissons Téléostéens, ainsi que la connaissance du déterminisme biologique de l'ovogenèse ont été obtenues à la lumière de la protéomique et de la transcriptomique (Lubzens et al. 2010). Ces informations sont particulièrement sollicitées



par les fermes aquacoles qui gèrent l'élevage d'espèces commercialisées, ou qui souhaitent mettre en œuvre des élevages avec des espèces non encore artificiellement produites (Jalabert 2005 )



**Figure 7:** Axe gonadotrope de la fonction de reproduction chez les poissons Téléostéens. Schéma modifié et adapté (d'après M. Legendre et B. Jalabert)



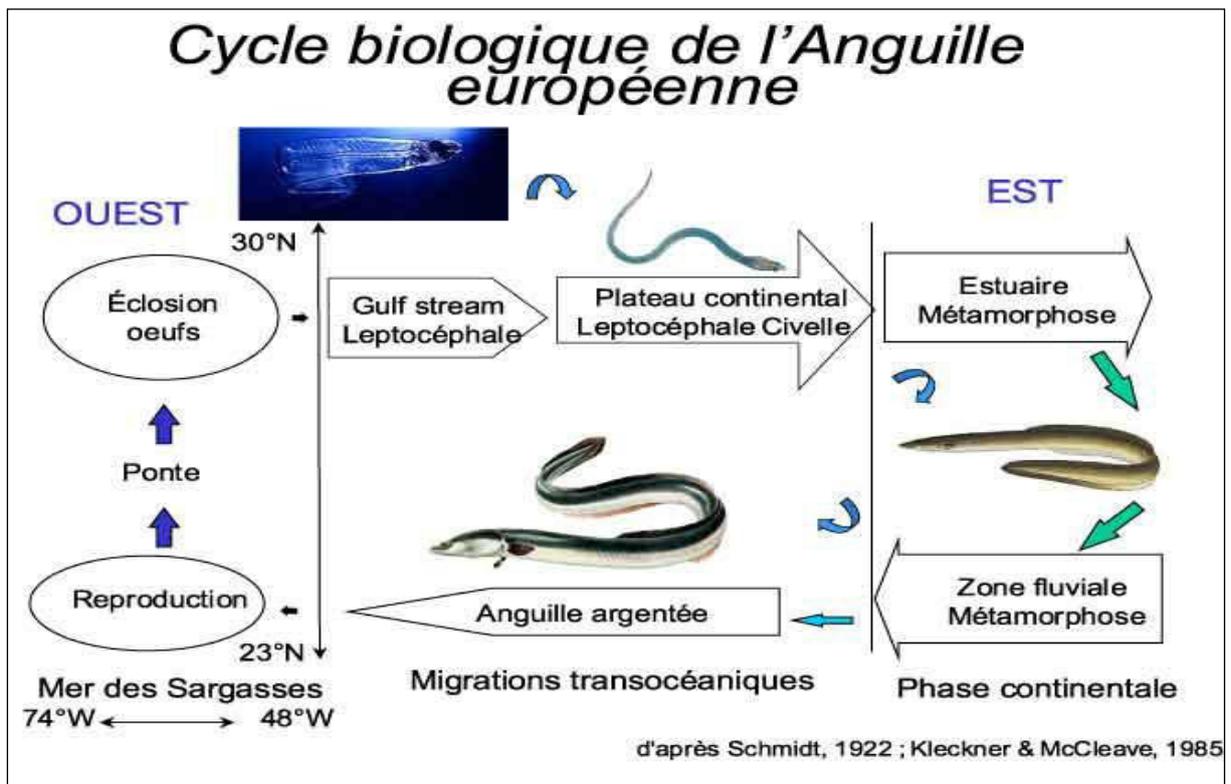
## 2.4. Un cas très original. l'anguille européenne "*Anguilla anguilla*"

Toutes les études en endocrinologie soulignent la pertinence de l'anguille européenne comme modèle d'étude, car, appartenant à l'ordre des Elopomorphes, elles peuvent avoir conservé des systèmes de régulation ancestraux (Montero et al. 1995).

La principale spécificité de la reproduction de l'anguille Européenne réside dans l'absence quasi totale d'informations concernant:

- ✓ le déterminisme génétique du sexe
- ✓ la maturité sexuelle, (déterminisme, durée et mécanismes),
- ✓ le comportement sexuel de rencontre des sexes
- ✓ la fécondation
- ✓ la ponte et ses conditions,

aucune anguille mature n'ayant été capturée dans le milieu naturel. En effet, les ovaires restent immatures pendant toute la vie continentale, y compris au stade argenté (Figure 8) (Fontaine et al. 1964; Fontaine 1993).



**Figure 8:** Cycle de vie de l'anguille européenne "*Anguilla anguilla* L." (d'après Schmidt, 1992; Klecker and Mc Cleave, 1985).



Aucune maturation sexuelle spontanée n'a donc été observée, cependant des extraits hypophysaires de carpe ou d'hormones gonadotropes sont capables de l'induire (Fontaine et al. 1964; Fontaine 1936). Cette spécificité de la fonction gonadotrope chez l'anguille européenne a été étudiée par Dufour et al. (Dufour et al. 2003; Dufour et al. 1983; Dufour et al. 1993); cette équipe a montré, par dosage radio-immunologique (RIA), que la sous-unité  $\beta$  de l'hormone gonadotrope de carpe (cGTH) est peu active chez l'anguille jaune femelle continentale, en raison d'un **niveau d'hormones hypophysaires plasmatiques très faible et souvent indétectable** (< à 1 ng d'équivalent cGTH/ml), alors que la concentration de cette même hormone atteint 15 ng d'équivalent cGTH/mg dans le tissu frais. En outre, les niveaux de testostérone plasmatique libre (T) et d'œstradiol ( $E_2$ ) sont inférieurs à 0.3 ng/ml. Par contre, un apport en  $E_2$  se traduit par une élévation très importante des taux de cGTH hypophysaire, jusqu'à un facteur 1000, sans que le taux plasmatique n'en soit modifié (Leloup-Hatey et al. 1988 ). Il est donc suggéré que des **facteurs environnementaux externes sont indispensables à la stimulation de la fonction gonadotrope et au développement des ovaires**, et ce, au cours de la migration vers la mer des Sargasses ou juste sur les aires de frai. Les expérimentations relatives à l'influence de la salinité en tant qu'activateur de la fonction gonadotrope montrent que la production d' $E_2$  est augmentée d'un facteur 20 tandis que la concentration en T n'évolue pas. Parallèlement, aucune modification n'est décelable au niveau de la fonction gonadotrope, et les ovaires ne présentent aucun signe de développement. Le déterminisme de la maturation sexuelle doit donc faire intervenir d'autres facteurs environnementaux en synergie.

En final, seules les expérimentations *in vivo* ont permis d'acquérir des informations relatives à l'ovogenèse (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal 1991) effets de l' $E_2$  et des gonadotropines de carpes sur la vitellogenèse d'anguilles argentées femelles normales et hypophysectomisée (RIA) et à la spermatogenèse (Perez et al. 2000) chez des anguilles jaunes ou argentées, mais l'ensemble des données acquises reste sans doute éloigné de la réalité environnementale.

Malgré tout, des émissions de gamètes ont pu avoir lieu en conditions expérimentales et des fécondations ont été réalisées, donnant naissance à des larves leptocéphales, mais dont la durée de vie est restée trop brève pour obtenir des civelles (Palstra et al. 2005; Pedersen 2003). Les fermes aquacoles élevant des anguilles européennes ne réalisent donc que de la croissance à partir de très jeunes anguillettes prélevées dans le milieu naturel puisque la totalité du cycle reproductif reste inconnu. Au contraire, l'anguille japonaise est totalement



produite en conditions d'élevage (Yamamoto and Yamauchi 1974; Yamauchi et al. 1976; Tsukamoto and al. 2011).

La **deuxième spécificité** des Anguillidés est directement liée à la présence d'un double contrôle neuro-hormonal de la maturité sexuelle:

- ✓ au niveau dopaminergique par inhibition de la synthèse et de la libération de GTH (gonadolibérines) (Vidal et al. 2004).

- ✓ au niveau hypophysaire par production insuffisante de gonado releasing Hormons GnRH (Dufour et al. 2003). En effet, (Weltzien et al. 2006) montrent comment, par q RT PCR, les stéroïdes des gonades régulent l'expression cérébrale de la tyrosine hydroxylase, enzyme limitante de la biosynthèse de la dopamine (DA). La sécrétion de DA constitue donc un réel verrou au déclenchement de la puberté.

Cette stimulation androgène-dépendante du système dopaminergique du cerveau chez la femelle anguille européenne résulte de la présence de neurones dopaminergiques provenant du *nucleus preopticus* (NPO) qui inhibent directement la fonction gonadotrope. Il existe donc un **feed-back positif sur le contrôle neuroendocrinien** suggérant une stimulation androgène dépendante du processus de l'olfaction, fonction sensorielle extrêmement sensible chez l'anguille européenne, indispensable à la navigation au cours de la migration de reproduction vers les aires de frai océaniques (Westin 1990; Giorgi et al. 1994; Davila et al. 2003).

Une **troisième spécificité** des anguilles, comparée à d'autres espèces de Téléostéens, est leur niveau d'activité faible de l'aromatase cérébrale (enzyme nécessaire à la conversion des androgènes en œstrogènes) ainsi qu'un niveau relativement élevé de testostérone plasmatique pour les femelles (Dufour et al. 1983; Jeng et al. 2007) (Pellegrini et al. 2005). Ceci souligne la méconnaissance du mécanisme de régulation des androgènes sur le système central dopaminergique des femelles prépubères chez cette espèce.

Malgré de nombreuses inconnues sur ses mécanismes endocrinologiques reproductifs, l'anguille européenne peut donc apporter des informations pertinentes dans sa manière de répondre ou non à la présence de xénobiotiques dans son biotope, et ce, en fonction de son sexe et de son stade de maturité sexuel.



**Mais dans l'état actuel des connaissances, quelles sont les familles de molécules aujourd'hui reconnues ou soupçonnées d'être potentiellement sources de perturbation endocrine?**

### **3. Les Perturbateurs Endocriniens: origines et sources potentielles d'exposition**

Un certain nombre d'affections sont aujourd'hui suspectées d'être la conséquence d'exposition à des Perturbateurs Endocriniens (PE), tant au niveau de l'espèce humaine que des autres espèces animales ou même végétales: baisse de la qualité du sperme, augmentation de la fréquence d'anomalies du développement du tractus génital, de la fonction de reproduction. Le rôle des PE est en outre suspecté dans les cancers dont le développement est influencé par des mécanismes hormono-dépendants (cancer du sein, de l'utérus, de la prostate et des testicules) (Amiard-Triquet et al. 2011; Afssa 2006).

Parmi ces substances, on peut identifier :

- ✓ les substances produites intentionnellement pour leur effet hormonal: hormones de synthèse comme les contraceptifs, les molécules utilisées dans le traitement de la stérilité, les thérapies anticancéreuses

- ✓ les substances chimiques de synthèse: pesticides organochlorés, herbicides, certains plastifiants (Bisphénol A, certains phtalates), dioxines ou apparentés (polychlorobiphényles, PCB), hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), retardateurs de flamme, etc..., fabriquées sans que leurs effets potentiels sur le système hormonal n'aient été recherchés.

- ✓ les composés naturels comme les phyto-estrogènes présents dans une grande variété de plantes: génistéine de soja, mycotoxine présente dans les silos à céréales (la zéaralénone, etc....)

Les organismes y sont principalement exposés *via* l'eau, les aliments, l'air et certains produits industriels avec lesquels ils sont en contact (médicaments, cosmétiques, produits phytosanitaires).

Parmi ces différentes sources, les Polychlorobiphényles ou PCBs ainsi que les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent des polluants organiques majeurs de notre environnement (Hubaux and Perceval 2011). Ce sont des composés ubiquistes et hydrophobes, s'adsorbant de manière forte sur les particules, et se concentrant au sein des différents réseaux trophiques, surtout aquatiques.



Comment s'expliquent ces différentes caractéristiques?

### 3.1. Des espèces chimiques fortement rémanentes. les Polychlorobiphényles ou PCBs

#### 3.1.1. Structure physico-chimique des PCBs

Composés aromatiques chlorés, les PCBs sont des molécules très stables, chimiquement et physiquement, de caractère lipophile, qui se concentrent le long des chaînes alimentaires jusqu'au super-prédateurs, dont l'espèce humaine fait partie. Ils possèdent tous la même structure générique et diffèrent par la position et le nombre d'atomes de chlore (de 1 à 10) sur les cycles phényles (figure 9).

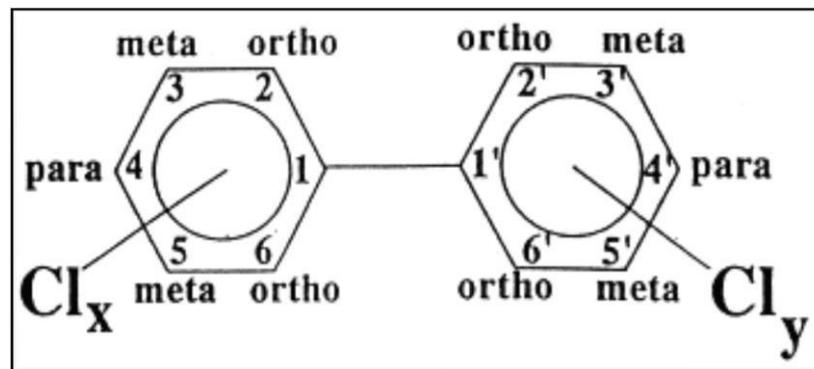


Figure 9: Position des atomes de chlore dans la molécule de PCB

Légende:  $x$  &  $y$  = nombre d'atomes (Source : *Altered function, localization and phosphorylation of gap junctions in rat liver epithelial, IAR 20, cells after treatment with PCBs or TCDD* - Yvonne Bagera and al. - *Environmental Toxicology and Pharmacology*)

La toxicité des PCBs est dépendante du nombre et de la position de ces atomes de chlore. S'il y a un seul atome de chlore dans la molécule de PCB, elle est dite mono-substituée, s'il y a plusieurs atomes de chlore, celle-ci est dite poly-substituée.

Les propriétés physico-chimiques des PCB, dépendantes de leur niveau de chloration, les ont dédiés à une production industrielle conséquente dès 1930 (Figure 10). **209 substances** apparentées ou dérivées de PCB ont ainsi été produites par chloration du biphényle, ce qui correspond à 1 million de tonnes en 50 ans (INSERM).



Les mélanges de PCBs ont reçu des noms commerciaux variés, dont certains sont très connus comme l'Aroclor ou le Pyralène. Leur lipophilie explique leur bioaccumulation dans les tissus des êtres vivants.

<i>propriétés physico-chimiques</i>	<i>Usages industriels</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Très grande stabilité chimique</li> <li>• Non hydrolysables</li> <li>• Bonne résistance aux agents chimiques tels que les acides, les bases et oxydants)</li> <li>• Résistance à l'inflammation</li> <li>• Inertie chimique</li> <li>• Constante diélectrique élevée (très bons isolants électriques)</li> <li>• Pouvoir lubrifiant</li> <li>• Pouvoirs adhésifs et plastifiants</li> <li>• Non solubles dans eau, glycérine, formol</li> <li>• Solubles dans tous les solvants organiques et les huiles (liposolubles)</li> <li>• Hydrophobes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• comme isolants diélectriques (en mélange avec des trichlorobenzène pour diminuer la viscosité du mélange</li> <li>• dans les transformateurs et les condensateurs électriques industriels</li> <li>• dans les fluides hydrauliques</li> <li>• anciens solvants de peintures, vernis, encres</li> <li>• anciens pesticides</li> </ul>

**Figure 10:** Propriétés physico-chimiques et usages industriels des PCB

### *3.1.2. Principales sources de PCBs*

En milieu naturel, les PCB n'existent pas; leur présence correspond donc à une diffusion dans l'environnement. Leur caractère toxique étant étroitement lié à leur configuration chimique plane, permettant la fixation au récepteur AhR (*Aryl Hydrocarbon Receptor*, également appelé "récepteur aux dioxines"), tous les PCB pouvant adopter cette configuration plane auront un caractère toxique. A l'inverse, la présence d'atomes de chlore en position ortho diminue la possibilité d'adopter une configuration plane et par conséquent diminue la toxicité de ces congénères (Frery et al. 2000). La teneur d'un mélange de dioxines, furanes et PCB-DL est exprimée à l'aide d'un **indice international de toxicité (I-TEQ)** qui résume en une seule valeur la toxicité du mélange des 17 molécules les plus toxiques pour l'Homme.



Parmi les 209 dérivés de PCB, on distingue:

- les 12 PCB « dioxin-like » ou PCB-DL (congénères non-ortho : 77, 81, 126 et 169; et 8 mono-ortho: 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 et 189) plus ou moins fortement chlorés, de structure plane, ayant le même mécanisme de toxicité que les dioxines et furanes (car ils se lient au même récepteur AhR). Ils sont donc généralement dosés en même temps que les 17 dioxines et furanes les plus toxiques
- les PCB « non dioxin-like » (PCB-NDL) dont les congénères (138, 153, 180, 28, 52 et 101) majoritairement suivis dans les études de monitoring agissent selon un mécanisme d'action différent de celui des dioxines (INERIS 2011) (<http://rsde.ineris.fr/> ou <http://www.ineris.fr/substances/fr/>).

Parmi les PCB, 7 congénères, ou PCB « indicateurs » (PCBi), très fortement chlorés, sont présents dans l'environnement et particulièrement persistants. Ils représentent environ 50% de l'ensemble des dérivés de PCB présents dans les aliments d'origine animale et dans les tissus humains. Les PCBi sont composés de 6 PCB-NDL et d'1 PCB-DL (CB 28, 52, 101, 138, 153, 180) et (CB 118 respectivement).

Les dosages des PCB dans l'environnement, dans les aliments ou chez l'homme concernent généralement:

- les 12 PCB-DL sont parfois dosés simultanément avec 17 dioxines et furanes; les résultats étant exprimés en « Toxic Equivalent Quantity » (TEQ OMS) par application d'un coefficient de toxicité à chaque composé avant d'en faire la somme; l'unité la plus employée est le picogramme (ANSES. and InVS. 2011a).

- les 6 PCBi, dosés pour estimer la contamination par les PCB totaux; l'unité la plus employée est le nanogramme.

En fonction de leur structure moléculaire et de leur capacité à être métabolisés les PCB ont été classés selon quatre groupes (Kannan et al. 2000).



**Groupe 1 :**

Non métabolisables, pas d'atomes de carbone vicinaux libres: CB 146, CB 153, CB 169, CB 172, CB 180, CB 183, CB 187, CB 194

**Groupe 2 :**

Métabolisables par le cytochrome CYP 450 2B, atomes de carbone vicinaux libres en position méta et para: CB 52, CB 92, CB 101, CB 135, CB 136, CB149, CB 174, CB 199.

**Groupe 3 :**

Métabolisables par CYP 450 2B, atomes de carbone vicinaux libres en position ortho et méta: CB 74, CB 77, CB 99, CB 105, CB 118, CB 126, CB 128, CB 138, CB 156, CB 170, CB 177.

**Groupe 4 :**

Métabolisables par CYP 450 1A et 2B, atomes de carbone vicinaux libres en position ortho, méta et para, facilement métabolisables: CB 18, CB 44, CB 49, CB 70, CB 84, CB 87, CB 91, CB 97, CB 110, CB 132.

En France, depuis 1975, leur usage comme solvants dans les peintures, vernis, encres ou pesticides est interdit; cependant leur présence reste tolérée dans les systèmes clos permettant leur récupération. En ce qui concerne les émissions aquatiques industrielles, les flux rejetés auraient été de 3 kg/an pour les 7 PCB<sub>i</sub> en 2005, les principaux secteurs concernés étant la métallurgie et la chimie (Dargnat and Fisson 2010; Cornu 2012). En ce qui concerne les stations d'épuration urbaines, les quantités de PCB provenant de l'épandage agricole des boues en France, sont estimées à 40 kg/an en moyenne dans les années 2000.

Il existe par ailleurs des émissions accidentelles issues principalement du vandalisme des transformateurs, (notamment pour en extraire le cuivre), ou bien provenant de fuites lors du stockage et la manipulation des contenants de PCB .

En 2009, les rejets atmosphériques sont estimés à 58 kg, en France métropolitaine, dont 52 % seraient imputables aux industries, notamment les secteurs de la métallurgie et du traitement des déchets dangereux; 24 % aux incinérateurs d'ordures ménagères et aux centrales thermiques, et 4 % au secteur résidentiel et tertiaire (combustion de bois, consommation de tabac, utilisation domestique de produits

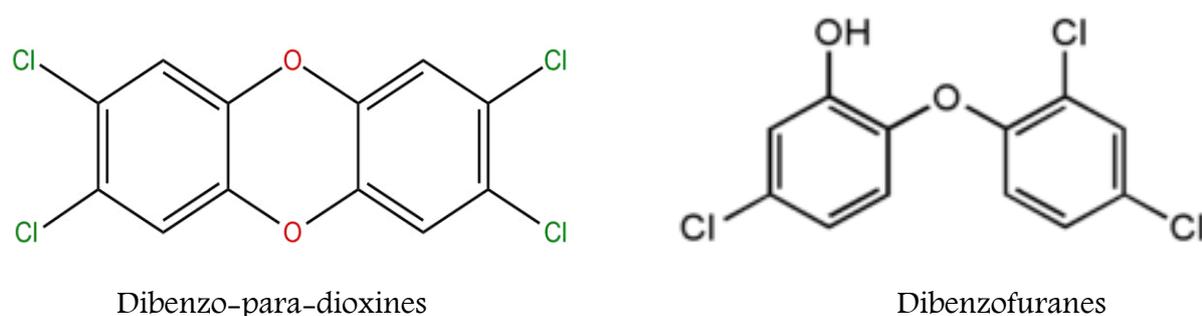


Il reste le problème, sans doute minimisé, des appareils fabriqués avant 1987 et mis en centres d'enfouissement avant l'existence des centres de stockage "nouvelle génération", donc moins sécurisés vis-à-vis des jus d'exploitation. En effet, la quantité totale de PCB non détruits, est non connue, et il existe des stocks importants dont la diffusion dans l'environnement reste notamment difficile à estimer. En raison de sa forte électrification et nucléarisation, la France détiendrait des quantités avoisinant les 45 000 tonnes (dont 500 000 transformateurs et condensateurs contenant des PCB) (Ministère de l'écologie/Agences de l'eau, 2007).

### 3.2. Les Polychlorodibenzo-dioxines (PCDD) et Les Polychlorodibenzo-furanes (PCDF)

Parmi les différents PE supposés, les **Polychlorodibenzo-dioxines (75 congénères)** et les **Polychlorodibenzo-furanes (135 congénères)** sont des sous-produits indésirés de réactions chimiques organiques impliquant le chlore directement, ou dans le cadre de processus de combustion de matières organiques, en présence de chlore.

#### 3.2.1. Structure physico-chimique des PCDD et PCDF



**Figure 11.** Structure chimique des dioxines (2,3,7,8-tétrachloro-1,4-dioxine (TCDD)) et des dibenzofuranes



### 3.2.2. Principales sources de PCDD et PCDF

<i>Propriétés physico-chimiques</i>	<i>Sources industrielles</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Très grande stabilité chimique</li><li>• Non hydrolysables</li><li>• Bonne résistance aux agents chimiques tels que acides, bases et oxydants</li><li>• Pouvoir lubrifiant ; Pouvoirs adhésifs et plastifiants</li><li>• Non solubles dans eau, glycérine, formol</li><li>• Solubles dans tous les solvants organiques et les huiles (liposolubles)</li><li>• Hydrophobes</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Incinérations des déchets urbains</li><li>• Cimenteries</li><li>• Métallurgie</li><li>• Blanchiment au chlore des pâtes à papier</li><li>• Procédés chimiques produisant des dérivés chloro-aromatiques</li></ul>

Figure 12: Propriétés physico-chimiques et usages industriels des PCDD/Furanes

### 3.2.3. Propriétés physico-chimiques

Parmi les PCDD et les PCDF, se trouvent les congénères les plus toxiques du fait de la en position latérale (2,3,7,8) des chlores.

La potentialité toxique de ces 17 congénères peut être exprimée en référence au composé ayant la plus grande toxicité, par l'intermédiaire du concept d'équivalent toxique (TEF, toxic equivalent factor). Il permet de donner une valeur toxicologique à un mélange de composés chimiquement proches et ayant le même mécanisme d'action, c'est-à-dire actifs sur le même récepteur. Défini à partir de résultats in vitro modulés par les données in vivo, le TEF est réévalué fréquemment par l'Organisation mondiale de la santé en fonction de l'évolution des connaissances.



Les températures de fusion augmentent avec le nombre d'atomes de chlore, de 122-123 °C pour la dibenzo-p-dioxine, à 325-326 °C pour l'octachloro-dibenzo-p-dioxine (OCDD).

Les dioxines présentent une très faible solubilité dans l'eau. L'hydrophobie de ces molécules est proportionnelle au nombre d'atomes de chlore. Elle se traduit par des valeurs élevées du log P (logarithme des coefficients de partage octanol/eau compris entre 4,3 et 8,2). Une évaluation mathématique des coefficients de partage pour l'ensemble des congénères de PCDD et de PCDF a été publiée {GOVERS, 1996 #7209}.

Les PCDD et les PCDF s'adsorbent fortement sur les particules dans l'air, le sol et l'eau. L'adsorption est d'autant plus forte que les congénères sont plus chlorés, ce qui entraîne une limitation des processus de biodégradation. Comme la désorption est difficile, ces polluants sont persistants dans l'environnement. La distribution sol/air montre cependant des variations saisonnières et journalières car elle dépend de la température. Ces variations concernent essentiellement les dérivés ayant moins de 6 atomes de chlore .

Les PCDD et les PCDF sont des composés peu volatils. Ils ont des valeurs de tension de vapeur d'autant plus faibles que le degré de chloration est élevé. Ceci rend négligeable leur dispersion sous forme gazeuse, mais n'exclut pas leur dispersion par voie aérienne en cas d'adsorption sur des particules (INSERM).

Les produits chimiques sont transformés de différentes façons dans l'environnement, l'hydrolyse et la photolyse étant les voies essentielles de la dégradation abiotique des xénobiotiques organiques.

La photolyse est une des rares voies de dégradation des PCDF et des PCDF dans l'environnement. L'absorption directe ou indirecte (par l'intermédiaire d'un sensibilisateur comme l'acide humique) d'énergie solaire (UV-B 290- 330 nm) conduit à des dégradations chimiques.

La photodéchloration concerne surtout les congénères les plus chlorés. Les atomes de chlore préférentiellement éliminés sont situés en position péri (1,4,6,9). Les positions latérales (2,3,7,8) étant épargnées, cette réaction de déchloration peut ainsi conduire à la formation de 2,3,7,8-TCDD à partir de l'OCDD.

Dans l'eau, la photodéchloration est beaucoup plus lente qu'en phase gazeuse et privilégie les atomes situés en positions latérales.

Quant à l'oxydation de la dibenzo-p-dioxine a également été étudiée et plusieurs produits de dégradation identifiés , comme par exemple formation d'acide 2-hydroxybenzoïque.



### 3.3. D'autres perturbateurs endocriniens potentiels: les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

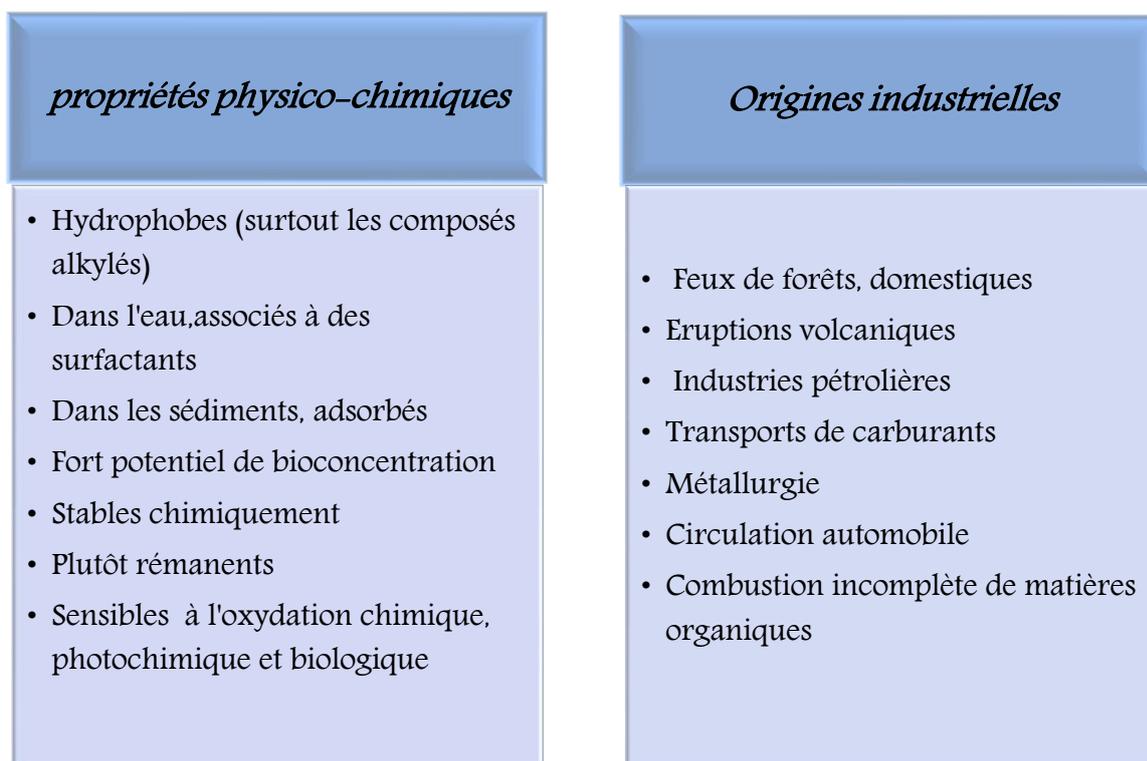
#### 3.3.1. Structure physico-chimique des HAP

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques dont la structure des molécules comprend au moins deux cycles aromatiques condensés. Ils représentent une classe de contaminants organiques relativement stables comportant au minimum deux noyaux aromatiques accolés et constitués essentiellement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Leurs propriétés physico-chimiques varient selon leur masse moléculaire et leur structure (figure 13). Les HAP composés de 2 à 7 noyaux aromatiques sont les plus présents dans l'environnement et les plus mobiles. Ces composés sont semi-volatils, tout comme les PCB, et sont en conséquence des contaminants ubiquistes de l'environnement. Les HAP sont des composés aromatiques, leur réactivité sera donc relativement faible. De plus, ils sont stables chimiquement et auront tendance à être rémanents. Certains sont néanmoins sensibles à l'oxydation chimique (anthracène, benzo(a)pyrène), photochimique et biologique. Le pyrène, composé formé par l'association de 4 cycles benzéniques, ainsi que 16 autres HAP, sont classés comme polluants prioritaires par l'US-EPA. Les HAP purs sont des solides habituellement colorés, cristallins à la température ambiante.

La structure spatiale des molécules est en générale plane, mais il existe également des molécules tridimensionnelles. Malgré leur structure chimique relativement proche, il est difficile de généraliser les propriétés physico-chimiques des molécules de cette famille.

Leur structure aromatique confère néanmoins deux propriétés communes à la majorité des HAP. Ce sont des composés chimiques d'un haut poids moléculaire présentant une forte hydrophobicité, leur degré d'hydrophobicité est fourni par le logarithme décimal du coefficient de partage octanol/eau ( $\log K_{ow}$ ).





**Figure 13.** Propriétés physico-chimiques et origines industrielles des HAP

Le log Kow, généralement assez élevé pour les HAP (>3), démontre un important potentiel d'adsorption sur les matières particulaires en suspension dans l'air et dans l'eau, ainsi qu'un fort potentiel de bioconcentration dans les organismes. Par ailleurs, les composés alkylés sont plus hydrophobes que les composés parents. Leur hydrophobicité implique qu'ils ne persistent donc pas facilement dans l'eau, sauf associés à des surfactants ou adsorbés sur des particules en suspension ou dans le sédiment. Ils sont surtout présents dans les sols où ils peuvent être stockés ou circuler (adsorption, percolation, bioturbation), mais ils peuvent contaminer l'air en phase vapeur, et être présents dans l'eau ou dans le bio film car ils peuvent passer d'un compartiment environnemental (eau, air, sol) à l'autre aisément.

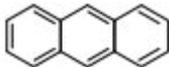
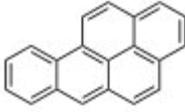
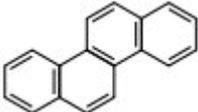
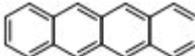
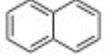
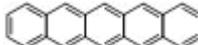
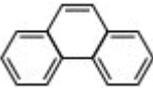
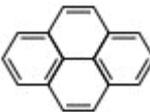
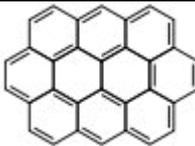
L'augmentation de leur poids moléculaire est directement corrélée avec une augmentation du log Kow, ce qui indique une augmentation du caractère apolaire de ces molécules.

A cette faible solubilité dans l'eau est associée une faible volatilité, sauf pour certains HAP, de poids moléculaire plus faible, tels que le naphthalène.



Molécule	Pyrène	Formule chimique	C16H10
Masse moléculaire (g/mol)	202	Solubilité dans l'eau (25°C, mg/L)	0,16
Point de fusion (°C)	150	log Kow	5,18
Point d'ébullition (°C)	393		

**Tableau 1:** Tableau récapitulatif des principales données physico-chimiques concernant le pyrène

<u>Anthracène</u>		<u>Benzo[a]pyrène</u>	
<u>Chrysène</u>		<u>Coronène</u>	
<u>Corannulène</u>		<u>Tétracène</u>	
<u>Naphtalène</u>		<u>Pentacène</u>	
<u>Phénanthrène</u>		<u>Pyrène</u>	
<u>Triphénylène</u>		<u>Ovalène</u>	

**Tableau 2:** Structure chimique des HAP définis comme polluants prioritaires par l'US EPA



### ***3.3.2. Principales sources de HAP***

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques produits lors des réactions de pyrolyse de la matière organique et lors des processus de pyrosynthèse de molécules organiques. La majorité des HAP présents dans les milieux naturels sont d'origine anthropique et sont produits lors de tels processus, utilisés dans le domaine de l'industrie ou de la production d'énergie. Les processus de diagenèse et de biosynthèse entraînent la formation de très faibles quantités d'HAP (INERIS. 2005).

La grande diversité des sources de production et la quantité importante d'HAP libérée par les activités humaines, confèrent un caractère ubiquiste à la distribution des ces composés dans l'environnement. Leurs propriétés physico-chimiques, et principalement leur hydrophobicité, les conduisent à s'accumuler préférentiellement dans les sols et les sédiments aquatiques. Les niveaux de contamination observés dans ces compartiments naturels sont très variables selon les composés mais peuvent être étroitement corrélés avec la proximité et la taille des agglomérations urbaines.

Principalement générés par combustion incomplète de la matière organique (origine pyrolytique), ou lors de la diagenèse en milieu sédimentaire profond (hydrocarbures pétroliers formés par lente maturation de la matière organique sous le gradient géothermique), les HAP peuvent être classés selon deux sources principales, composées de trois classes principales de HAP (les composés pyrolytiques, diagénétiques et pétroliers):

- ✓ **des sources naturelles:** HAP pyrolytiques pouvant être générés par des feux de forêt ou de prairie ou lors d'éruptions volcaniques; fuites de réservoirs naturels de pétrole pouvant introduire des HAP pétroliers dans la mer

- ✓ **des sources anthropiques,** considérées comme sources d'introduction majeures de HAP dans l'environnement, qui se décomposent en sources pyrolytiques (combustion incomplète de la matière organique à haute température due à l'activité industrielle ou à des émissions domestiques) et en sources pétrogéniques (hydrocarbures pétroliers pouvant être introduits par l'intermédiaire des plates-formes pétrolières ou lors du transport du carburant)(Budzinski et al. 1997; Geffard 2001).



**En conclusion,** des études *in vitro* ont contribué à mettre en évidence l'existence d'interactions entre ces composés potentiellement PE et des récepteurs hormonaux; certains de leurs mécanismes d'action commencent à être compris mais les effets des PE sur la santé humaine restent des sujets à controverse, notamment leur effet à faible dose (Myers et al. 2008).

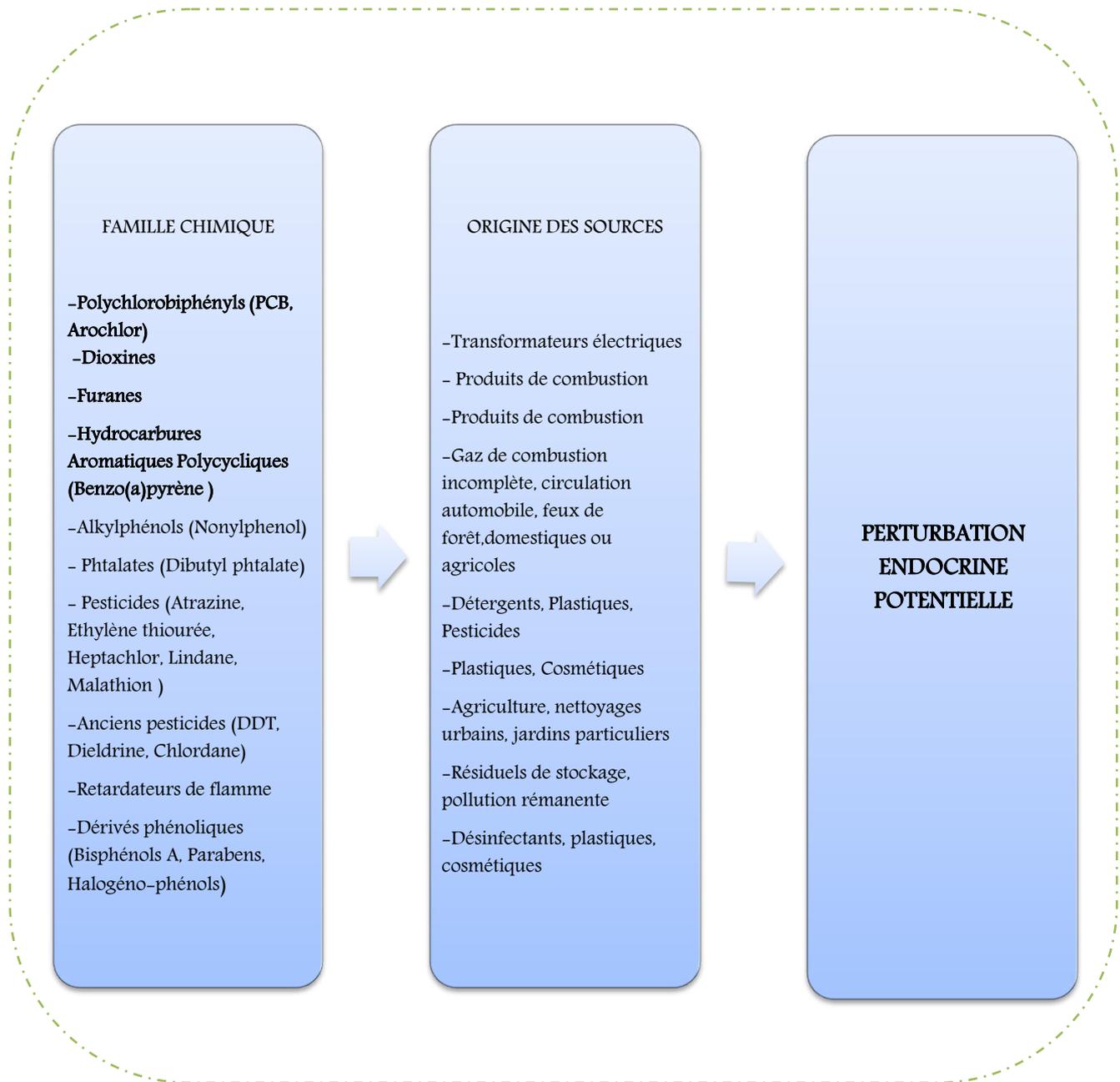
De nombreux ouvrages et synthèses sont désormais à disposition de la communauté scientifique et de la société civile (vom Saal et al. 2008; Barthe 2011),(Myers et al. 2008; Frye et al. 2012)) mettant en avant de nouveaux concepts devant la complexité des interférences en jeu.

- spécificités et différences de sensibilité entre les espèces
- biométrie
- variabilités des sources
- durée et fenêtres d'exposition,
- niveaux de contamination
- mélanges de substances.

**Quels sont les mécanismes d'action en jeu ?**



**PERTURBATEURS ENDOCRINIENS :  
SOURCES ET ORIGINES**



**Figure 14:** Synthèse des groupes de composés chimiques susceptibles d'induire entraînant une perturbation endocrine et de leurs origines respectives,



#### 4. Les Perturbateurs endocriniens: quels modes d'action ?

L'altération potentielle de la fonction de reproduction par certaines substances peut être envisagée tant à l'échelle macroscopique qu'à l'échelle moléculaire (récepteurs nucléaires), chaque dysfonctionnement, à un niveau donné, pouvant être considéré comme une **alarme précoce** de perturbations potentielles au niveau populationnel.

D'après (Multigner and Kadhel 2008), les PE peuvent interférer avec "la production, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles", et ce, en gênant ou en bloquant le mécanisme de production ou de régulation des hormones ou des récepteurs, modifiant ainsi les concentrations d'hormones présentes dans l'organisme. Contrairement aux hormones naturelles endogènes rapidement excrétées, les contaminants de type perturbateurs endocriniens sont plus persistants et plus hydrophobes, et plus facilement bioaccumulables au sein des organismes (Birkett and Lester 2003) de par leur caractère lipophile. En revanche, les perturbateurs endocriniens présentant des affinités plus faibles avec les récepteurs des hormones endogènes, des concentrations plus importantes sont donc nécessaires pour altérer le fonctionnement du système endocrinien

Par ailleurs, les PE sont susceptibles 1) de perturber la synthèse des ligands de récepteurs nucléaires, comme l'aromatase, enzyme clé de la synthèse de l'œstradiol à partir de la testostérone, cible bien connue de certains PE (Marohn et al. 2008), 2) altérer la liaison aux protéines de transport comme la SHBG (*sex hormone binding globulin*) ou la transthyrétrine (protéine de transport de la thyroxine). Les PE peuvent aussi modifier la clairance des ligands de récepteurs nucléaires en activant des enzymes du métabolisme comme *CYP1A1* (gène cible du récepteur de la dioxine), *CYP3A4* et *CYP2B6* (gènes cibles des récepteurs PXR (pregnan X receptor) ou encore celui du récepteur CAR (constitutive androstane receptor) et influencer ainsi la **concentration** en récepteurs nucléaires (KASTNER et al. 1990). Par exemple, les œstrogènes contrôlent l'expression de certains récepteurs nucléaires comme PR et RAR  $\alpha$  (LAGANIÈRE et al. 2005) et une perturbation œstrogénique peut entraîner par retour la perturbation d'autres systèmes hormonaux. Ainsi, les ligands du récepteur à l'Aryl hydrocarbure (AhR) en activant le récepteur, lui permettent de devenir nucléaire, de s'associer aux récepteurs aux œstrogènes (ER) et à ceux des androgènes (AR) afin d'accélérer leur dégradation par le protéosome (OHTAKE et al. 2007)

Enfin, les PE régulent l'expression de gènes importants pour le développement du tractus reproducteur (Gregoraszczyk and Ptak 2013) et participent aux modifications épigénétiques des organismes.



#### 4.1. Les récepteurs en jeu

Les xénobiotiques peuvent donc activer différentes catégories de récepteurs (figure 15):

- ✓ les récepteurs des xénobiotiques au sens strict: récepteur AhR (Récepteur à l'Aryl hydrocarbure) de la dioxine et des hydrocarbures aromatiques polycycliques
- ✓ les récepteur PXR (pregnan X receptor) capables de se lier à des médicaments et des pesticides
- ✓ les récepteur CAR (constitutive androstane receptor )
- ✓ les récepteurs de composés endogènes comme les récepteurs hormonaux susceptibles d'être modulés par ces xénobiotiques (ER  $\alpha$  et  $\beta$ , AR).

Les récepteurs nucléaires (codés par 48 gènes distincts chez l'Homme) sont regroupés en plusieurs sous-familles qui incluent:

- les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TR)
- à l'acide rétinoïque (RAR)
- à la vitamine D (VDR), à l'ecdysone (EcR)
- les récepteurs contrôlant l'activation de la prolifération des péroxysomes (PPAR)
- ainsi que les récepteurs des xénobiotiques comme PXR ou CAR
- les récepteurs aux rétinoïdes (RXR)
- les récepteurs aux hormones stéroïdiennes telles que les glucocorticoïdes (GR), les androgènes (AR), les minéralocorticoïdes (MR), les progestatifs (PR, *Progesterone Receptor*), les œstrogènes (ER), ainsi que les récepteurs orphelins comme ERR (*Estrogen-Related Receptor*) et SHP (*Short Heterodimer Partner*) (ESCRIVA et al. 2000; (ARANDA and PASCUAL 2001)

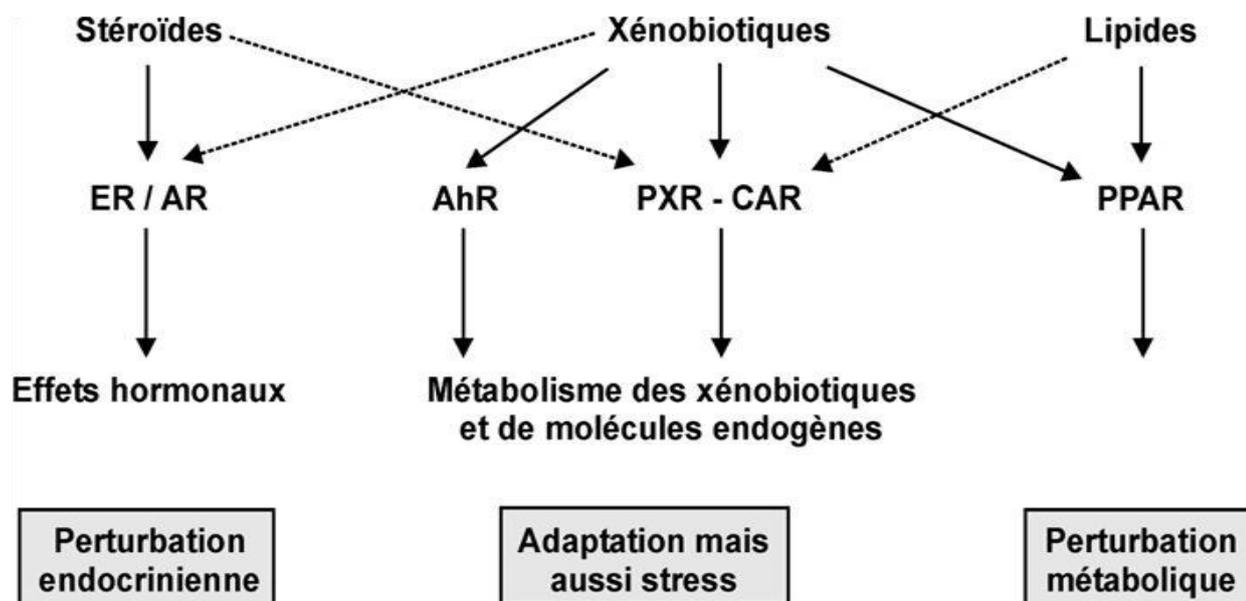
Ces récepteurs nucléaires sont classés en six groupes selon une nomenclature phylogénique de forme NR XYZ où X représente la sous-famille, Y indique le groupe et Z, le gène (COMMITTEE. 1999).

Les récepteurs nucléaires sont au cœur de la régulation de nombreux réseaux de gènes impliqués dans :

- la prolifération et la différenciation cellulaire
- le développement
- l'homéostasie
- le métabolisme (GRONEMEYER et al. 2004)



Leur dysfonctionnement, mutation ou (in)activation inappropriée, peut conduire à des pathologies de la reproduction ou du métabolisme comme les cancers hormono-dépendants, la stérilité, le diabète ou l'obésité (SWEDENBORG et al. 2009). Les récepteurs nucléaires sont des protéines modulaires composées de plusieurs domaines dont un domaine de liaison au ligand qui joue un rôle important dans leur activation. De nombreux perturbateurs endocriniens peuvent se lier à des récepteurs nucléaires et conduire à leur activation ou inactivation.



**Figure 15:** activation illégitime des récepteurs à des ligands endogènes par des facteurs environnementaux, d'après (Massaad and Barouki 1999)

Les récepteurs des xénobiotiques comme PXR ou AhR ont pour fonction principale **l'adaptation de l'organisme à l'afflux de xénobiotiques** puisqu'ils sont responsables de l'induction de systèmes enzymatiques permettant leur élimination.

En ce qui concerne les récepteurs à des ligands endogènes, leur activation illégitime par des facteurs environnementaux, conduit à une perturbation endocrinienne ou métabolique (figure 15). Ils sont donc indissociables des phénomènes de détoxification et de stress associé.

La toxicité d'un xénobiotique résulte soit de l'interaction avec son récepteur légitime, soit de l'interaction avec des récepteurs de composés endogènes; les mécanismes d'action sont donc difficiles à classer, d'autant plus que ces substances chimiques présentent souvent des affinités très inférieures à celle de l'hormone naturelle.



La liaison aux **récepteurs nucléaires** suivie de l'activation (ou de l'inhibition) ne constitue pas le seul mécanisme d'action à l'origine d'un effet toxique puisque certains ligands endogènes des récepteurs nucléaires (17 $\beta$ -œstradiol), peuvent aussi se fixer sur des **récepteurs membranaires**. D'ailleurs, certains récepteurs nucléaires peuvent se localiser sous la membrane plasmique ou dans le cytoplasme et y réguler plusieurs paramètres cellulaires, sans pour autant agir sur la transcription de gènes cibles. La présence de ces mécanismes "non-génomiques" est bien établie, mais leur fonctionnement et en particulier leur utilisation illégitime par des contaminants reste à déterminer.

#### **4.1.1. Les récepteurs des œstrogènes (ER)**

Les récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$  et  $\beta$ , NR3A1 et NR3A2) sont les récepteurs de l'hormone sexuelle féminine, l'œstradiol, jouant un rôle déterminant sur une grande variété de tissus (glande mammaire, utérus, moelle osseuse, os et système cardiovasculaire), (Wildiers et al. 2008). ER $\alpha$  est surtout exprimé dans l'utérus, le foie, les reins et le cœur alors que ER $\beta$  l'est plutôt dans l'ovaire, la prostate, les poumons, le tractus intestinal et les systèmes hématopoïétique et nerveux central (Kuiper et al. 2008). **En ce qui concerne les poissons**, les récepteurs ER $\alpha$  sont activés différemment en fonction des espèces, activation parfois faible pour E<sub>2</sub> et importante pour les xénobiotiques. Quand les deux récepteurs sont co-exprimés, ER $\alpha$  possède une action inhibitrice sur la capacité de ER $\beta$  à activer ses gènes cibles (COUSE et al. 1997). De même, ER $\alpha$  a été montré comme pouvant bloquer l'effet activateur de ER $\beta$  sur la prolifération cellulaire dans le sein, l'utérus ou la prostate (PETTERSSON et al. 2000)

La grande majorité des ligands environnementaux à ces récepteurs sont des molécules agonistes et ont une meilleure affinité pour ER $\alpha$ . Cependant, certaines molécules présentent une meilleure affinité pour ER $\beta$  comme les phyto-œstrogènes (génistéine), des benzophénones (benzophénone 1 ou 2), des biphénols. La complexité s'accroît avec les substances possédant une activité agoniste sur ER $\alpha$  et antagoniste sur ER $\beta$ , comme les pesticides (méthoxychlore, chlordécone) (Le Maire et al., 2010).

Ce comportement de nombreuses molécules toxiques comme les SERM (*selective estrogen receptor modulator*) peuvent avoir des **effets tissus-dépendants marqués**, rendant la transposition *in vitro* / *in vivo* très complexe.



#### ***4.1.2. Les récepteurs des androgènes (AR)***

Le récepteur des androgènes (AR, NR3C4) est l'accepteur des hormones sexuelles mâles, la testostérone et son métabolite, la dihydrotestostérone. L'AR est principalement exprimé dans le testicule mais il est aussi présent dans la prostate, les glandes surrénales, les reins, le cerveau et l'hypophyse. Le rôle du récepteur AR dans les organes mâles est très similaire à celui des récepteurs ER dans les organes femelles. Les androgènes humains comme la testostérone ou la dihydrotestostérone sont des agonistes.

**Chez les poissons**, le système de réponse aux androgènes est plus complexe car la 11-ketotestostérone (11KT) agit comme second ligand, en plus de la dihydrotestostérone. D'autre part, la majorité des espèces présentent deux récepteurs des androgènes AR-A et AR-B dont les pharmacologies semblent être distinctes (Douard et al. 2008) La grande majorité des ligands environnementaux de ce récepteur sont des molécules antagonistes (Paris et al, 2000; Korner et al., 2004). Très peu d'androgènes environnementaux sont des agonistes, excepté le retardateur de flamme bromé TBECH (KHALAF et al. 2009).

#### ***4.1.3. Les récepteurs des dioxines (AhR)***

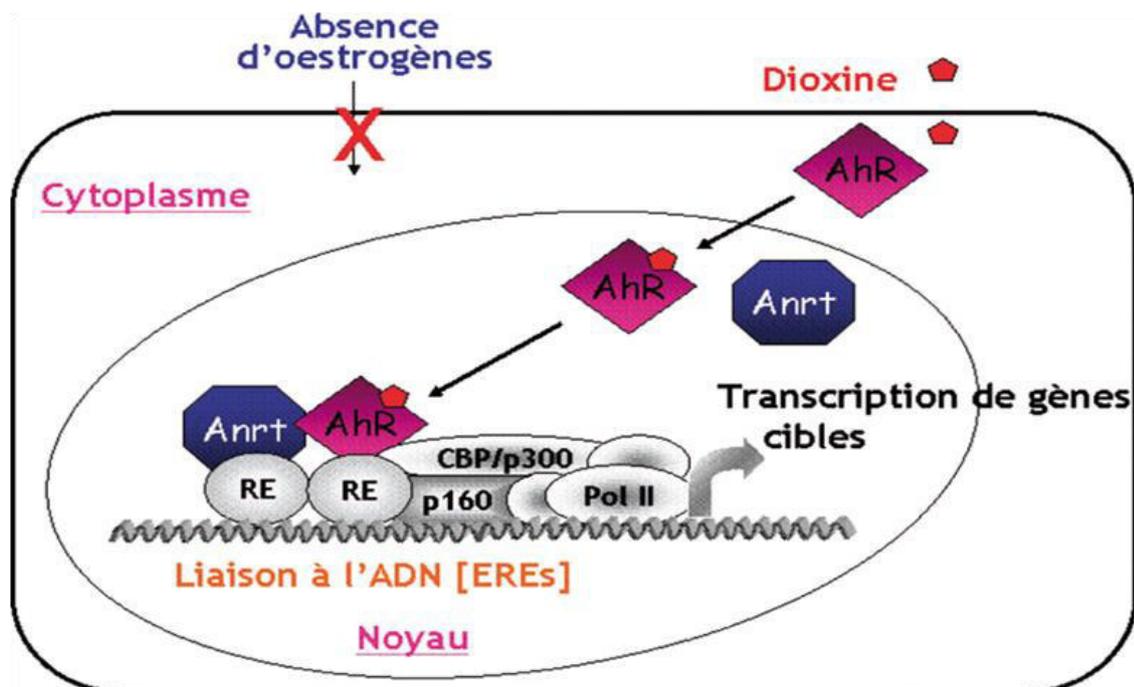
En raison de l'implication des œstrogènes dans de nombreux cancers, notamment le cancer du sein, de nombreux travaux ont porté sur l'interaction entre dioxines (ou HAP) et la voie de signalisation des œstrogènes. (Safe et al. 2010; Arukwe et al. 2000).

Le couple AhR/dioxine présente des effets fortement anti-œstrogéniques sur différents gènes-cibles par interaction directe avec ER (Wormke et al., 2003), ce qui rend d'ailleurs les récents résultats difficiles à interpréter en ce qui concerne l'augmentation de fréquence du cancer du sein dans certaines populations suivies. De plus, ces effets anti-œstrogéniques pourraient être indirects. Par exemple, AhR interagit avec le corépresseur SMRT, ce qui libère l'activité transactivatrice du récepteur rétinolique (Widerak et coll., 2005). Ce récepteur est considéré comme s'opposant aux effets prolifératifs du ER dans les cancers du sein (Darro et al, 1998; Afonja et al., 2002).



Cependant, des travaux récents indiquent que les relations entre AhR et ER sont assez complexes. Ainsi le groupe de Kato a montré dans un premier temps que le AhR activé pouvait interagir avec le récepteur ER, en l'absence d'hormones, et induire ainsi des gènes œstrogéno-dépendants (Ohtake et al, 2003). Dans un deuxième temps, ce groupe a montré que le récepteur AhR exerçait à l'égard du ER une activité "ubiquitine E3 ligase" et orientait le ER vers le protéasome, favorisant ainsi sa dégradation (Ohtake et al, 2007). Il résulte de ces derniers travaux que les dioxines perturbent considérablement les régulations hormonales œstrogéniques :

- en présence d'hormones, ces polluants exercent un rôle antagoniste
- en absence d'hormone, ils sont capables d'induire transitoirement des gènes hormono-dépendants (figure 16).



**Figure 16:** Activation illégitime de la voie de signalisation du RE (récepteur des œstrogènes) par le récepteur de la dioxine activé (d'après Massaad et Barouki, 1999).

Chez de nombreux poissons, deux récepteurs AhR1 et 2 ont été caractérisés et chez les Salmonidés en particulier, 4 isoformes distinctes ont été rapportées: AhR2 alpha, 2 beta, 2 gamma et 2 delta (Pollenz and Buggy, 2006; Wormke, 2003).

Outre les interactions entre les récepteurs AhR et ER, les dioxines peuvent modifier le métabolisme des œstrogènes et l'orienter vers la formation de composés toxiques. Différentes voies métaboliques peuvent conduire à la synthèse de composés génotoxiques à partir d'œstrogènes naturels. La voie principale conduit à la synthèse de dérivés hydroxylés de l'E<sub>2</sub>, les catéchols



(Coumoul et Barouki, 2002), composés majoritairement synthétisés par des cytochromes P450 (CYP 450) mais aussi par d'autres enzymes comme l'aromatase ou certaines peroxydases. En particulier, une exposition à la TCDD chez le poisson zèbre, a entraîné une induction des cytochromes P450 A et B présents dans le cerveau, montrant ainsi leur rôle sur le développement du cerveau et la programmation du comportement sexuel, donc sur la régulation de la fonction neuroendocrine (Groh, 2006)

Apparemment, les dioxines n'influent pas directement sur l'expression du gène de l'aromatase cérébrale, par la voie classique de transduction des signaux impliquant le AhR. Cependant, on observe qu'une double exposition, en présence de deux types de récepteurs, entraîne une réduction de l'expression de l'aromatase cérébrale; la TCDD peut donc avoir une action oestrogénique par induction de l'aromatase, en présence de E<sub>2</sub> dans le milieu; par contre, son action devient anti-oestrogénique par répression des gènes de l'aromatase, en absence de E<sub>2</sub> (Cheshenko et al. 2008; Sébert et al. 2008) En ce qui concerne l'anguille, il semble que cette espèce ne possède qu'un seul ligand aux dioxines (Sébert et al. 2008)

#### **4.2. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires**

La plupart des récepteurs nucléaires sont présents dans le noyau cellulaire, où ils régulent la transcription des gènes. Il existe certaines exceptions comme le récepteur des glucocorticoïdes, ou celui des androgènes qui sont localisés dans le cytoplasme. En absence de ligand, la liaison à celui-ci induisant la translocation du récepteur au noyau. En outre, des études récentes suggèrent que certains récepteurs, même en présence de leur ligand, peuvent agir dans le cytoplasme d'une façon non génomique en interagissant avec des cibles dont l'identité reste à clarifier.

De nombreuses données fonctionnelles indiquent qu'en absence de leur ligand, la plupart des récepteurs nucléaires sont fixés à l'ADN, reconnaissent des corépresseurs transcriptionnels et bloquent la transcription. C'est le cas par exemple de PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor) qui forme un hétérodimère avec RXR et qui réprime la transcription en absence de ligand. Cependant, plusieurs analyses pangénomiques récentes, fondées sur la méthode d'immunoprécipitation de chromatine couplée à du séquençage massif, remettent quelque peu en cause la généralité de ce mécanisme et suggèrent que cela ne se produit pas pour tous les gènes cibles. Ce mécanisme ne s'applique pas aux récepteurs stéroïdiens comme ER, AR ou GR (récepteurs aux glucocorticoïdes) qui ne semblent pas être présents dans le noyau en absence de ligand.

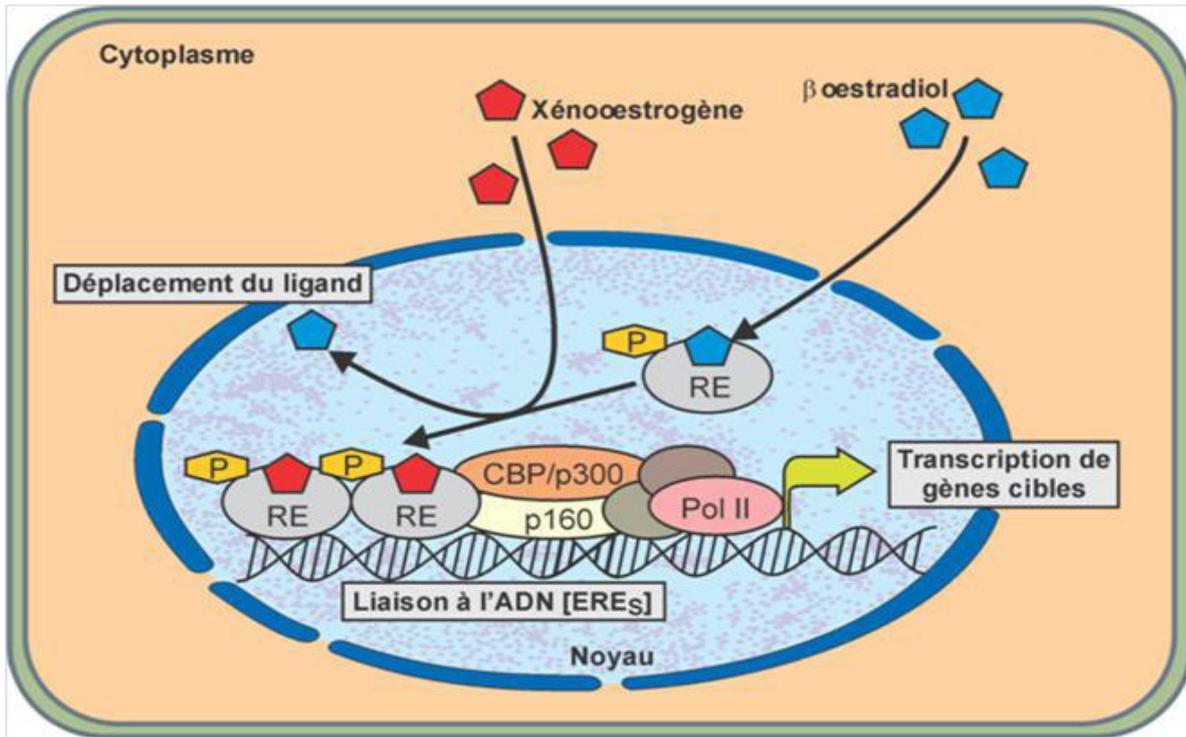


En outre, il existe de nombreux coactivateurs transcriptionnels des récepteurs nucléaires, chacun d'entre eux présentant une sensibilité différente à des changements de la surface du récepteur, induits par des ligands différents ((Shang and Brown 2002; Hass et al. 2007)). Ces coactivateurs ayant des distributions tissulaires différentes, on arrive ainsi à comprendre comment un ligand donné peut activer un récepteur dans un tissu A donné mais pas dans un tissu B différent. Dans A, le récepteur lié au ligand aura une conformation reconnue par un coactivateur présent dans ce tissu, alors que dans le tissu B, ce coactivateur ne sera pas présent et donc le récepteur sera inactif. Ceci débouche sur le concept de SERM (*selective estrogen receptor modulator*), ligands modulateurs du récepteur des œstrogènes qui peuvent être sélectifs d'un tissu donné.

Ce concept est bien établi et il a pu être appliqué à de nombreux autres récepteurs (AR, PPAR, TR...) au point d'être à présent généralisé à l'ensemble de la superfamille. On parle donc de SNuRM : *Selective Nuclear Receptor Modulators*. Ce concept est fondamentalement important pour l'étude des molécules toxiques et en particulier des **perturbateurs endocriniens**. Ces molécules semblent pouvoir être considérées comme des SNuRM ou SERM puisque chacune d'entre elles peut induire une conformation légèrement différente du récepteur qu'elle va pouvoir fixer, et entraîner ainsi un panel d'effets dans différents organes spécifiques de chaque molécule. En effet, la plupart des perturbateurs endocriniens ne présentent pas une cible unique mais sont capables de reconnaître plusieurs récepteurs, avec des affinités différentes. La gamme des effets générés par des molécules différentes est donc très vaste et cela explique pourquoi **il est très compliqué de pouvoir faire un lien entre les mécanismes d'action d'une molécule *in vitro* et ses effets *in vivo***.

En conclusion, deux molécules peuvent, *in vitro*, être capables de se fixer au même récepteur avec des affinités comparables mais peuvent avoir, *in vivo*, une gamme d'effets différents, même si leur toxicocinétique et leur métabolisme sont très proches.





**Figure 17:** Mécanisme des xénoestrogènes face aux oestrogènes endogènes dans une cellule

Globalement, la notion d'interaction entre gènes et environnement reste très peu explorée dans le cadre de la reprotoxicité. Pourtant, certains PE (notamment des phtalates), révèlent des effets très différents d'une espèce à l'autre et parfois même entre deux lignées différentes d'une même espèce. Il existe donc **un impact lié aux polymorphismes génétiques**.

A ce titre, les études ayant abordé **les effets de mélanges complexes** permettent de dégager deux grandes notions.

1 → des " PE de la même catégorie " ont des effets globalement additifs ou cumulatifs. Ainsi, à une dose donnée, et pris isolément, plusieurs composés peuvent ne pas avoir d'effet mais, réunis, ceux-ci peuvent perturber le développement d'un tissu. Bien que dans une certaine mesure cet effet puisse être prévu par des modèles élaborés prenant en compte les effets des composés isolés en fonction d'une gamme complète de doses, de telles expériences soulèvent la question de l'effet des faibles doses. Une des illustrations les plus probantes qui alimente ce débat est l'effet de substances considérées comme "anti-androgéniques ". Il a été montré que la flutamide, la vinclozoline ou la prycymidone peuvent, à doses faibles, ne pas modifier la distance anogénitale, un critère de la masculinisation, mais que le mélange de ces substances diminue significativement ce paramètre (Hass et al. 2007). De même, chez le fœtus de rat, trois phtalates différents qui individuellement



n'induisent aucune hypospadias peuvent, en combinaison, induire des hypospadias chez la moitié des ratons (INSERM 2011; Christiansen et al. 2012)). Il est donc important de connaître le mode d'action d'une substance potentiellement reprotoxique pour savoir si les effets de celle-ci risquent de s'additionner à ceux d'autres perturbateurs reprotoxiques agissant par le même mode d'action.

2→ les mélanges plus complexes impliquant des PE considérés comme de catégories différentes (avec des mécanismes d'actions différents) semblent avoir des effets beaucoup moins prévisibles et sont moins bien compris (Christiansen et al. 2012). En effet, (Eustache et al. 2009) ont administré un mélange de génistéine (phyto-œstrogène) et de vinclozoline (fongicide utilisé en viticulture) à des doses "faibles" ou "fortes" à des rats depuis la vie foetale jusqu'à l'âge adulte. Dans ces conditions, le mélange à doses faibles peut diminuer plus fortement le nombre de spermatozoïdes que le mélange à doses fortes. Par ailleurs, il faut noter que, à doses faibles, le gavage avec un seul de ces composés n'altère pas ce paramètre. Cependant, ce type d'exposition artificielle est loin de reproduire la complexité de la multitude de substances potentiellement reprotoxiques auxquelles les organismes peuvent être exposés. Très peu d'études ont abordé la question de l'exposition à un mélange complexe de polluants environnementaux, reflétant une situation réelle.

Dans certains cas, des substances peuvent avoir des effets qui ne sont pas pathologiques à l'échelle individuelle mais qui sont délétères à l'échelle de la population. C'est en particulier le cas d'un effet sur le sex-ratio. À titre d'exemple, un effet possible de polluants persistants sur le sex-ratio au sein de l'espèce humaine, dont certains sont des perturbateurs endocriniens, tels que le plomb ou la dioxine a été rapporté (INSERM 2011).

### 4.3. Autres voies suspectées

#### 4.3.1. Influence du parasitisme

Certains travaux (Hecker and Karbe 2005) montrent un aspect rarement considéré lors des études écotoxicologiques, celui de l'induction naturelle de perturbations endocrines par des parasites sur leur hôte. Par exemple, le parasite *Ligula intestinalis* démontre clairement son induction en tant que perturbateur endocrinien sur le poisson *Rutilus rutilus*. En effet, les femelles infectées présentent des taux plasmatiques en oestradiol très faible et l'expression de mRNA Vg est sévèrement réduite (Trubiroha et al. 2010).

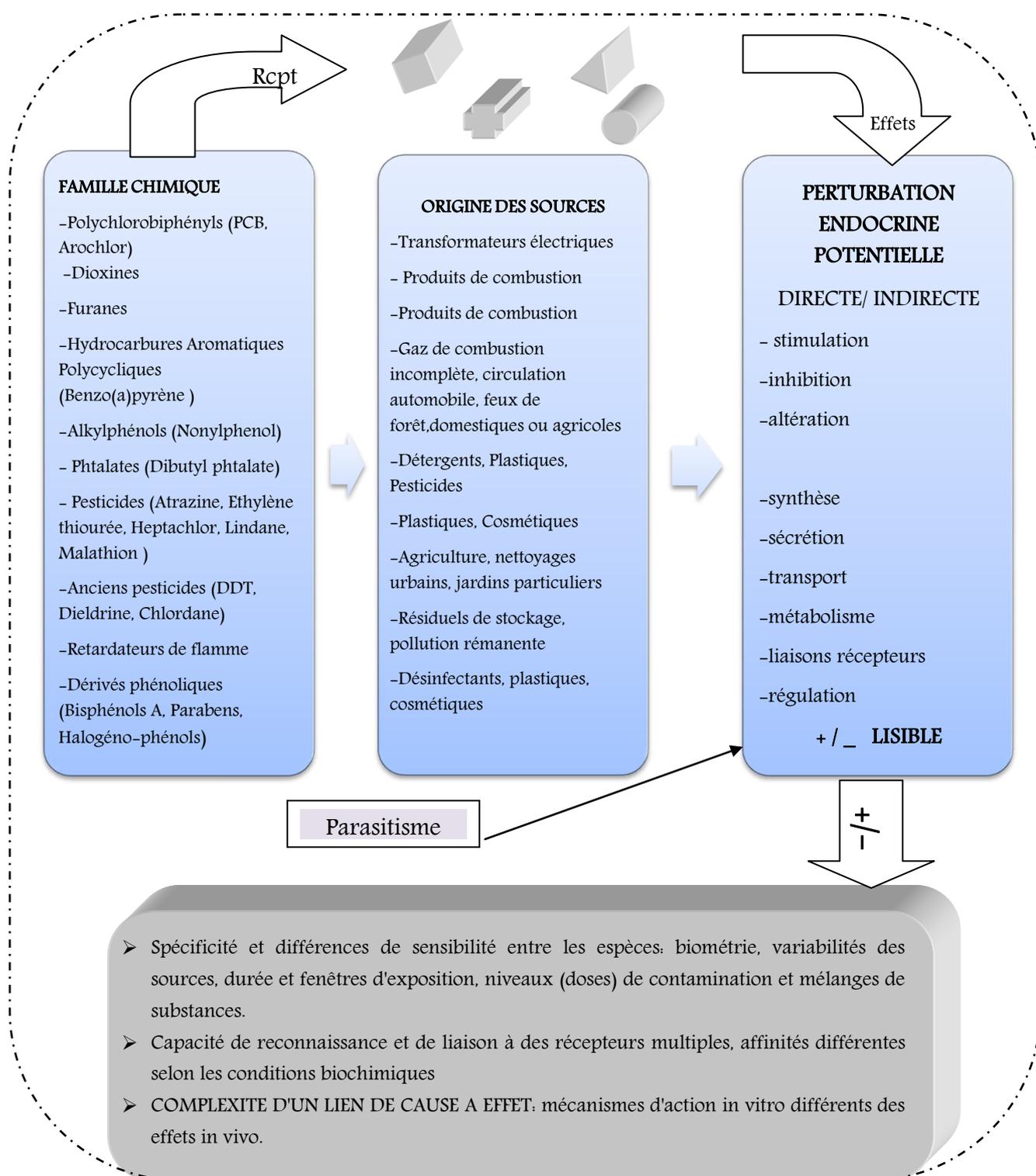


#### *4.3.2. Influence des évènements hypoxiques*

Des événements hypoxiques semblent pouvoir entraîner également une perturbation endocrinienne (Evrard 2009). En effet, des inhibitions du développement gonadique conduisant à une diminution de la production et de la qualité du sperme ont été observés. En parallèle, l'exposition à des hypoxies chroniques affectent les oeufs la survie des larves, en réduisant le succès de la fertilisation et de l'éclosion. En conséquence, la qualité et la fitness des juvéniles sont réduites (Wu et al. 2009; Wu et al. 2003; Landry et al. 2007; Thomas et al. 2007).



**PERTURBATEURS ENDOCRINIEN-SNuRM**  
**SOURCES, MECANISMES D'ACTION, EFFETS**



**Figure 18:** Synthèse des sources potentielles d'exposition à des PE, mécanismes d'action connus ou suspectés en jeu. Légendes: Récepteurs: Rcpt; Effets induits;



Devant cette complexité des mécanismes en jeu, quels sont les outils permettant de diagnostiquer sans ambiguïté une perturbation endocrinienne chez un organisme?

## **II/- Les perturbateurs endocriniens et l'évaluation du risque pour l'environnement. quels outils?**

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont aujourd'hui connus du grand public en raison des risques potentiels qu'ils peuvent générer sur la population humaine (WHO 2012; Programme). 2013; Kidd et al. 2007). Comme nous venons de l'apercevoir, il reste cependant difficile d'établir des liens clairs de cause à effet et de les extrapoler de manière juste au niveau populationnel (Ankley et al. 2010; Miller and Ankley 2004), et ce, en raison de la complexité des mécanismes biochimiques en jeu (Diamanti-Kandarakis et al. 2009 )

En raison de ces difficultés d'appréhension de la toxicité et des risques écotoxicologiques, différents outils analytiques ont été développés, de plus en plus perfectionnés et fiables à des doses de plus en plus faibles.

Cependant, il est nécessaire aujourd'hui de coupler analyses chimiques et analyses biologiques afin d'affiner l'évaluation du risque écotoxicologique et donner une cohérence aux dosages chimiques et biologiques, par rapport à l'ensemble des facteurs à prendre en considération au sein d'un écosystème (Sanchez et al. 2010) INERIS, 2009).

A ce titre, l'évaluation du risque environnemental est en pleine évolution au regard des dernières études faisant état d'une absence de relation linéaire entre doses et réponses toxicologiques à de faibles concentrations: il apparaît en effet que des PE peuvent agir de manière additionnelle à des concentrations où ils sont inoffensifs pris isolément (Eustache et al. 2009; P. Matthiessen and I. Johnson 2007). Ainsi, (Brian et al. 2005) montre, sur la truite, qu' un mélange de substances, sans reprotoxicité à faible dose et individuellement, entraînent une réponse toxique en mélange. Ce type d'induction de réponse toxicologique peut en outre s'avérer plus ou moins long en fonction des espèces testées (Liney et al. 2006) phénomène plus prévalent aussi à certains stades de développement (Jobling et al. 2005). Il a été montré par ailleurs, que l'impact d'un mélange n'était pas déductible du cumul des effets de chaque substance constituant le mélange (Eustache et al. 2009).

Les méthodes analytiques doivent donc répondre aux différents modes d'action des PE (Sultan et al. 2001) et considérer les niveaux suivants:



- la biosynthèse des hormones stéroïdes
- la liaison à des protéines de transport
- le métabolisme intracellulaire (sulfatase, aromatase, 5 $\alpha$  réductase, stéroïde déshydrogénase par exemple)
- la liaison hormone-récepteurs
- la liaison du complexe hormone-récepteur à l'ADN correspondant à la machinerie transcriptionnelle et à l'expression spécifique de gènes

Ainsi, un certain nombre d'outils bio-analytiques de caractérisation de contaminants et des méthodes de biosurveillance basées sur une approche multi-biomarqueurs ont-ils été développés. Les outils disponibles pour évaluer le(s) risque(s) relatifs à l'exposition à des perturbateurs endocriniens et à leurs effets potentiels en milieu aquatique sont de deux types.

- les analyses chimiques, caractérisant une contamination
- une batterie de biomarqueurs ou/et de bioessais susceptibles de caractériser une exposition, des effets biologiques.

Les premières analyses donnent des niveaux d'imprégnation dans les sédiments, les eaux, le vivant, mais les concentrations restent des données à manier avec prudence, la toxicité et l'écotoxicité n'étant pas dose-dépendante; les paramètres biométriques, les fenêtres d'exposition, les facteurs environnementaux globaux, et les interactions entre les contaminants ne pouvant être lus au travers de ces dosages.

Les seconds permettent d'assurer un monitoring le plus proche possible des conditions environnementales et surtout sont capables de lui donner un sens écotoxicologique. Chaque espèce biologique utilisée comme sentinelle ou chaque espèce chimique considérée répondant de manière différente; il convient d'adapter les biomarqueurs à la pertinence des réponses recherchées.

Cette approche multi-biomarqueurs constitue une approche prometteuse dans le sens où elle permet de croiser des informations et donc de les rendre plus pertinentes et surtout plus proches des systèmes écologiques.



## 1. Des analyses chimiques spécifiques et quantitatives.

Du point de vue analytique, chaque famille chimique est dosée selon une méthode spécifique, le plus souvent adaptée à plusieurs matrices, (Birkett and Lester 2003; Seiber 1999).

Il existe d'autre part des méthodes multi-résidus ayant la capacité de tester un ensemble de composés chimiques à partir d'un échantillon unique, ce qui facilite la réalisation de screenings (Seiber 1999)

### 1.1. De la colonne d'eau

Le compartiment strictement dédié à l'eau est en fait le réceptacle d'un ensemble de molécules issues du continent par décharge directe ou ruissellements plus diffus. Ces différentes substances vont interagir plus ou moins avec les autres compartiments de l'écosystème en fonction de leur chimie et de leur comportement vis-à-vis de ce milieu. Les analyses des eaux sont donc difficiles à interpréter au niveau écotoxicologique, en raison des variabilités spatiales, temporelles et physico-chimiques des paramètres du milieu extrêmement diversifiés et interactifs (salinité, nutriments, oxygénation, métaux, bactéries, polluants,...). Des analyses en continu (tels que des échantillonneurs passifs), peuvent être une solution adéquate mais les conditions parfois difficiles en milieu naturel, surtout en milieu estuarien et marin, peuvent avoir rapidement raison des outils analytiques de terrain. Ces échantillonnages passifs sont préconisés par (ICES 2012).

Une autre alternative consiste à utiliser les sédiments comme indicateurs de la qualité du milieu aquatique, en les considérant comme des bioconcentrateurs des contaminants issus du compartiment eau.

### 1.2. Des sédiments et des particules sédimentaires

Les sédiments constituent le principal réservoir de la plupart des contaminants chimiques introduits dans l'environnement aquatique (Louiz et al. 2008), notamment pour les molécules les moins polaires.

Les analyses chimiques des HAPs, PCBs et PBDEs entre autres débutent par la préparation des extraits sédimentaires, extraits qui seront ensuite purifiés sur micro-colonne d'alumine et de silice puis analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse



(GC/MS) en mode de sélection d'ions (SIM) pour déterminer les concentrations en contaminants par étalonnage interne.

L'extrait purifié est ensuite repris et purifié une nouvelle fois sur micro-colonne de silice acidifiée. L'éluat obtenu est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC/ECd,) pour quantifier les PCB, PBDE et OCP (contaminants organo-chlorés ) par étalonnage interne. Ces procédés sont désormais inclus dans la stratégie d'investigation OSPAR (2003-2021) et les nouvelles directives d'évaluation permettant de mesurer et de suivre la qualité du milieu (ICES, 2012), en utilisant des critères standardisés de la qualité de l'environnement aquatique. Ces analyses chimiques sont désormais associées à des bioessais afin d'évaluer les réponses environnementales de manière plus intégrée. (Berckmans et al. 2007).

### 1.3. Du biota

En ce qui concerne les Poissons, les dosages chimiques des contaminants sont réalisés sur différentes matrices, selon leur capacité à se fixer prioritairement sur tel ou tel organe.

Par exemple, les PCB peuvent être recherchés dans des matrices riches en matières grasses, les métaux plutôt dans les organes de filtration ou de détoxification. (ICES, 2012).

Cependant, ces dosages chimiques signent une exposition ou une contamination à des polluants (caractérisés ou non) mais ne peuvent à eux seuls refléter les conséquences potentielles de ce niveau de contamination sur la santé d'un organisme (effets toxicologiques) ou d'un écosystème (effets écotoxicologiques). De plus, l'analyse chimique des polluants présents dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques n'est pas toujours possible, du fait de la multiplicité des molécules présentes, et ceci souvent à des concentrations inférieures aux limites de détection analytique (Babut et al. 2003). Cette approche analytique ne renseigne pas sur les risques encourus par les populations animales et végétales exposées aux polluants (Levêque, 1997), et ne peut, à elle seule, prédire les effets biologiques des mélanges de contaminants (synergies, antagonismes, ...) ni quantifier simplement la biodisponibilité des polluants pour les organismes vivants (Dutka, 1998).

Un couplage avec d'autres analyses biochimiques est donc nécessaire.



## 2. Des marqueurs biologiques et biochimiques, de l'organisme à la molécule

D'un point de vue écotoxicologique, des marqueurs biologiques à différentes échelles de l'organisme permettent de s'affranchir du caractère restrictif des analyses chimiques, déconnectées de l'environnement naturel et de son fonctionnement complexe et interactif (bioaccumulation et bioconcentration entre autres) (van der Oost et al. 2003; Matthiessen and Law 2002; Kleinkauf et al. 2004; Porte et al. 2006; van der Oost et al. 1996a; van der Oost et al. 1997).

Ces biomarqueurs permettent en outre de considérer la nature du compartiment en jeu, la nature des contaminants, et leurs comportements vis-à-vis de ces compartiments (Gagnaire et al. 2009). Ils permettent aussi d'évaluer le niveau de la contamination chimique et de mesurer l'état de santé des organismes vivants et des populations des écosystèmes. Un biomarqueur est un paramètre mesuré au niveau moléculaire, cellulaire ou fonctionnel sur des individus issus d'une population et qui indique, soit que les individus ont été exposés à des polluants ou des toxiques, soit que l'individu développe des effets pathologiques à plus ou moins long terme (Amiard-Triquet and Rainbow 2009).

### 2.1. Des biomarqueurs à l'échelle macroscopique.

Les organismes sont, par leurs comportements, leur physiologie, leurs pathologies, voire leur mortalité massive, susceptibles de nous renseigner sur des pollutions accidentelles ou chroniques, et de révéler, par anticipation en quelque sorte, des dysfonctionnement plus conséquents à venir ou en cours, d'où leur appellation d'espèces sentinelles.

Il est donc possible d'utiliser leur comportement, ainsi que divers éléments de biométrie pour évaluer leur état de santé. Ainsi, différents indices ont été proposés afin de mesurer ces paramètres et donner un sens écotoxicologique à leurs variations (biomarqueurs d'exposition, d'effets et de susceptibilité) (van der Oost et al. 2003).

#### 2.1.1. Un diagnostic sanitaire

Le diagnostic sanitaire permet d'évaluer, sans sacrifier des individus, l'état de santé d'une population d'organismes et constitue un préalable à toute étude, suggérant en amont des



conditions écologiques convenables ou non, et des géniteurs de qualité potentiellement capables d'assurer le succès de la reproduction.

Une description des lésions éventuelles et des parasites externes sera réalisé, associée aux mesures biométriques des individus. Chez l'anguille européenne plus particulièrement, des altérations comme un état pathologique multiforme, une maigreur anormale, des tumeurs ou autres grosseurs, des déformations et malformations seront notées ainsi que l'altération de la couleur, l'absence d'organes, des lésions oculaires, des hémorragies, des traumatismes et des nécroses entre autres.

### ***2.1.2. Des indices biométriques***

Il est important ensuite de relever, taille (cm), poids (g) afin de caractériser la population ou la fraction de population de la zone d'étude, calculer un coefficient de condition ( $K = \text{Poids}/(\text{Longueur})^3$ ) correspondant à l'embonpoint des individus, estimer ou calculer un sex-ratio selon les espèces échantillonnées.

D'autres indices et indicateurs biométriques peuvent être relevés après la mort et la dissection de l'organisme comme l'âge, le rapport gonado-somatique (RGS), le poids de tout organe prélevé, la présence de parasites internes, l'état interne et la vascularisation de certains organes comme les branchies, la vessie natatoire, etc...(Adam et al. 2008; Minier et al. 2000).

### ***2.1.3. Des altérations de l'appareil reproducteur***

En ce qui concerne les effets des perturbateurs endocriniens sur les poissons, la féminisation des populations a été un des éléments les plus étudiés (Hinfrey et al. 2010). Un sex-ratio de 60% en faveur des femelles a ainsi été mis en évidence en estuaire de Seine sur le flet (*Plathychtys flesus*) (Minier et al. 2000). Ceci caractérise un risque de diminution des capacités reproductrices de géniteurs et par conséquent une diminution de la fécondité des populations de poissons, d'où un risque majeur pour la biodiversité (Roche 2011). Il est possible par ailleurs d'observer des malformations des gonades (ovotestis), des problèmes de survie des œufs, des larves plus ou moins viables, et ce, avec un impact déterminant sur la dynamique des populations.



## 2.2. Des biomarqueurs à l'échelle cellulaire

A l'échelle cellulaire, les coupes histologiques dans différents organes comme le cerveau, le pancréas, le foie, la vessie natatoire ou encore les gonades, peuvent nous renseigner à des niveaux divers sur l'état de santé de l'animal en tant qu'individu, ou sur des dysfonctionnements physiologiques plus subtils, non apparents dans la physiologie globale de l'organisme, mais qui suggèrent un risque potentiel pour la santé à terme, ou pour sa descendance. A ce titre, l'histologie développée dans le cadre de l'écotoxicologie vise à identifier, comprendre et prédire les perturbations biologiques et écologiques provoquées en milieux aquatiques en lien avec la contamination chimique anthropique ((Tair-Abbaci and Garric 2012)).

### 2.2.1. Hépatohistologie

Le foie est un organe mis en jeu dans les mécanisme de détoxification ou de synthèse de substances telle que la vitellogénine. Il peut aussi abriter différents parasites ou indiquer des pathologies diverses. Son poids peut aussi être représentatif de l'état de santé d'un organisme d'où le calcul d'un indice hépato-somatique, à considérer avec prudence cependant. En outre, de manière non-invasive et non létale, une simple biopsie du foie peut donner de nombreux renseignements et être utilisée dans des techniques de q RT PCR, ou permettre la mise en œuvre de cultures cellulaires *in vitro*, technique palliative aux expérimentations animales *in vivo*.

### 2.2.2. Gonadohistologie

L'étude des coupes histologiques de gonades permet de déterminer le sexe des organismes, ou encore de rechercher des stades de maturité sexuelle précis, ou bien de rechercher des anomalies de la gonadogenèse, de l'intersexe, des atrésies ou autres anomalies nécroses, œdèmes,...).

De l'**histochimie** peut aussi être utilisée pour caractériser et localiser certaines molécules comme des gouttelettes lipidiques ou des récepteurs de l'aromatase par exemple.

L'histologie permet donc de décrire des effets de perturbateurs endocriniens (octylphénol, bisphénol A et TBT (Gagnaire et al, 2010; Gust et al, 2011) et constitue un bon marqueur de lésions tissulaires où les relations de cause à effets sont mieux comprises, caractérisées et démontrées.



### 2.3. Des biomarqueurs à l'échelle moléculaire

Au niveau biochimique, le fonctionnement des organes peut aussi être appréhendé de manière fine par l'approche des fonctionnements enzymatiques, de la sécrétion d'hormones ou encore par l'induction de l'expression de certains gènes. Les réactions immunitaires sont aussi très utilisées dans le cadre de réactions antigènes /anticorps.

#### 2.3.1. Une lipoprotéine spécifique des femelles matures: la vitellogénine

Dans le cadre des recherches écotoxicologiques concernant les effets des PE sur la fonction de reproduction, plusieurs molécules sont utilisées dont la vitellogénine (Vg) (ICES 2012).

##### 2.3.1.1. Définition et propriétés de la vitellogénine (Vg).

Il s'agit d'une phospholipoglycoprotéine, précurseur des réserves nutritives de l'œuf normalement synthétisé par la femelle mature, au niveau du foie, sous contrôle de différentes hormones parmi lesquelles le  $17\beta$ -œstradiol et par l'intermédiaire d'un récepteur nucléaire spécifique ( $ER_2$ ).

En ce qui concerne l'anguille européenne, une méthodologie spécifique a été mise au point pour déterminer les paramètres physico-chimiques de cette protéine, sa capacité maximale de liaison au récepteur  $E_2$  ( $C_{max}$ ) et sa constante de dissociation ( $KD$ ) dans les compartiments cytosolique et nucléaire des hépatocytes. Les  $KD$  des  $RE_2$  déterminés chez l'anguille sont en accord avec ceux observés chez d'autres poissons Téléostéens. Les capacités maximales de liaison de  $E_2$  sont très faibles chez l'anguille et s'apparentent à celles trouvées pour des animaux immatures. Chez cette espèce, l'induction expérimentale de la vitellogenèse peut être obtenue par des injections d'extraits hypophysaires (EHC) ou de gonadotropines hypophysaires de carpe (cGTH) permettant ainsi d'observer les modifications de concentrations des hormones sexuelles dans le plasma (Leloup-Hatey et al. 1988) et leur synchronisme avec l'apparition de la Vg plasmatique (Peyon et al. 1998). Au niveau génétique, 3 isoformes de Vg (a, b, c) ont été caractérisées chez le Goby sand (Humblez JL, 2013), non présentes chez l'ensemble des Téléostéens.

Cette lipophosphoprotéine spécifique de femelles à maturité sexuelle, est donc utilisée comme biomarqueur d'exposition et d'effet à des perturbateurs endocriniens qui induisent l'apparition de cette substance chez des mâles ou des juvéniles, à des concentrations variant selon l'espèce, le



niveau de contamination, les espèces chimiques en présence et la fenêtre physiologique d'exposition.

### ***2.3.1.2. Variation de la concentration plasmatique de Vg et exposition à des contaminants***

Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer la présence et quantifier la Vg:

- des techniques immunologiques basées sur l'utilisation d'anticorps spécifiques comme les radio immuno essais (RIA)
- les techniques (ELISA)
- les westerns blots et les outils moléculaires comme les analyses de transcripts par Northern blotting
- des mesures de phosphoprotéines alkali-labile phosphate (ALP) sont associées aux niveaux de Vg en utilisant des immunotechniques spécifiques et des outils d' expression géniques (Versonnen et al, 04; Robinson et al, 2004)
- l'expression de protéines par des approches protéomiques

### ***2.3.1.3. Induction et quantification des ARN m de la Vg***

Il existe différentes variantes de réaction de polymérisation en chaîne (PCR semi –quantitative ou quantitative ) (Hinfray et al. 2010; Pierron et al. 2009; Blanchet-Letrouvé et al. 2013), qui nécessitent un équipement spécialisé ainsi qu'une banque de séquences relative aux gènes de la Vg pour chaque espèce. Pour cette raison, et à ce jour, l'ICES (2012) n'a pas intégré cette méthode dans le suivi méthodologique permettant l'évaluation écotoxicologique d'un site. Poutant, (Scholz et al. 2004) a démontré avec le model poisson médaka (*Oryzias latipes*), que les deux méthodes d'investigation relatives à l'induction de la Vg (ELISA sur le plasma, ou RT-PCR sur cellules hépatiques de foie en culture), donnaient des résultats équivalents et comparables.



### 2.3.2. Une enzyme indispensable à la synthèse d'œstrogènes: l'aromatase

#### 2.3.2.1. Définition et propriétés de l'aromatase

L'aromatase est une enzyme pivot permettant la conversion irréversible des androgènes en œstrogènes (stéroïdogénèse), enzyme cytochrome jouant un rôle majeur dans la différenciation sexuelle et la reproduction, mais aussi dans la neurogenèse (Guiguen et al. 2009); ce cytochrome P450 est une cible moléculaire et biochimique des PE, susceptibles de modifier l'expression et l'activité d'aromatase cérébrale et gonadique. Chez les téléostéens, l'enzyme est présente sous deux formes CYP 19A1 principalement dans les gonades et Cyp 19A2 principalement dans le cerveau. Le gene Cyp 19A1 est aussi connu sous la référence P450 arom A, Cyp 19a ou Cyp 19a1(Diotel et al. 2010.).

Chez la plupart des poissons Téléostéens investigués, le gène de l'aromatase est un gène dupliqué., excepté chez les anguilles, qui appartiennent à l'ancien groupe des Elopomorphes (Jen et al,2005) et dans lequel le duplicat doit avoir été perdu au cours de l'évolution (Cheshenko et al. 2008; Ijiri et al. 2006; Blázquez and Piferrer 2005).

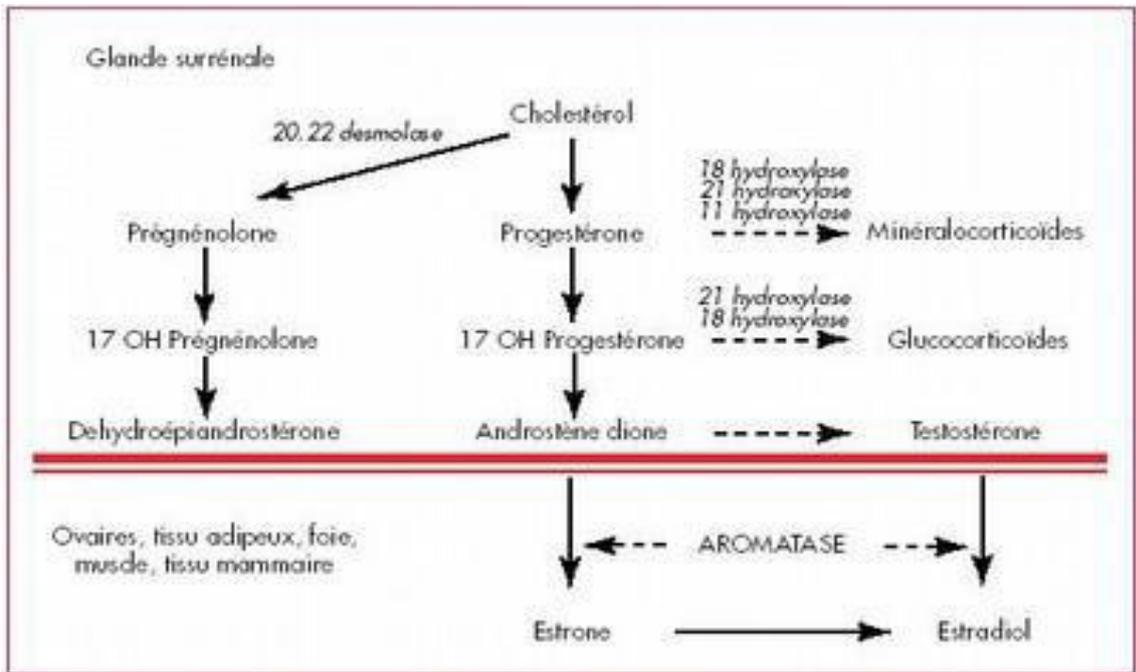


Figure 19: Schématisation de la synthèse des œstrogènes à partir du cholestérol dans la glande surrénale.



### 2.3.2.2. Induction et quantification de l'aromatase

La pertinence d'utiliser le cytochrome-P4501A1 comme biomarqueur d'une contamination d'un organisme par des perturbateurs endocriniens a été démontrée, y compris chez l'anguille européenne (Marohn et al. 2008). En effet, de jeunes anguilles (*Anguilla anguilla*) ont été contaminées par des injections intrapéritonéales de différentes doses de PCB 77 afin d'examiner et de caractériser les effets de ce PCB coplanaire sur l'expression du gène dans le foie et les branchies, par une méthode semi-quantitative RT-PCR. Les résultats indiquent clairement une dose-dépendante significative dans l'expression du gène CYP1A1 au sein des branchies, tandis que dans le tissu hépatique, l'expression de ce gène est uniquement détectable pour des niveaux de contaminations conséquents.

### 3. Des bioessais: tests cellulaires *in vitro*, *in vivo*

Les tests cellulaires permettent un criblage large de perturbations endocrines mais ne permettent pas d'identifier des composés chimiques, ni de les doser. Cela permet une première estimation d'une potentielle perturbation endocrine avant d'engager des analyses chimiques, beaucoup plus onéreuses (Sanchez et al. 2008) l'approche vise à quantifier des équivalents-toxiques dans les échantillons à l'aide de tests *in vitro* (lignées cellulaires) et *in vivo* (embryons de poisson zèbre par exemple) basés sur l'expression de gènes cibles (gène rapporteur ou gène endogène) dont l'expression est modulée par différents types de polluants PE. Après une phase de calibration du protocole d'extraction de la fraction organique des sédiments, les tests ont été appliqués à la détection d'activités oestrogéniques, (anti)androgéniques et dioxin-like dans les extraits de sédiments (INERIS et al. 2009).

#### 3.1. Des tests de bio-analyse *in vitro*

Les tests sur lignées cellulaires reposent sur la capacité d'un composé à se lier au récepteur, et à activer la réponse du gène rapporteur associé à ce récepteur (INERIS et al. 2009). Les différents récepteurs cibles concernés par cette étude sont : les récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ), des androgènes (AR) et de la dioxine (AhR : aryl-hydrocarbène). Ce sont en effet les voies les plus classiques de la perturbation endocrinienne. Les activités induites par les extraits sédimentaires



sont comparées à celles de témoins positifs connus que sont : le 17 $\beta$ -estradiol (E2) pour la mesure de l'activité œstrogénique, la flutamide (Fluta) pour la mesure de l'activité anti-androgénique, le benzo[a]pyrène (BaP) pour la mesure de l'activité HAP-like, le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) pour la mesure de l'activité dioxine-like. Les lignées cellulaires MELN et MDA-kb2, dérivées de cellules de cancer du sein, sont cultivées à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans du milieu nutritif complet DMEM (Dulbecco's modified Earles Medium, Gibco) en présence de 5 % de sérum de veau fTmtal (SVF) et 1 % d'antibiotiques. Les cellules PLHC1, dérivées de cancer du foie de vairon tropical, sont cultivées à 30°C sous CO<sub>2</sub> dans du milieu EMEM (Earle's salt minimal essential medium, Gibco) supplémenté par 5 % de SVF et 1 % d'antibiotiques.

L'inconvénient majeur des essais *in vitro* est l'incapacité à prendre en compte la bioaccumulation *in situ* par manque de capacité métabolique.

La caractérisation et la quantification de contaminants peuvent s'appuyer sur des méthodes *in vitro* utilisant des cultures cellulaires, alternatives intéressantes à l'expérimentation animale; (INERIS, 2009).

### 3.2. Des tests de criblage *in vivo*

Certaines stratégies développées entre autres par (Kinani et al., 2009) permettent d'identifier des substances endocrines actives et de quantifier leurs effets chez les poissons (tests de « criblage » *in vivo*). Les poissons constituent en effet des organismes cibles particulièrement sensibles aux PE : les expositions aux perturbateurs peuvent avoir lieu durant tout le cycle du développement (y compris durant les phases critiques) et les voies d'exposition sont multiples. Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est apparu comme une espèce particulièrement pertinente pour la caractérisation de substances de type PE, recommandée par l'OCDE, en raison de la transparence des embryons, de leur élevage aisé et peu encombrant, d'une reproduction aisée et d'une production importante d'embryons tout au long de l'année, d'un génome séquencé, etc...) (Diotel et al. 2010.; Rempel and Schlenk 2008).

D'autres essais du même type utilisent le dosage d'une protéine rénale, la spiggin, ou son expression génétique, dont la synthèse est sous contrôle androgénique. Ce biomarqueur permet d'évaluer l'exposition des poissons juvéniles ou femelles à des perturbateurs androgéniques car il s'agit d'une protéine synthétisée spécifiquement par les mâles lors de la maturité sexuelle.



**En conclusion**, l'évaluation de l'exposition aux PE et leur impact sur la santé humaine fait face à plusieurs difficultés méthodologiques, qui contribuent à expliquer l'origine de certaines controverses au sujet des PE.

Il s'agit:

- ✓ **des faibles doses** : en dehors des expositions à forte dose (distilbène, accidents comme celui de Sévésco, ou expositions professionnelles), l'exposition aux PE existe à très faibles doses pour la population générale, ce qui rend l'estimation de l'exposition complexe (Gérin, 2003). En revanche, en raison du phénomène de bioaccumulation de certaines substances perturbatrices endocriniennes, on peut les retrouver à des taux non négligeables dans l'organisme, et notamment dans les graisses.
- ✓ **de la nature chronique de l'exposition** : les PE sont présents dans plusieurs compartiments de l'environnement (air, eau, sol) ; l'organisme est exposé chaque jour durant toute la vie à ces contaminants, par inhalation, ingestion, ou contact. C'est donc un effet à long terme qu'il faut tenter d'évaluer.
- ✓ **de l'effet " cocktail "** : il existe en effet une multiplicité de molécules perturbatrices endocriniennes et les effets biologiques de ces substances peuvent interagir entre eux. Une même substance peut avoir des effets multiples voire interdépendants. C'est le cas par exemple des molécules à la fois classées mutagènes et perturbatrices endocriniennes (INSERM 2011).
- ✓ **de l'organisme échantillonné**: espèce, polymorphisme génétique, métabolisme, biométrie,....

L'interprétation des données relatives à l'évaluation des risques sanitaires ou environnementaux concernant les PE est donc complexe, et il est indispensable de prendre en compte les effets à long terme de mélanges de polluants détectés à des concentrations faibles. En effet, un même contaminant se comporte différemment selon le milieu dans lequel il évolue (air, eau, sédiments, biota) et sa toxicité peut évoluer en fonction de la matrice dans laquelle il est analysé ainsi qu'en fonction des autres substances en présence. (Figure 20)

Ce schéma exprime le fait qu'un composé, en concentration importante dans l'air, se retrouve dans les sédiments *via* les eaux, mais en plus faibles concentrations, alors que l'exposition induite au sein du biota, entraîne un risque toxique accru pour les organismes vivants.



Néanmoins, en présence d'un autre contaminant, il peut se détoxifier et devenir sans danger pour le même organisme. Toutes les combinaisons sont ainsi possibles, puisqu' il existe environ 50 000 substances chimiques dans le milieu naturel!

La figure exprime donc la variabilité des réponses possibles d'un même contaminant au sein de compartiments différents, la toxicité pouvant être plus conséquente pour une concentration moins importante selon l'espèce, la matrice considérée et les paramètres physicochimiques en présence.

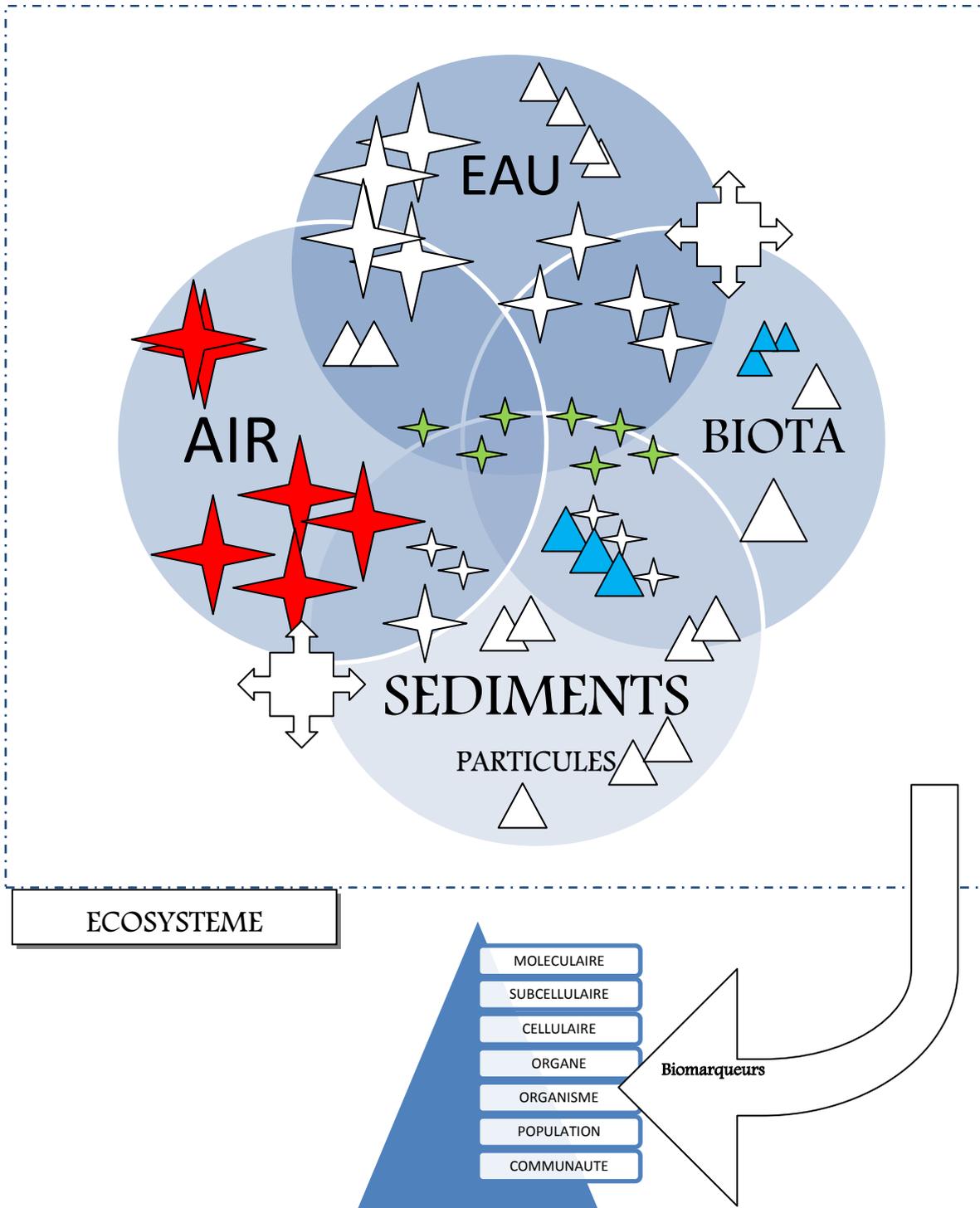
**Légende:**   les symboles sont des PE différents, leurs couleurs correspond à une toxicité croissante en fonction de la matrice d'exposition, la taille correspond à une variation de leur concentration.  correspond aux interactions

L'ensemble peut être évalué à condition d'utiliser des outils pertinents du système considéré, et une variété d'organismes représentatifs de l'écosystème dans sa globalité.

Pour évaluer cette exposition et les effets induits sur la diversité du vivant., une batterie de tests, de l'échelle écosystémique, jusqu'à l'échelle moléculaire existe, même si de nombreux contaminants et surtout de mélange restent à caractériser, tant en laboratoire qu'en milieu naturel.



***PERTURBATEURS ENDOCRINIENS: DES OUTILS POUR  
DES EFFETS TEMPORELS, SPATIAUX, INTERACTIFS, GRADUES***



**Figure 20:** Variabilité des réponses d'un même contaminant, en fonction du compartiment dans lequel il évolue (air, eau, sédiments, biota), de la matrice dans laquelle il est analysé, et en fonction des autres substances en présence.



En parallèle, il existe un certain nombre de recherche visant à approcher les directives de la loi cadre sur l'eau (DCE) et la qualité "convenable" du milieu aquatique pour 2015.

En effet, le cycle de l'eau entraîne à court, moyen ou long termes, le retour des contaminants présents dans les milieux naturels vers les stations de potabilisation des eaux et à terme dans l'eau de boisson. Jusqu'alors non recherchées, les substances de type PE ou d'autres contaminants apparaissent néfastes à la santé publique et en particuliers des individus les plus vulnérables.

Des études d'ingéniering et de process sont donc en cours dans différents domaines pour tenter de remédier de façon la moins onéreuse et la plus efficace possible à ces mélanges de contaminants non traités actuellement dans les stations d'épurations.

**Où en sont donc les études relatives aux traitements et/ou à la remédiation de la présence de PE dans les STEU?**

#### **4. La présence de PE: quels traitements ou remédiations possibles ?**

Les études relatives au devenir des œstrogènes dans les systèmes de traitement des eaux résiduaires et des boues urbaines montrent qu'en entrée de STEU, la part des œstrogènes conjugués représente environ 50% des œstrogènes totaux (Muller M., 2008). Il apparait que l'efficacité de dégradation de ces œstrogènes est de 93 à 97% lorsqu'il existe des étapes de traitement biologique de l'azote et du phosphore ainsi que des temps de séjour hydraulique élevé. Malgré tout, les effluents et les boues contiennent en final des niveaux non négligeables en œstrogènes sur le plan toxicologique.

Qu'en est-il des xéno œstrogènes potentiellement PE et de leur dégradation éventuelle?

##### **4.1. En ce qui concerne les PCB**

Les technologies de destruction sécurisées des PCB sont lourdes, onéreuses et sophistiquées; trois méthodes sont le plus souvent pratiquées: l'incinération à injection liquide, à four rotatif ou par chaudière à haut rendement. En effet, ce sont des molécules excessivement stables, même à très haute température puisqu'une température supérieure à 1200 °C est nécessaire avant, pendant et après incinération afin d'éviter la formation de dioxines et de furanes lors de la condensation des gaz (INERIS, 2011).



Des procédés de dégradation biologique très lents existent dans la nature. Des chercheurs cherchent à amplifier certaines souches de bactéries anaérobies qui, au contact des PCB depuis 40 ans, ont évolué génétiquement et permis la présence de souches bactériennes résistantes et capables de déchlorer les PCB.

Ces processus cherchent à être reproduits et amplifiés afin d'obtenir à grande échelle ce type de bactéries capables de décontamination in situ. (Quensen, 1990). Ce type bactérien serait ensuite couplé à des biofilms ou des résines adsorbantes, où les cycles biphényles déchlorés seraient alors accessibles à des bactéries oxydantes. Ces "prototypes biologiques" demandent encore de nombreuses études et donc plusieurs années avant d'être performants et utilisables comme procédés biologiques de dépollution de sols ou sédiments contaminés comme les boues résiduelles des STEU.

Les champignons ou des enzymes extraites de champignons pourraient aussi contribuer à dégrader de nombreux composés organochlorés. Il existe peut-être aussi des procédés de dégradation au sein des organismes aquatiques comme les poissons, vu leurs capacités de détoxification, via les cytochromes, qui pourraient devenir les procédés de décontamination dans un avenir plus lointain.

#### **4.2. En ce qui concerne les HAP et leurs métabolites**

Les sols industriels présentent des contaminations multiples (HAP, ETM) et posent problème pour leur traitement car les techniques disponibles actuellement (biopile, désorption thermique) ne diminuent pas l'ensemble de la pollution et modifient les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol. (Norini 2007).

La phytoremédiation apparaît comme une technique alternative de traitement de sols ou de boues contaminés en HAP. En effet, les teneurs et la disponibilité des HAP dans la rhizosphère ont diminué en présence de plantes et semblent avoir joué sur la microflore bactérienne et fongique du sol. L'association plante-champignons semble déterminante pour la remédiation et la restauration des propriétés des sols contaminés.

Afin de dépolluer et de réhabiliter les sols contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), différentes techniques ont été développées durant les dernières décennies, mais leur impact sur les fonctions du sol est rarement pris en compte. Différentes



expérimentations de laboratoire et de terrain ont montré q l'efficacité des réactions d'oxydation chimique (réaction de Fenton et persulfate activé) sur la teneur en HAP en fonction de la disponibilité de la pollution et des propriétés physico-chimiques des sols. Par ailleurs, des processus d'acidification ont été observés sur des terres non carbonatées, altérant fortement et durablement les paramètres physico-chimiques et biologiques. L'apport de matériaux susceptibles d'augmenter le pH a permis la restauration des activités biologiques et la capacité des sols à supporter la végétation lorsque ceux-ci ont été fortement acidifiés. L'association de traitements d'oxydation chimique et de refunctionalisation pourrait donc présenter un moyen de réhabilitation efficace.

#### **4.3. En ce qui concerne d'autres perturbateurs endocriniens au sens large.**

Plusieurs rapports sur la présence de composés pharmaceutiques de type PE ont été réalisés sur le bassin de Loire- Bretagne (Togola et al. 2008); l'exposition et les effets de certains médicaments dans le milieu aquatique sont disponibles dans l'étude de (Garric and Ferrari 2005). L'existence de substances de type PE est donc efficiente et malgré leur interdiction effective ou future, il est impossible de les éliminer rapidement de l'ensemble des objets usuels de consommation. Il est donc plus important de travailler à leur élimination dans les eaux de boisson et les aliments. Le recul lié à la présence de pesticides dans l'environnement indique une longue distorsion entre les alertes scientifiques, la mise en place de textes législatifs et leur application effective dans des délais compatibles avec la santé humaine et le maintien de la biodiversité. Il est donc opportun de pouvoir travailler parallèlement en recherche appliquée à leur élimination.

Plusieurs travaux de ce type ont permis de mettre en évidence des mécanismes de détoxification des PE, en milieu naturel, ou en laboratoire.

A ce titre, Espuglas et al., (2007), propose d'éliminer les PE et les composés pharmaceutiques et hospitaliers présents dans les effluents (comme les effluents de stations d'épuration municipales ou industriels) grâce à des technologies basées sur l'ozonation et l'oxydation poussées, ces contaminants émergents pouvant, à très faibles concentrations, perturber la vie aquatique.

Le programme Ampères (2006-2010) a parallèlement œuvré à la mise en évidence des micropolluants au sein des eaux usées des stations d'épuration, et ce en entrée et en sortie, afin d'évaluer les capacités d'élimination des différentes technologie de traitement sur 21 STEU ( région Rhône-Méditerranée et Corse; Suez Environnement, Université de Bordeaux, Agence de



l'eau, ANR). Ce programme a montré que 25% des substances détectées sont réfractaires au traitement biologique et que 50% de ces substances (détergents, plastifiant, isolant chimique ou aspirine) restent présentes dans l'eau traitée du fait de leur concentration trop importante en entrée. Une dizaine de substances dites préoccupantes ( anti-salissures, deux détergents, un solvant chimique, 4 pesticides et deux HAP) ont été identifiées comme pouvant conduire à un dépassement des normes quand le débit du cours d'eau récepteur est très faible.

Des procédés tertiaires comme l'ozonation, la filtration sur charbon actif ou encore l'osmose inverse ont été évalués relativement à l'élimination (ou adsorption) des micropolluants dont les PE. Ces procédés permettent d'éliminer à 90% les micropolluants présents dans l'eau en sortie de STEU. Dans les usines de potabilisation de l'eau, ces procédés d'osmose inverse et d'ozonation permettent de produire une eau "quasiment" sans contaminants, mais à des coûts relativement élevés.

D'autres moyens, plus écologiques, font appel aux capacités épuratives des végétaux et des zones humides dont une technologie émergente utilisant des zones aquatiques tampons comme traitements biologiques. Cette technique est testée à Saint-Just (Hérault) depuis août 2009 et pour une durée de trois ans (projet pilote "Zone libellule", Lyonnaise des Eaux. Concrètement, un ensemble de bassins regroupe sur 1,7 hectares, différentes espèces de plantes reproduisant des milieux naturels (bassin à phytoplancton, roselière, méandre, delta, prairie humide...) choisies pour leurs capacités naturelles à absorber certains polluants. L'eau parcourt cette zone en une dizaine de jours. Les premiers résultats évoquent une réduction, pouvant aller jusqu'à 80% de la concentration de certains PE, résidus médicamenteux et pesticides (Lyonnaise 2013).

Cependant, d'autres études suggèrent que si la moitié des micropolluants est éliminée à plus de 70%, une vingtaine de substances sont éliminées à moins de 30% (Stavarakakis 2007). Ainsi, les niveaux de certains pesticides, métaux et produits pharmaceutiques ne sont pas suffisamment abaissés et peuvent conduire au non respect des normes en sortie de stations de traitement des eaux usées (STEU). Par ailleurs, l'étude montre que la réduction des micropolluants est surtout le fait de leur accumulation dans les boues d'épuration et de leur biodégradation naturelle pour les moins stables d'entre elles. Les STEU, construites pour réduire les apports de nutriments (azote et phosphore), de substances organiques dissoutes et de métaux lourds dans les eaux, ne réduisent que très partiellement les autres micropolluants (40 à 50% pour les STEU nitrifiantes et de 20 à 25% pour les stations ne ciblant que le carbone et le phosphore).



En ce qui concerne les techniques de filtrage sur charbon actif et l'ozonation, des résultats positifs sont obtenus seulement avec deux pesticides sur 8 substances résistantes testées. D'autres techniques émergentes ou réservées à des traitements d'eau très spécifiques, pourraient être utilisées pour éliminer les micropolluants. C'est le cas des techniques de traitement membranaire qui consistent à filtrer l'eau dans des milieux poreux, mais aussi de la nanofiltration, permettant la séparation de composés de la taille du nanomètre, et de l'osmose inverse, permettant de produire de l'eau pure, notamment à partir d'eau de mer. Cependant, ces systèmes de filtrations, jugés efficaces, sont difficiles à appliquer aux eaux usées et entraînent une importante consommation énergétique (INERIS 2012).

### **En conclusion,**

suite au rapport européen publié en 2013, les ministères de la Santé et de l'écologie français ont lancé une consultation publique préalable à une «stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens» reprenant les propositions des groupe de travail établis après la Conférence environnementale de septembre 2012. Cette stratégie vise d'une part à limiter l'exposition aux perturbateurs endocriniens et leurs conséquences sanitaires et environnementales, et d'autre part à renforcer la recherche. Les études devraient porter sur la santé, la biodiversité, les alternatives et la **bioremédiation**. A ce titre, un laboratoire spécialisé pourrait être créé afin de relier recherche fondamentale et recherche appliquée, afin de proposer notamment, des tests d'évaluation plus pertinents aux industriels et chimistes

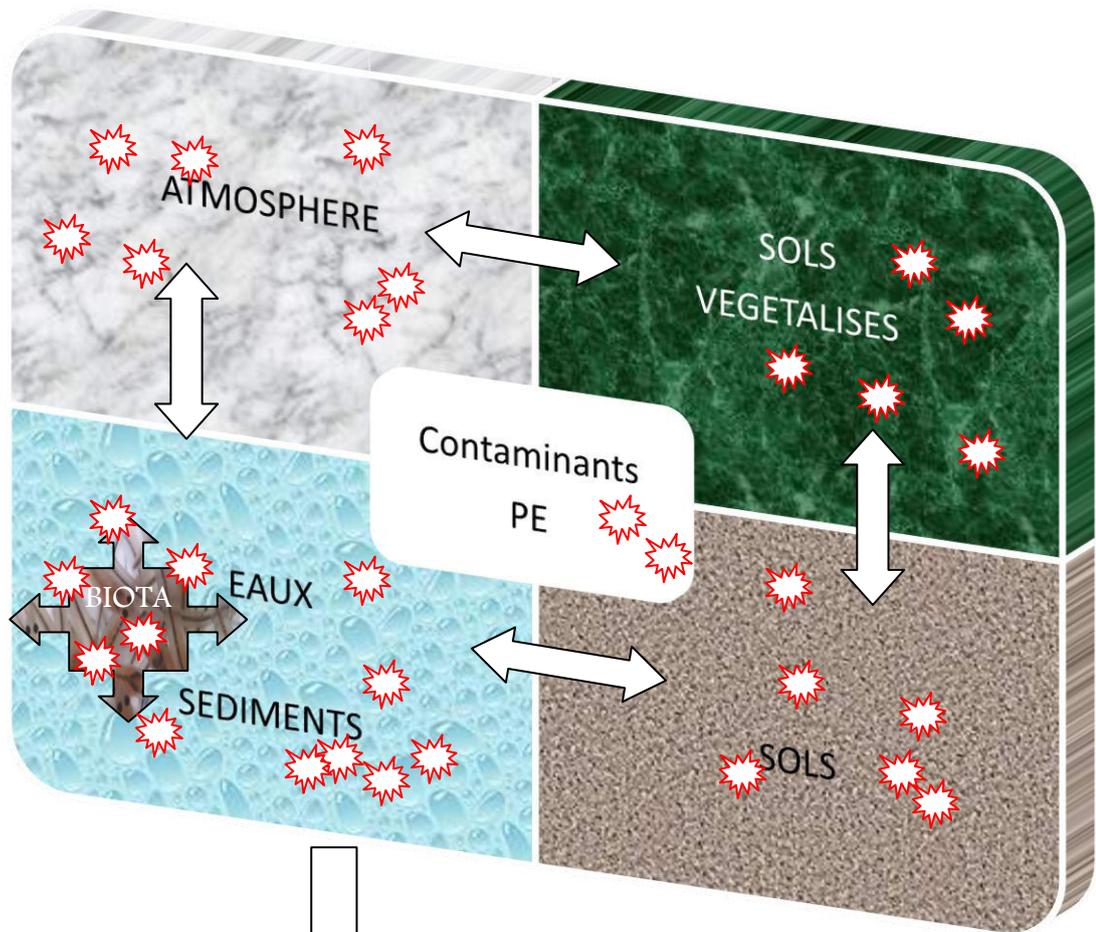
Les activités anthropiques génèrent donc un ensemble de substances à caractère reprotoxiques, dont le devenir est le plus souvent le milieu aquatique, dans leurs formes premières ou non.

Au titre des conventions internationales Ospar (Manche, mer du Nord, océan Atlantique) et Medpol (Méditerranée), la France réalise annuellement des évaluations de ces flux de polluants rejetés en mer via les cours d'eau, tant au niveau des apports de nutriments contribuant notamment aux problèmes d'eutrophisation en milieu marin qu'à la présence de contaminants de type PE (OSPAR 2011).

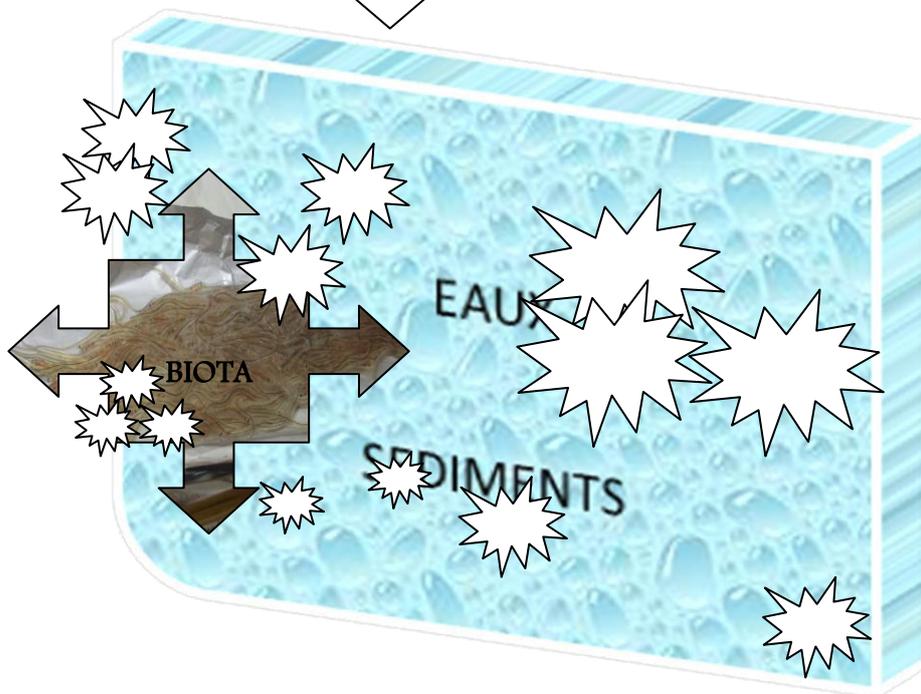
**Quels sont les effets générés par ces potentiels perturbateurs endocriniens en milieu aquatique?  
Comment ces mélanges de polluants sont-ils susceptibles de se comporter dans un écosystème aquatique constitués de compartiments en interactions permanentes et variables?**



A



B



**Figure 21.** Couplages interactifs des compartiments biochimiques et écosystémiques au sein de l'estuaire de la Loire; chaque étoile représente un contaminant de type perturbateur endocrinien, plus ou moins toxique.



### III/ Les perturbateurs endocriniens en milieu aquatique: une exposition avérée et des effets tangibles?

Le milieu aquatique est un milieu récepteur par excellence car il draine l'ensemble des rejets directs, indirects ou diffus issus du milieu continental terrestre, mais aussi du compartiment atmosphérique avec lequel il est en relation via le cycle de l'eau et l'ensemble des autres cycles biogéochimiques. De nombreux contaminants entrent donc dans les compartiments aquatiques d'eau douce, saumâtres et salées, dont des substances comme les PE (figure 21). Ainsi, au niveau international, de nombreuses études ont déterminé la présence de PE dans le milieu aquatique à des concentrations pouvant potentiellement avoir un impact sur les organismes, comme les derniers grands projets japonais, chinois, coréen et australien (Soyano et al. 2010) (Land 2007). Ces études sont souvent focalisées sur les zones estuariennes, véritables "éponges" de l'ensemble des effluents en provenance du continent, malgré les efforts conséquents réalisés pour amenuiser le volume des effluents directs et améliorer leur qualité avant leur rejet dans le milieu aquatique récepteur.

#### Qu'en est-il de l'exposition potentielle des estuaires par des PE?

##### 1. Les estuaires: des écosystèmes synaptiques anthropisés

Carrefour des activités anthropiques, les estuaires sont avant tout des environnements clé pour le développement de la biodiversité et constituent en particulier des zones de reproduction et des nurseries indissociables des activités de pêche et de tourisme (Matthiessen and Law 2002; Abarnou 2008; P. Matthiessen et al. 2002) Cependant, leur situation synaptique entre le continent et l'océan leur confère une "mission" inattendue de station d'épuration géante, cocktail grandeur nature de l'ensemble des molécules naturelles et artificielles rejetées par les activités anthropiques.

##### 1.1. Des généralités hydrodynamiques et sédimentaires

Le **système estuarien** est caractérisé par une zone comprise entre la limite amont de la pénétration de la **marée dynamique** et son embouchure, entité unique et indissociable ayant des caractéristiques qui lui sont propres et qui le différencient des cours d'eau ou du milieu marin littoral qu'il jouxte.



Deux processus permettent en outre de lui donner une identité propre.

- ✓ des variations du niveau d'eau deux fois par jour où circulent des particules en suspension dans les deux sens, en raison de la superposition de deux types de phénomènes : les débits des affluents (**crue et étiage**) et la marée (**flot et jusant**), pouvant se conjuguer ou s'opposer.
- ✓ la présence d'un **bouchon vaseux dynamique** où s'accumule tout rejet sous forme particulière, en provenance de l'aval ou de l'amont.

Ce bouchon vaseux ou "maximum de turbidité" résulte de l'interaction de courants de surface et de frottements induits par des courants sur le fond qui génère un stock sédimentaire expliquant les fortes turbidités rencontrées en milieu estuarien (concentrations en matières en suspension 100 à 500 fois plus importantes qu'en mer ou en rivières).

Le **comportement hydrodynamique** des estuaires enregistre des variations importantes, surtout lorsque les cours d'eau correspondants ont été peu aménagés par des ouvrages de type barrages. Ceci génère un débit fluctuant influençant de façon majeure le comportement du bouchon vaseux et par conséquent, la qualité du milieu. En effet, de forts étiages permettent la remontée du bouchon vaseux dans des zones amont où la quantité d'eau, plus faible, induit une dégradation supplémentaire de la qualité des eaux alors que l'écrêtage des crues empêche l'évacuation vers la mer d'une partie du matériel stocké dans le bouchon vaseux (Romaña 1994). Ces variations quotidiennes entraînent une circulation résiduelle des eaux en deux couches qui filtre théoriquement le mouvement bi journalier de la marée; ceci conduit à la notion de **point nodal** où les courants résiduels disparaissent vers l'amont. En général, ce point nodal marque la pénétration maximale de la salinité.

## 1.2. Des comparaisons inter estuariennes

La comparaison des flux provenant du bassin versant avec ceux issus des rejets au sein de l'estuaire montre que, dans bien des cas, les premiers sont largement dominants et que l'état de dégradation de l'estuaire n'est souvent que l'"état de santé" du bassin versant. Néanmoins, cela ne doit pas freiner les efforts de réduction des rejets dans l'estuaire. Tout assainissement doit suivre



des procédures spécifiques au système estuarien en tenant compte des caractéristiques qui lui sont propres du point de vue de son fonctionnement.

✓ La Gironde, dont le bassin versant est relativement peu peuplé et peu industrialisé, a conservé un équilibre naturel qui se manifeste par un "climax" géomorphologique bien établi et une faible pollution globale, que sa dimension importante contribue, en outre, à renforcer.

✓ La Loire draine un bassin versant plus développé et plus riche, ce qui a conduit à aménager son estuaire, en particulier, en vue de faciliter le passage des grands navires ou d'extraire en amont les sables et les graviers. La morphologie de l'estuaire a changé, en provoquant une progression vers l'amont des eaux marines.

✓ L'estuaire de la Seine est, quant à lui, le point d'arrivée en mer des eaux d'un bassin versant, où demeure 30 % de la population française (dont l'agglomération parisienne) et 40 % de l'activité économique nationale. Il se trouve confronté à de sérieux problèmes de pollution. Par ailleurs, l'importance de son rôle de voie de communication a été la cause d'innombrables aménagements qui l'ont transformé en un estuaire complètement endigué. Il a radicalement perdu sa forme "évasée" (Sanchez et al. 2008).

En ce qui concerne leur bouchon vaseux respectif, la masse sédimentaire varie dans des proportions très importantes selon les trois estuaires, à savoir:

- 20 000 à 400 000 tonnes pour la Seine,
- 800 000 à 1 000 000 tonnes pour la Loire,
- 4 000 000 à 5 000 000 tonnes pour la Gironde.

Chaque bouchon vaseux peut représenter de 1 à 3 ans d'apports de sédiments par le fleuve. Le bouchon vaseux se déplace d'amont en aval suivant le débit du fleuve et le moment de la marée (flot ou jusant). Quant au stock en suspension, il augmente et diminue en fonction du cycle lunaire de la marée. La partie déposée porte le nom de **crème de vase**, et elle est maximale en période de mortes eaux.

Ce stock, où la concentration en sédiments est très forte (jusqu'à 300 g/l dans la crème de vase), joue probablement un rôle fondamental dans une potentielle dégradation de la qualité du milieu. En effet, parmi d'autres conséquences :



- ✓ les micropolluants adsorbés sur les sédiments viennent s'accumuler dans le bouchon vaseux ;
- ✓ l'oxydation du stock important de matière organique particulaire biodégradable accumulé dans le bouchon vaseux peut conduire à un sérieux déficit en oxygène dissous en période estivale. C'est actuellement le cas de l'estuaire de la Loire, où l'accumulation dans le bouchon du stock de matière organique issue des lessivages des sols en amont ou générée par l'eutrophisation du fleuve, induit des sévères anoxies de l'eau en période estivale, au moment où l'ensemble des sédiments est en suspension. En période de mortes eaux, l'oxygène dissous remonte à des teneurs proches de la saturation ;
  - ✓ le bouchon vaseux accumule les bactéries d'origine animale ou humaine ;
  - ✓ sa forte turbidité limite considérablement la pénétration lumineuse, et réduit, par conséquent, la production primaire.

**L'ensemble des études concernant les estuaires est donc contraint par la multifactorialité de ces paramètres car ces espaces sont extrêmement difficiles d'approche en raison d'une complexité et d'une fragilité interactives.**

## **2. L'estuaire de la Loire: une exposition potentielle à des perturbateurs endocriniens?**

### **2.1. Un état des lieux**

Milieu synaptique entre l'océan atlantique et le continent, l'estuaire de la Loire est soumis à de multiples paramètres abiotiques ainsi qu'à de nombreux enjeux économiques liés aux activités anthropiques diverses (maraîchage, élevage, cultures, industries, et pression urbaine incluant les effluents urbains plus ou moins bien épurés, deux incinérateurs, des décharges anciennes plus ou moins hermétiques).

S'y ajoute un défi écologique nécessaire à la préservation de cette vie socio-économique plurielle car la médiocre qualité des eaux estuariennes contraint les activités directement liées à la vie de l'estuaire: pêche, eaux pour le maraîchage, potabilisation des eaux, industrialisation, etc..

**Au niveau industriel**, Nantes-Saint Nazaire constitue le 4<sup>ème</sup> port français et le 1<sup>er</sup> de la façade atlantique (où 77% d'hydrocarbures sont raffinés). Le secteur estuarien élargi est basé sur la construction navale, l'aéronautique, les industries agroalimentaires, les combustibles et carburants.



**Au niveau agricole**, la polyculture-élevage est dominante et comptait en 2007, 75550 exploitations dont 5250 à titre professionnel. le secteur est spécialisé dans le muguet (1er en France), la mâche (80% de la production française), le muscadet, l'arboriculture fruitière, utilisant pesticides, insecticides, fongicides et engrais.

**Au niveau urbanistique**, la Loire-Atlantique compte désormais 1 317 685 habitants, démographie largement positive, avec une augmentation d'environ 50.000 habitants en un an (Insee, 2014; [www.insee.fr](http://www.insee.fr)), entraînant une perte de 2500 à 3000 ha/an sous la pression urbaine (figure 22). Le rythme de consommation d'espace agricole apparaît donc particulièrement élevé. En effet, en 2010, le taux d'artificialisation des terres agricoles au profit de la réalisation de lotissements, routes, zones d'activité ou espaces de loisirs, était de 14% en Loire-Atlantique, contre 9% au niveau national. Cette artificialisation est souvent corrélée à une destruction des sols à valeur agronomique élevée dans le but d'assurer:

- ❑ des extensions urbaines et villageoises (50%)
- ❑ des infrastructures (27%),
- ❑ des activités socio-économiques (23%).

	Population en 2007 (en milliers)	Population projetée en 2040 (en milliers)	Taux de croissance en moyenne annuelle entre 1990 et 2007 (en %)	Taux de croissance en moyenne annuelle entre 2007 et 2040 (en %)
Loire-Atlantique	1 247	1 630	1,0	0,8
Maine-et-Loire	771	940	0,5	0,6
Mayenne	301	340	0,5	0,4
Sarthe	557	640	0,5	0,4
Vendée	607	840	1,0	1,0
Pays de la Loire	3 483	4 390	0,8	0,7
France métropolitaine	61 795	70 730	0,5	0,4

**Figure 22:** Evolution de la population en Loire Atlantique. Source : Insee - modèle Omphale (scénario central)



Une Charte pour la prise en compte de l'agriculture dans l'aménagement du territoire, (2012) cherche à limiter leurs extensions en valorisant au mieux l'espace déjà artificialisé.

Dans ce contexte d'estuaire soumis à des activités socio-économiques plurielles, la présence potentielle de Perturbateurs endocriniens (PE) issus de stations d'épuration, du maraîchage, de l'agriculture, des industries et de l'urbanisation (effluents domestiques, trafic automobile, aérien,...) semble probable. S'ajoute à cela, les risques potentiels liés à l'épandage des boues de station d'épuration sur les terres agricoles: à titre d'exemple, (Fowler et al. 2008) démontre que l'élevage de brebis gestantes sur des pâturages « fertilisés » avec des boues d'épandage altère leur développement ovarien.

Il semble donc qu'un mélange reflétant une exposition complexe humaine (boues provenant des égouts) puisse altérer la fertilité, la détermination de(s) substance(s) active(s) impliquée(s) restant plus compliquée à mettre en évidence. En outre, il existe peu d'études approfondies, actualisées et novatrices sur l'état de l'écosystème estuarien de la Loire, et les ouvrages présentant un état des lieux naturaliste sont relativement anciens (FRAPEC 1981; Marchand and Elie 1983); (Marchand 1972). Cependant dans le cadre de la directive cadre européenne, une ébauche d'étude ichthyologique a été menée en 2007 (Biotope 2007).

En revanche, les données relatives au fonctionnement hydrodynamique de l'estuaire sont plus souvent mises à jour compte tenu de l'intérêt portuaire de Donges-Est, de l'utilisation des eaux pour la potabilisation de Nantes Métropole ou encore pour les usages du maraîchage.

## 2.2. Un fonctionnement dynamique spécifique

L'estuaire de la Loire s'étend sur 110 km et possède un bassin versant de 3 844 km<sup>2</sup> depuis Anetz jusqu'à son embouchure dans l'océan Atlantique au large de Saint-Nazaire.

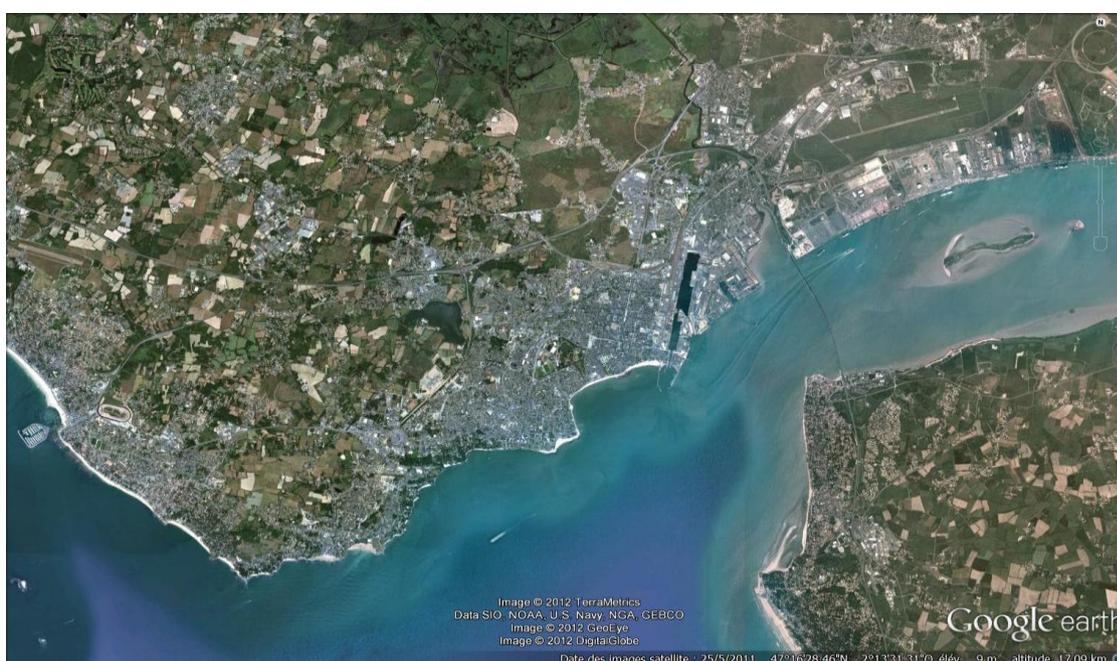
Il résulte d'un assemblage de facteurs abiotiques, biotiques, économiques et sociaux, melting-pot subtile de l'union des caractéristiques tant du milieu continental que du milieu marin; cela se traduit par une spécificité unique, et une originalité reconnue par toutes les sociétés vivant, à partir de, et pour, ce milieu.

Le plus souvent, la limite supérieure de pénétration de la marée dynamique fixe la limite amont de l'estuaire. Elle se superpose plus ou moins à la limite de la salinité (Desprès, 2011). Les eaux de



drainage du bassin versant définissent quant à elles la qualité des eaux estuariennes (mélange turbide et gradient de salinité)(Romaña 1994);(GIP 2009).

D'un point de vue morpho-sédimentaire, l'estuaire de la Loire se divise en trois zones. A l'ouest du rétrécissement de Saint-Nazaire, l'estuaire externe ou zone d'étude aval est un vaste golfe dont les fonds sont de nature sableuse ou sablo-vaseuse. Cette partie externe de l'estuaire de la Loire est un domaine soumis à une pression de dragage intense pour maintenir la profondeur du chenal et les souilles le long des quais. En 2008, le volume dragué dans ce secteur a été estimé à  $10.10^6 \text{ m}^3$  :



**Image 1:** Zone d'étude aval, de l'embouchure de l'estuaire (St Nazaire)

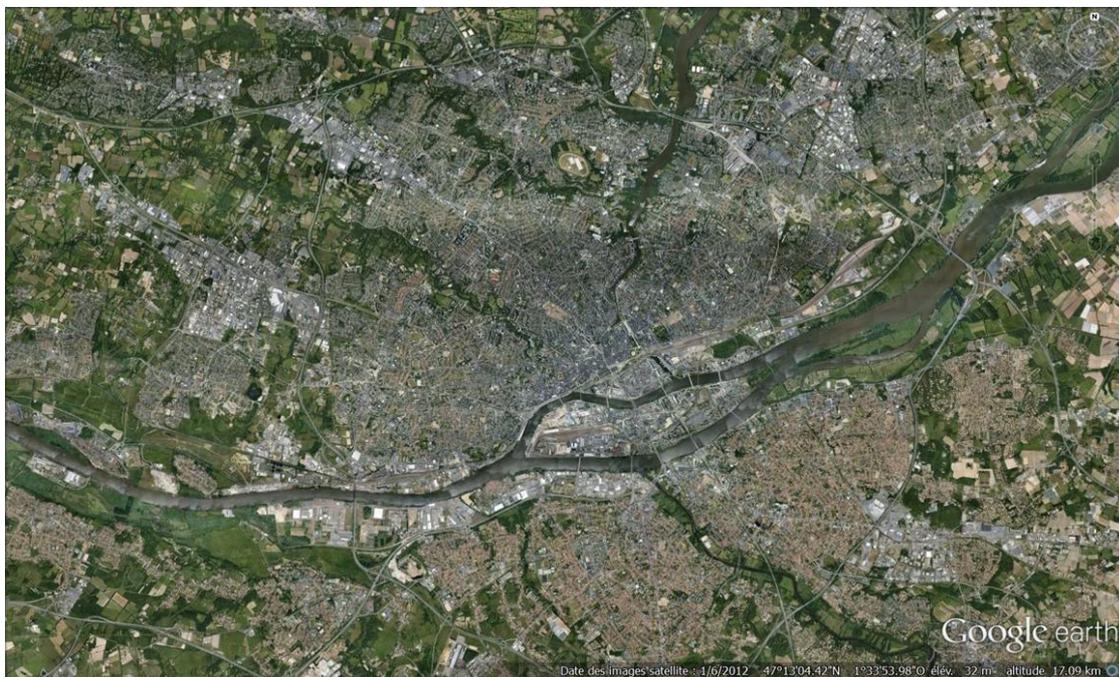
La **partie centrale** est, quant à elle, caractérisée par un fond essentiellement vaseux, mais aussi par une diversité de biotopes : zone d'îles et de bancs sableux entre Saint Nazaire et Paimboeuf, domaine de marais autour de Paimboeuf, zone endiguée à descendre vers Nantes.





**Image 2.** Partie centrale de la zone d'étude, (amont et aval de Paimboeuf)

A l'est du seuil de Bellevue (amont immédiat de Nantes), dans l'**estuaire interne**, la pente du lit est beaucoup plus raide. Dans ce bief, la Loire est constituée d'un réseau hydraulique plus complexe formé d'îles et de bras secondaires.



**Image 3.** Estuaire interne, où le réseau hydraulique est plus complexe, la pente du lit beaucoup plus raide.

D'un point de vue hydrodynamique, l'estuaire de la Loire est soumis à une marée méso à macrotidale (identique à celui de la Gironde) dont le marnage en vives eaux extrêmes est



supérieur à 6 m et dont le débit moyen est estimé à 850 m<sup>3</sup>/sec (Migniot and Le Hir 1997; Migniot 1993). Ce comportement hydrodynamique résulte de la superposition des phénomènes biquotidiens de la marée et du débit des affluents; à la force du fleuve (crues et étiages) se conjugue la puissance du flot et du jusant, elle-même fonction des marées de vives ou de mortes eaux.

**Au niveau hydrosédimentaire**, l'interaction des courants de surface et des frottements induits par les courants sur le fond génèrent un stock sédimentaire désigné par le terme de **bouchon vaseux** où un maximum de turbidité se forme (800 000 à 1 000 000 T pour la Loire comparativement aux 20 000 à 400 000 T en estuaire de Seine et 4 000 000 à 5 000 000 T en estuaire de Gironde).

Le bouchon vaseux peut représenter 1 à 3 ans d'apports de sédiments par le fleuve et se déplace d'amont en aval. L'importance des dépôts fins dans les vasières, les ports, les darses et le chenal de navigation est liée à la présence de ce bouchon vaseux dont la position évolue dans l'ensemble de l'estuaire en fonction du débit fluvial et des coefficients de marée.

La partie la plus fine ou **crème de vase** se dépose régulièrement avec un maximum en mortes eaux. La caractérisation de la dynamique longitudinale et saisonnière de la crème de vase en Loire date du milieu des années 1970 (Gallene 1974; Maurice 1994)

D'après les récentes études de faciès acoustiques de (Desmazes et al. 2010), prenant appui sur les données de (Maurice 1994) et de (Sanchez and Delanoë 2006), il apparaît que la crème de vase dans l'estuaire de la Loire présente une dynamique propre; en effet, des lentilles de crème de vase se forment en parallèle dans le chenal et pourraient résulter de l'entretien du chenal de navigation et des souilles d'appontage par une drague refoulant les sédiments. Les cartes établies montrent qu'au delà d'un lien fort entre crème de vase et position du bouchon vaseux, certaines zones situées devant Donges ou Paimboeuf semblent favoriser ce type de sédimentation. En outre, l'analyse de profils perpendiculaires au chenal permet de décrire précisément la morphologie des dépôts de crème de vase situés dans le chenal de navigation, situé en aval de Saint Nazaire. Celui-ci apparaît affecté tout au long de l'année par la présence de vase molle, y compris en période d'absence du bouchon vaseux, dans l'estuaire aval. Les activités de dragage et de clapage pourraient être à l'origine de ces lentilles de crème de vase par remaniement des sédiments (Desmazes et al. 2010). Il en résulte à ce niveau une concentration en sédiments pouvant atteindre 300g/l et jouant sans doute un rôle fondamental dans une potentielle dégradation de la qualité du milieu.



Les sédiments seront donc associés de façon prépondérante à l'adsorption des polluants et par conséquent, à la contamination potentielle des organismes vivants, selon leur écologie, biologie et physiologie propre

**Au niveau hydrobiologique**, cet estuaire macrotidal est reconnu en tant qu'épurateur physico-chimique et biologique vis-à-vis des matières organiques (Thouvenin and Romana 1992). Au cours de sa dégradation, la matière organique (MO) dissoute consomme de l'O<sub>2</sub> mais celle-ci est compensée par la réoxygénation atmosphérique (Thouvenin and Le Hir 1994). C'est la dégradation de la MO particulaire, d'origine anthropique, qui induit la plus forte DBO (demande Biologique en Oxygène) dont les valeurs maximales sont localisées au niveau du bouchon vaseux varie entre 20 et 40 km de l'embouchure (Migniot 1993; GIP Loire estuaire 2014).

La matière organique piégée dans la zone de turbidité maximale de l'estuaire de la Loire, en tant que support de l'activité bactérienne, constitue l'un des maillons de base du cycle biogéochimique permettant de comprendre les origines du déficit en oxygène dissous généralement observé en septembre. Deux campagnes de mesures des principaux paramètres physico-chimiques ainsi que des biomasses bactériennes ont donc été réalisées dans le bouchon vaseux en septembre 1990 et 1991. La crème de vase, systématiquement anoxique, est supposée être le siège de processus fermentatifs et/ou d'hydrolyses ; en effet, en période de dépôts, la formation de carbone organique dissous dans cette couche a été estimée à 3 g cm<sup>-3</sup>jour<sup>-1</sup>. Au cours de leur remise en suspension dans la colonne d'eau généralement oxygénée, les produits organiques formés dans la crème de vase peuvent alors entrer dans le cycle métabolique aérobie et contribuer à la diminution des teneurs en oxygène dissous du bouchon vaseux. La crème de vase participe également à la régénération d'azote ammoniacal dans la zone de turbidité maximale; son taux de formation a été estimé entre 3 et 10 nmol N-NH<sub>4</sub>(g de matériel particulaire)<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Le fonctionnement biogéochimique de la zone de turbidité maximale de l'estuaire de la Loire et la mise en place de conditions anoxiques dans cette zone ne peuvent donc s'appréhender sans une connaissance approfondie des processus de transformation des composés organiques et minéraux dans la crème de vase.

L'estuaire de Loire est ainsi caractérisé par des **crises d'anoxie** en raison d'un sérieux déficit en O<sub>2</sub> dissous; cependant leur durée et leurs conséquences globales ne sont pas clairement établies (ONEMA/IFREMER 2010). Ces problèmes d'anoxie sont d'autant plus soutenus et fréquents que les conditions climatiques fluctuent, et donc que les volumes d'eau varient. En conséquence, ceci



entraîne une réduction de l'effet de chasse en période de sécheresse ou d'absences de crues, alors qu'un débit important est nécessaire à l'expulsion périodique du bouchon vaseux vers le large.

La caractérisation des crises d'anoxie a été réalisée par Chaudon, (2005) afin de préciser l'impact de ces phénomènes anoxiques répétitifs sur le transit piscicole en estuaire de Loire (SDAGE 2005; GIP 2006). Cette récente étude réalisée par la société HOCER et l'Université Bordeaux 1 pour le GIP Loire Estuaire propose un seuil sensible de 5 mg/L d'O<sub>2</sub>. Mais les données relatives aux espèces aquatiques restent très fragmentaires sur l'estuaire de la Loire et peu investiguées pour elles-mêmes.

Enfin, force est de constater qu'en moins de trente ans, le linéaire des rives naturelles de l'estuaire de la Loire est passé de 200 à 30 km et la surface des vasières s'est réduite de 14 000 ha à moins de 9 000 ha. Cette situation, conjuguée aux phénomènes décrits précédemment comme l'approfondissement du chenal de navigation, les extractions de sable ou la pollution des eaux (remontée de la salinité et du bouchon vaseux), provoquent la perte de zones de productivité primaire aquatique mais aussi continentale, piliers fondateurs du fonctionnement équilibré des écosystèmes, bases socio-économiques des activités anthropiques.

### **2.3. Interactions entre les différents compartiments écosystémiques en jeu**

Une action, quelle qu'elle soit, sur le système estuarien va donc engendrer une cascade de phénomènes physico-chimiques et biologiques spécifique à l'estuaire observé. Les études doivent donc être croisées davantage afin de cerner au plus près de la réalité du terrain et interpréter au plus juste les données face à cette complexité et à l'interactivité des différents compartiments au sein de l'estuaire.

Miroirs de l'état de santé d'un système entier, mais miroirs déformants, colonne d'eau et sédiments ne peuvent suffire à qualifier la qualité de l'environnement; l'évaluation biologique est aussi une source indispensable, mais beaucoup plus difficile d'approche et surtout d'interprétation, de par les espèces en jeu et de par les spécificités individuelles des échantillons biologiques. En final, les analyses et la réflexion doivent essayer de tenir compte des interactions entre chaque compartiment, conceptualisé par la figure 23.

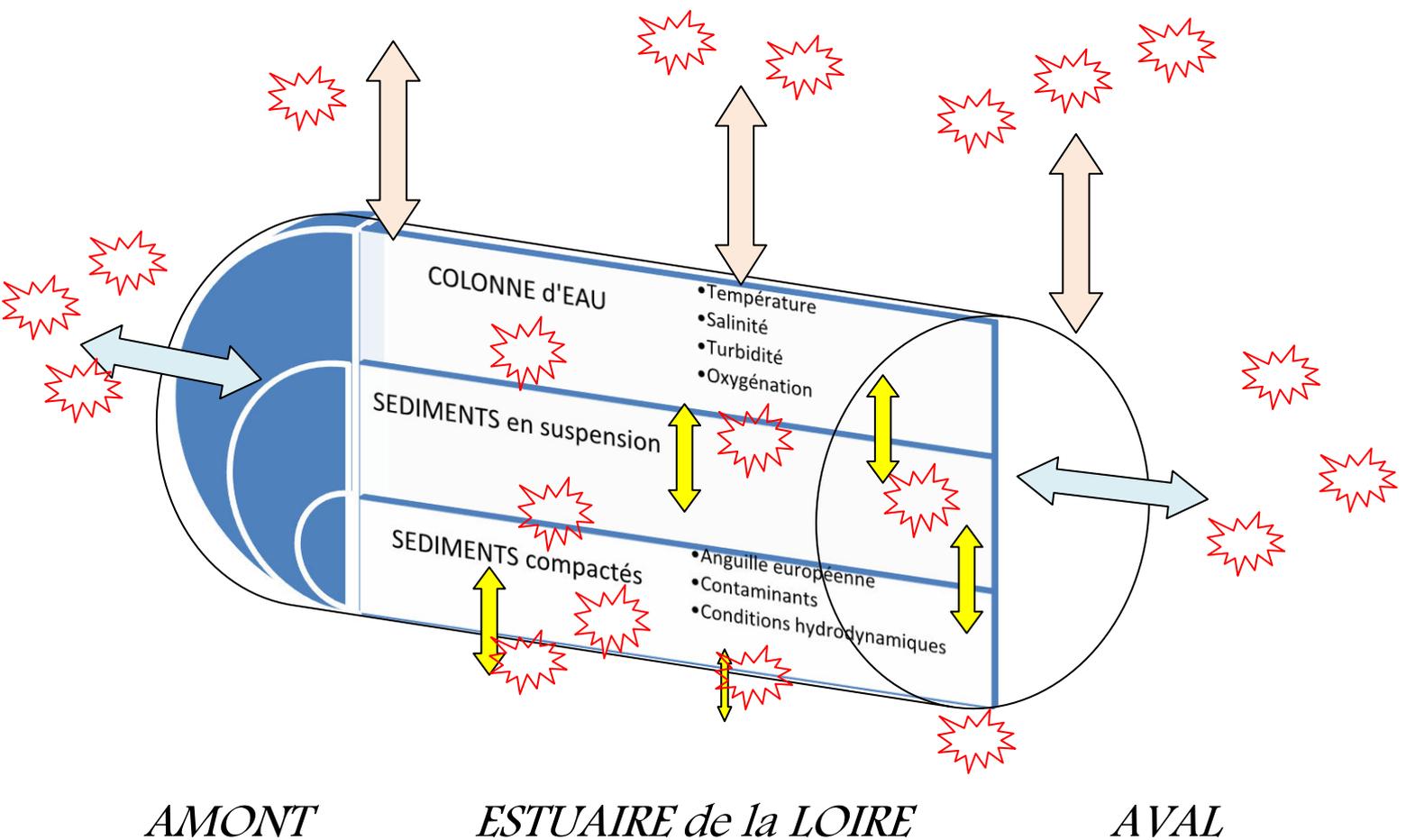
L'interprétation des données relatives à l'évaluation des risques sanitaires ou environnementaux concernant les PE est donc complexe et nécessite de prendre en compte les effets à long terme de mélanges de polluants détectés à faibles concentrations (INSERM 2011; WHO/UNEP 2013), la nature de l'exposition (chronique ou accidentelle), les phénomènes de bioamplification et de



bioaccumulation au sein des réseaux trophiques. Il en résulte parfois des controverses ou des difficultés à réaliser des relations entre exposition et effets potentiels.

**Au niveau écosystémique**, la complexité des paramètres biotiques et abiotiques couplés à des interactions entre les différents compartiments de la biosphère rend la mise en œuvre des expérimentations difficile et la lisibilité des résultats moins transparentes; à ce titre, les expériences en cage ou en mésocosmes s'avèrent des outils pertinents et intéressants, complémentaires des études strictement *in vivo*, *in vitro* et celles pratiquées dans l'environnement naturel (INERIS et al. 2009; INERIS 2012). Ces études environnementales sont complètes et possèdent l'avantage d'être représentative de l'ensemble des paramètres en jeu, mais encore faut-il ensuite être capable de dissocier le rôle de chacun de ces paramètres, leur synergie et leurs antagonismes potentiels, et de hiérarchiser éventuellement ces rôles de manière juste.





**Figure 23:** Synthèse des interactions théoriques au sein d'un système estuarien dynamique

**Légende:** Les trois compartiments apparaissent en interactivité (flèches à double sens, en présentant chacun leurs paramètres spécifiques; les étoiles représentent les perturbateurs endocriniens, en mélange, et à tous les niveaux de l'écosystème; l'ensemble indique le complexité des phénomènes physico-chimiques en jeu, ainsi que les risques écotoxicologiques probables, dans un cadre spatio-temporel à forte variabilité).



En effet, plusieurs phénomènes apparaissent comme :

✓ **La bioconcentration** est le phénomène par lequel une substance chimique pénètre directement du milieu ambiant dans un organisme vivant. Dans notre contexte, ce passage se fait directement de l'eau à l'organisme, par voie cutanée, digestive et/ou respiratoire. La substance considérée s'accumule dans l'organisme, conduisant à une concentration plus élevée dans l'organisme ciblé que dans le milieu ambiant. Un facteur de bioconcentration (**BCF**) est défini par le rapport d'une substance à l'intérieur d'un organisme sur sa concentration dans l'eau, compte tenu seulement de l'absorption provenant du milieu ambiant.

✓ **La bioaccumulation** est le phénomène qui conduit à l'accumulation d'une substance chimique par un organisme, à une concentration supérieure à celle de son milieu de vie. La bioaccumulation englobe donc l'absorption par la voie directe (bioconcentration) et l'absorption par la voie trophique.

✓ **La bioamplification** est le phénomène selon lequel un contaminant se transmet à un consommateur par sa nourriture, aboutissant ainsi à une concentration plus importante dans l'organisme du prédateur que dans celui de la proie qu'il consomme. Ce phénomène se rencontre classiquement dans le cas des contaminants organiques, et plus particulièrement ceux qui sont peu métabolisables. Un facteur de bioamplification (**BAF**) peut être défini comme une constante issue du rapport de la concentration d'une substance dans le prédateur sur la concentration dans la proie, compte tenu seulement de l'absorption trophique .

✓ **La biodisponibilité** d'un contaminant pour un organisme est définie comme la fraction du contaminant présent dans un (ou des) compartiment(s) de l'environnement et qui est susceptible de subir des modifications liées à des processus physiques, chimiques et/ou biologiques. En général, on observe une partition du contaminant entre les 4 phases du milieu aquatique : la phase sédimentaire, particulaire, dissoute et le biota. Les sédiments jouent un rôle majeur dans la biodisponibilité des HAP dans l'environnement aquatique. En effet, ils agissent comme des puits mais aussi comme des sources permanentes de contamination aux HAP à cause des phénomènes de resuspension et de bioturbation. Les différences physicochimiques qui caractérisent les sédiments, comme la taille et la forme des grains et leur composition organique, peuvent



influencer profondément la biodisponibilité et le degré de toxicité des contaminants associés aux sédiments.

### **En conclusion,**

le milieu aquatique est, par essence, le réceptacle à plus ou moins longue échéance de l'ensemble des rejets directs ou diffus, traités ou non, de l'ensemble des activités anthropiques. A cela s'ajoutent des caractéristiques physico-chimiques spécifiques aux milieux aquatiques: la faible concentration en oxygène dissous, la modification des molécules en milieux aqueux de par leurs polarité et solubilité respectives (Babut et al. 2003; Babut et al. 2002).

En ce qui concerne les milieux marin et estuarien, les paramètres salinité, température, turbidité et les courants induits par les marées ou les mouvements atmosphériques génèrent des fonctionnements très particuliers des molécules en jeu et des organismes (bouchon vaseux et biochimie spécifiques des estuaires).

**Comment les contaminants de type Perturbateurs endocriniens sont-ils susceptibles d'évoluer dans ce type d'écosystème multicompartimenté et complexe que représentent les estuaires?**



### 3. Comportements et devenir des Perturbateurs Endocriniens dans les écosystèmes aquatiques

L'environnement aquatique est le dernier "dépositaire" des mélanges complexes de substances chimiques persistantes. Les organismes y sont donc exposés à de nombreux composés chimiques générant des désordres métaboliques, des maladies, des modifications dans les fonctions comportementale, de croissance, de développement et de reproduction (ICES 2012). De nombreuses publications et rapports décrivent la distribution de substances dangereuses dans l'environnement estuarien et marin ainsi que les perturbations associées de nombreuses espèces (INERIS et al. 2009; Sumpter and Jobling 1995; Kime et al. 1999) (Diamanti-Kandarakis et al. 2009 ; ICES 2012); (OSPAR 2011) (Sanchez et al. 2008);(van der Oost et al. 2003); (Peter et al. 2003).

La féminisation des poissons est le fait marquant des effets des PE sur ces organismes. A ce sujet, la littérature scientifique foisonne, les poissons facilitant sans doute les études sur les ovocytes, la spermiation, la fécondation et le suivi du développement des œufs et des larves (P. Matthiessen and I. Johnson 2007; Matthiessen and Law 2002; P. Matthiessen et al. 2002).

Les poissons sont considérés comme permettant d'anticiper des effets probables sur d'autres vertébrés, dont l'espèce humaine. Paradoxalement, les poissons d'eau douce ont été les plus étudiés par rapport aux poissons marins, (P. Matthiessen et al. 2002) proposent pour expliquer le faible nombre d'études réalisées, la plus grande dilution des contaminants en mer.

#### 3.1. En ce qui concerne les PCB.

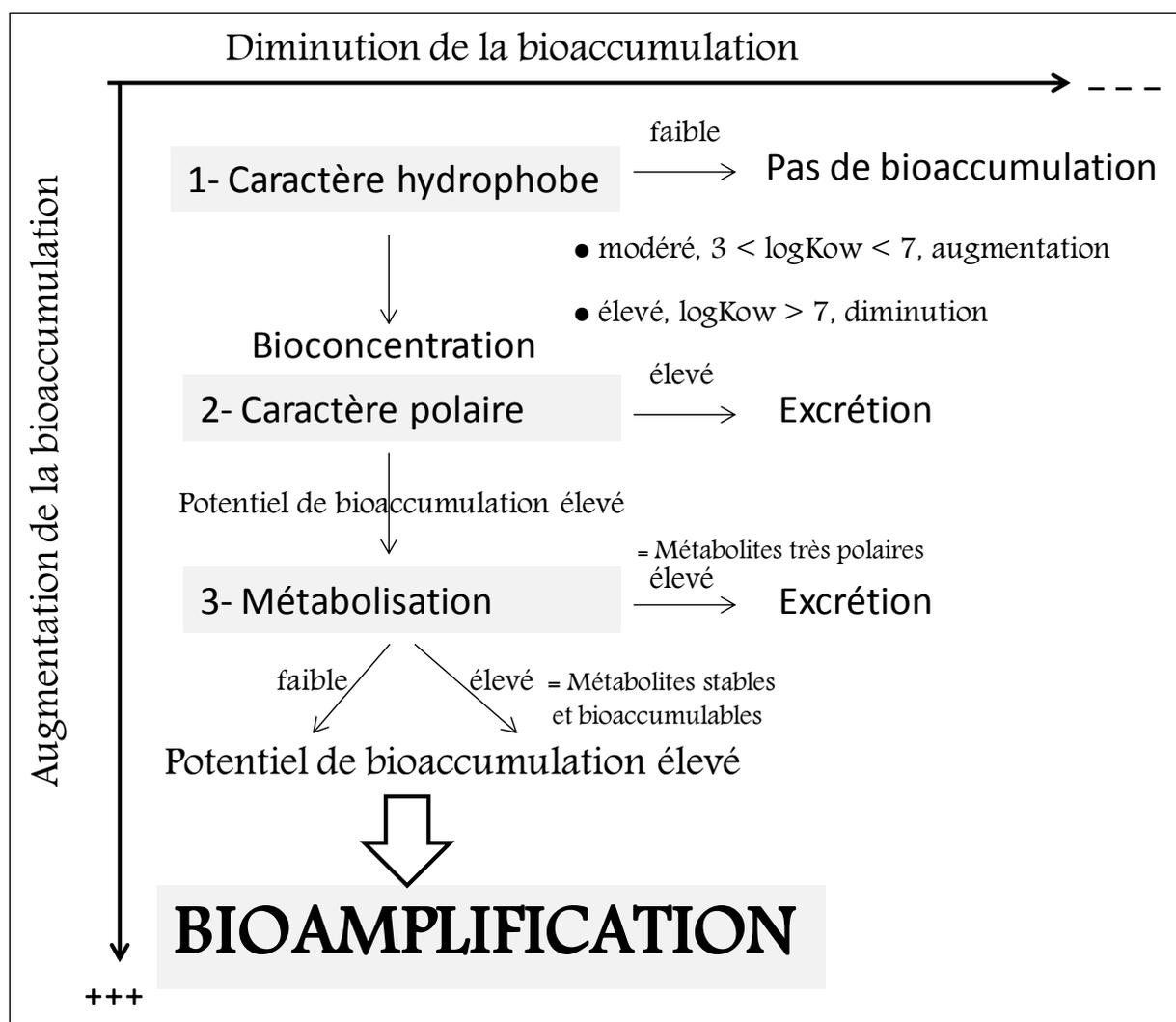
De nombreuses études ont mis en avant leurs effets; leur toxicité a été établie et une réglementation très restrictive a été mise en place dans la plupart des pays industrialisés. (INERIS 2011).

Mais malgré leur interdiction depuis 1987 en France, leur forte rémanence et leur durée de vie (variant de 94 jours à 2700 ans selon les molécules (Plan national PCB, 2010) entraînent leur persistance dans de nombreux organismes et écosystèmes.

Les propriétés physico-chimiques des PCB et des PBDE (Log Kow importants, faibles solubilités) entraînent des interactions spécifiques avec le milieu naturel qui définissent la fraction biodisponible de ces contaminants( fraction pouvant être accumulée par un organisme). Ces processus d'accumulation dans le vivant sont réalisés au travers de plusieurs mécanismes, la bioconcentration, la bioaccumulation et la bioamplification (Mackay and Fraser 2000; Kannan et



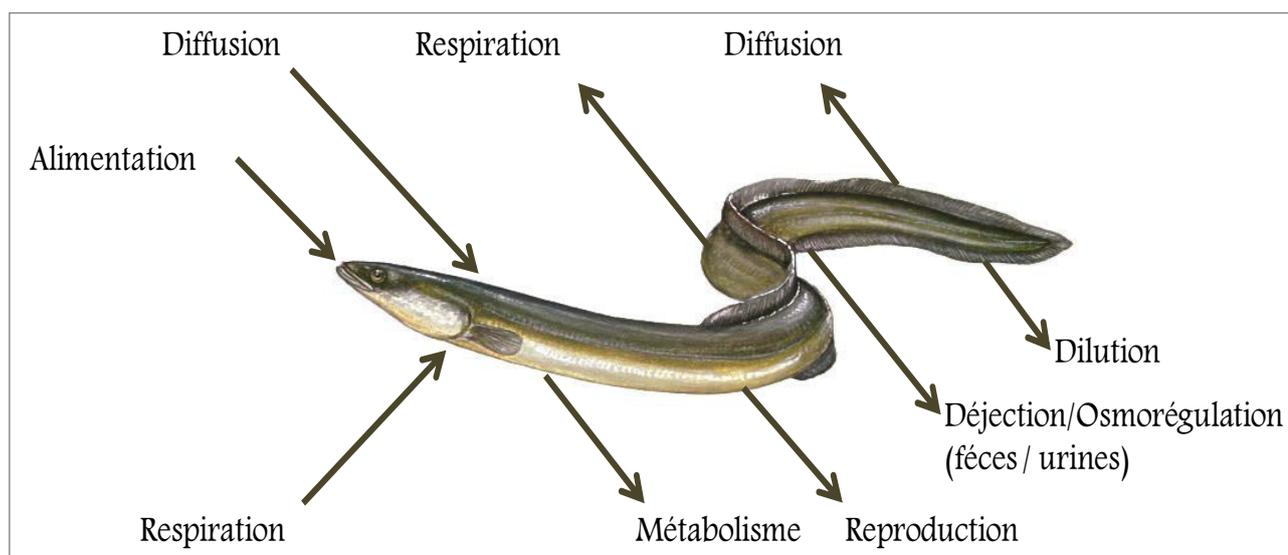
al. 1995) définis précédemment. Cependant, tous les congénères ne vont pas se bioaccumuler de façon identique, les congénères les moins métabolisés, comme le CB 153, font être fortement bioaccumulés (Kannan et al. 1995), alors que des congénères plus métabolisés vont théoriquement peu à peu diminuer le long de la chaîne trophique. Les mécanismes modifiant la bioaccumulation dans un organisme donné sont illustrés en figure 24.



**Figure 24.** Propriétés physico-chimiques des contaminants agissant sur leur potentiel de bioaccumulation adapté de (Norstrom and Letcher 1996)

Le potentiel de bioaccumulation d'un composé dépend donc des propriétés physico-chimiques intrinsèques de la molécule ( $\log K_{ow}$  notamment) et de la physiologie de l'espèce impactée (capacité de métabolisation). Les mécanismes de contamination et de dépuraction au niveau d'un organisme sont illustrés en figure 25.





**Figure 25:** Mécanismes de contamination et de dépuration au niveau d'un organisme, adapté de (D. Mackay and A. Fraser 2000).

Les effets écotoxicologiques à long terme des PCB sont peu connus, mais sont étudiés via plusieurs espèces de poissons gras dont l'anguille Européenne (AFSSA, 2002). Chez cette espèce (EELREP 2005; Haenen et al. 2010; Vincent van Ginneken et al. 2009; Palstra et al. 2006; Geeraerts and Belpaire 2010; Geeraerts et al. 2011; Malarvannan et al. 2014), les PCB sont reconnus pour contribuer de manière significative à leur déclin. En effet, les embryons d'anguilles intoxiqués par des PCB coplanaires développent des œdèmes au niveau du sac vitellin et de la région céphalique et montrent des malformations cardiaques (Palstra et al. 2006).

D'autres embryons montrent des dommages similaires, comme celui du brochet (*Esox lucius*) (Herlder 1980), de la carpe (*Cyprinus carpio*) (Stouthart et al. 1998), de l'omble Américain (*Salvelinus fontinalis*) (Walker and Peterson 1994), de la truite (*Oncorhynchus mykiss*) (Walker and Peterson 1991), ou encore le flet (*Fundulus heteroclitus*) (Couillard et al. 2011).

Certains métabolites comme certains PCB hydroxylés ou certains métabolites méthyl-sulfonylés présentent toujours un caractère lipophile ( $\log K_{ow} > 5$ ) et peuvent se bioaccumuler dans les tissus biologiques (Buckman et al. 2006). Surtout véhiculés par l'eau mais rapidement stockés car hydrophobes; ils se concentrent dans les sédiments et par bioturbation dans la biomasse animale. Souvent à l'état de traces, et dans des matrices complexes, le protocole analytique de quantification nécessite donc fiabilité et précision.



### 3.2. En ce qui concerne le comportement des HAP en milieu aquatique, l'influence de la matrice sédimentaire

Dès leur entrée dans les milieux aquatiques, les HAP sont soumis à divers processus physico-chimiques qui vont influencer de manière prépondérante leur dispersion au sein des différentes phases biotiques et abiotiques présentes. Le caractère apolaire de ces composés leur confère une charge globale neutre qui les exclut de toute interaction mettant en jeu des phénomènes acido-basiques ou de complexation, contrairement aux polluants métalliques. La conséquence de cette hydrophobicité est une forte affinité des HAP pour la matière organique des compartiments biotiques et abiotiques des écosystèmes aquatiques (Hylland 2006). La matière organique présente dans les sédiments et les particules en suspension est un élément primordial intervenant dans les phénomènes d'adsorption et de désorption des HAP. Au niveau de la colonne d'eau et dans l'eau interstitielle des sédiments, la matière organique se présente sous forme particulaire et sous forme colloïdale ou dissoute. La quantité de matière organique, ainsi que sa teneur en acides humiques et en composés aromatiques, sont des paramètres qui vont être déterminants dans le niveau d'adsorption de composés hydrophobes à la surface des particules en suspension : les HAP de la colonne d'eau vont être généralement associés à ce type de particules. La sédimentation de ces particules constitue la principale source de contamination des sédiments lorsque des HAP sont adsorbés sur ces particules. Malgré la grande diversité des associations présentes dans les milieux naturels, c'est la quantité de matière organique qui fixe principalement le niveau d'affinité des HAP pour la matrice sédimentaire (De Witt et al. 1989). L'origine et la nature de la fraction organique ne semblent influencer que pour des HAP de très haut poids moléculaire et pour des ligands présentant une très haute affinité. De façon générale, l'adsorption et l'accumulation des HAP dans les sédiments aquatiques se font par l'intermédiaire du carbone organique total (COT) dont la teneur est proportionnelle à la quantité de matière organique présente. Le niveau d'affinité des HAP pour la matière organique des sédiments est donc évalué par le logarithme du coefficient de partage entre la phase particulaire et l'eau interstitielle, ramené à la teneur en carbone organique total :

$$K_{oc} = K_p / f_{oc} = C_s / (C_d \times f_{oc})$$

où  $K_p$  = coefficient de partage du composé hydrophobe entre l'eau interstitielle et les particules du sédiment (en L/g de sédiment),

$C_s$  = concentration dans la phase particulaire  $C_s$  (en  $\mu\text{g/g}$  de sédiment)



Cd = concentration du composé dissous dans l'eau interstitielle (en  $\mu\text{g/L}$ )

foc = fraction en carbone organique du sédiment (en % ou gr de carbone/100 g de sédiment)

Koc = coefficient de partage du composé entre l'eau interstitielle et le carbone organique du sédiment (en L/g de carbone).

Le Koc est corrélé avec le niveau d'hydrophobicité de la molécule exprimé par le coefficient de partage octanol/eau Kow (Suedel et al., 1993).

Aujourd'hui, les recherches en écotoxicologie prennent en compte le rôle important des sédiments dans la compartimentation et la diffusion des xénobiotiques rencontrés en milieux aquatiques. Les contaminants hydrophobes, pouvant être présents en faible quantité au niveau de la colonne d'eau, trouvent au sein des sédiments des conditions environnementales qui favorisent leur accumulation et leur persistance .

Le haut poids moléculaire et la forte hydrophobicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en particulier, les conduisent à être particulièrement concernés par ce type de phénomènes au niveau des sédiments aquatiques. La contamination des écosystèmes aquatiques par les HAP revêt deux caractéristiques principales :

- ❖ elle est ubiquiste, car ces composés sont présents à l'échelle globale des sédiments dulçaquicoles ou marins dans une vaste gamme de concentrations,

- ❖ elle est croissante, car leur persistance est associée à une forte libération due à l'utilisation à grande échelle de combustibles fossiles, dont la combustion est la principale source de libération des HAP dans les milieux naturels. Les propriétés physico-chimiques des sédiments (granulométrie, teneur en matière organique) influent à la fois sur la persistance des HAP et sur leur diffusion dans les écosystèmes aquatiques. Ces observations conduisent à considérer l'association sédiments-HAP comme une source de contamination diffuse dont les effets à long terme sur la faune aquatique sont très peu connus en conditions naturelles.

Bien que la toxicité aiguë et le caractère mutagène de certains composés de cette famille soient maintenant clairement établis, il apparaît que les HAP peuvent montrer une vaste gamme d'effets létaux et sublétaux sur les organismes vivant à proximité ou dans les sédiments aquatiques. Afin d'évaluer le risque potentiel associé à la présence des HAP dans les sédiments pour l'intégrité des écosystèmes aquatiques, il convient de comprendre les relations existant entre le comportement des HAP en milieu aquatique (en termes de partition et de toxicité) et les caractéristiques physico-chimique des sédiments dans lesquels ils peuvent potentiellement être présents. La mise en place d'études visant l'acquisition d'informations relatives à ce schéma de relations doit nécessairement



prendre en compte un certain degré de complexité des écosystèmes ainsi que les facteurs biotiques et abiotiques susceptibles d'influer sur les HAP présents dans les sédiments aquatiques.

L'étude du devenir et des impacts du pyrène en écosystèmes aquatiques simplifiés reconstitués (microcosmes) a permis de montrer l'influence de deux sédiments naturels, choisis pour les caractéristiques marquées de leur phase organique (un sédiment pauvre en matière organique et un sédiment riche en matière organique d'origine végétale), sur la toxicité du pyrène chez trois invertébrés aquatiques (*D. magna*, *H. azteca*, *C. riparius*) (Godde 2001).

Ces systèmes permettent de contrôler et de suivre un nombre important de paramètres biotiques et abiotiques reliés entre eux par une matrice d'interrelations simplifiée. Le degré de complexité introduit dans les systèmes permet d'obtenir dans le cadre d'études écotoxicologiques, un schéma d'action du xénobiotique introduit, relativement proche de situations rencontrées en milieu naturel.

En dehors de l'intervention de facteurs biotiques, la désorption et donc la remise en solution des HAP comprennent une composante rapide et une composante lente. La désorption rapide est due à la fraction labile des HAP adsorbés qui comprend les molécules possédant un faible niveau d'adsorption sur la phase organique. La désorption lente concerne la fraction non labile des molécules adsorbées, celles possédant un fort niveau d'adsorption. Les HAP de haut poids moléculaire vont donc présenter une adsorption globale très forte qui va influencer de manière importante sur leur diffusion en milieu aquatique. Ces composés, peu dégradables en milieu aqueux, vont présenter une grande stabilité au niveau des sédiments : les demi-vies estimées sont comprises entre 0.3 et 129 jours pour le naphthalène (faible poids moléculaire) et 0.3 et 58 ans pour le benzo(a)pyrène (haut poids moléculaire). La matrice sédimentaire va donc constituer un site de fixation et de stockage préférentiel des HAPs en milieu aquatique (Varanasi and Nishimoto 1985).

D'un point de vue général, la matière organique des sédiments est préférentiellement associée aux particules minérales les plus fines telles que les limons et les argiles. Ce mélange hétérogène forme un manteau enveloppant les particules minérales par le biais de divers types d'interactions physico-chimiques (liaison hydrogène, forces de Van der Waals, liaisons covalentes) qui, au côté des caractéristiques minéralogiques des particules, vont déterminer l'intensité de la liaison entre les deux fractions. Cette relation conduit à observer une relation inverse entre la taille moyenne des particules d'un sédiment et sa teneur globale en matière organique. En conséquence, la fixation d'HAP sur la phase sédimentaire va être en relation étroite avec les fractions minérales les plus fines : certains auteurs ont d'ailleurs observé une certaine corrélation entre la diminution de



la biodisponibilité des HAPs et la diminution de la taille des particules sédimentaires. L'adsorption directe sur la fraction minérale est réalisée seulement si la teneur en COT des sédiments se révèle très basse. **La compartimentation des HAP en milieu aquatique est donc étroitement associée à la partition et à la disponibilité du pool global de COT sédimentaire.**

Ce dernier se répartit entre une fraction organique abiotique qui peut être fixée à la phase minérale, en suspension ou sous forme dissoute dans l'eau interstitielle (particules et colloïdes), et une fraction biotique, constituée par la biocénose aquatique vivant à proximité ou dans le sédiment. Elle est principalement constituée d'invertébrés benthiques appartenant en majorité aux premiers maillons des chaînes trophiques. Les HAP vont donc transiter entre ces différents pools de COT par le biais d'une dissolution en phase aqueuse. Le caractère qualitatif et quantitatif de ces flux est sous la dépendance de gradients thermodynamiques qui vont s'établir entre la phase particulaire, la phase aqueuse, et le compartiment biotique.

**La distribution des HAP dans les différents compartiments de l'environnement est donc directement régie par leurs propriétés physico-chimiques.**

Une étude de (Lipiatou et al. 1997), concernant la zone ouest de la Méditerranée, a estimé que 50 % des HAP introduits dans cette zone finissent incorporés dans les sédiments côtiers (0-200m de profondeur), et près de 13 % dans les sédiments compris entre 1000 et 2000m de profondeur. Les phénomènes de bioturbation, de resuspension et de diffusion les remettent ensuite en circulation dans les eaux marines. Ils peuvent être absorbés (ou ingérés) par les organismes dits « filtreurs »

### **3.3. En ce qui concerne la biodisponibilité des HAP chez les poissons**

La remise en circulation des HAP les entraîne dans les réseaux trophiques océaniques où ils présentent divers processus de bioaccumulation, voire de bioamplification, surtout chez les invertébrés. Cependant chez les vertébrés marins, les HAP ne s'accumulent que faiblement dans les tissus, empêchant la bioamplification au niveau supérieur de la chaîne alimentaire. Bien que les HAP puissent être partiellement métabolisés par les animaux aquatiques, ils sont en grande partie rejetés dans les excréta et les matières fécales ou encore libérés par la décomposition des organismes morts et recyclés à nouveau dans les sédiments (Evrard 2009). La connaissance des phénomènes de métabolisation et de détoxification chez les organismes marins est essentielle à la compréhension des effets toxiques et à leur prédiction. Dans le cas d'une pollution, il est



nécessaire de distinguer les fractions de contaminants auxquelles les organismes sont exposés (biodisponibilité) et les fractions accumulées par ces mêmes organismes (bioaccumulation)(Hubaux and Perceval 2011).

### 3.4. En ce qui concerne la bioaccumulation des HAP chez les poissons: écotoxicologie

La bioaccumulation considère deux principales voies d'entrée des substances chimiques dans l'organisme: l'eau, par le biais de la respiration, et la consommation d'aliments eux-mêmes contaminés. Les substances ingérées sont susceptibles d'être éliminées de façons diverses. Il y a bioaccumulation lorsque les quantités de substances apportées à l'individu dépassent les quantités éliminées. Les substances bioaccumulées doivent d'abord être bioconcentrées, stockées dans les graisses et ne pas être biotransformées. Chez les organismes vertébrés supérieurs, la bioaccumulation des HAP est très minoritaire comparée aux phénomènes de biotransformation (Geffard 2001; Ribeiro et al. 2005).

La grande capacité des organismes à métaboliser les HAP ne permet pas de bioamplification, mais on assiste néanmoins à une bioaccumulation *via* la chaîne trophique (Babut et al. 2009).

Les sédiments marins et estuariens sont un réservoir pour de nombreux polluants, et particulièrement pour les HAP hydrophobes. L'impact des contaminants sédimentaires sur les organismes aquatiques est aujourd'hui bien connu. Aux Etats-Unis, les autorités estiment que 10 % des rivières, lacs et baies sont contaminés par des composés toxiques qui peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques mais aussi affecter la santé des personnes qui consomment poissons et crustacés de ces milieux. La gestion de la qualité des milieux aquatiques, et plus particulièrement le compartiment sédimentaire, est donc devenue une priorité pour de nombreux pays. La toxicité potentielle de ces sédiments est évaluée à l'aide de bioessais et d'études sur la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Il est recommandé d'utiliser plusieurs tests biologiques faisant appel à plusieurs organismes (bactéries, algues bivalves, amphipodes, polychètes, poissons) (Davies and Vethaak 2012). Ceci permet de prendre en compte la différence de sensibilité des espèces vis à vis des différents contaminants et d'évaluer l'impact des sédiments sur des organismes occupant différents niveaux des chaînes trophiques.

Toutes ces approches intégrées ont été utilisées afin de développer des seuils de toxicité pour les sédiments (Louiz et al. 2008; EPA 2007). Ainsi, plusieurs limites existent, notamment avec les sédiments présentant des contaminations moyennes. La biodisponibilité des contaminants, ainsi



que la présence d'un composé non déterminé ou pour lequel il n'existe pas de valeur guide, peuvent avoir un impact important sur la toxicité du sédiment. En effet, les seuils ne tiennent pas en compte les produits de dégradation des composés organiques (comme les métabolites de HAP) qui peuvent être plus toxiques que les composés parents.

Lors des études écotoxicologiques, les corrélations entre les effets biologiques et la qualité des sédiments définie à l'aide de ces seuils de toxicité ne permettent pas d'en déduire des relations de causes à effets et par conséquent, d'identifier avec justesse les contaminants responsables des effets observés. Ces critères de toxicité n'ont pas pour but d'évaluer avec exactitude la qualité d'un sédiment ou de remplacer la réalisation de tests biologiques. Ils ont été développés pour donner un outil pratique et relativement fiable aux gestionnaires afin qu'ils puissent déterminer quelles sont les zones côtières, estuariennes et portuaires les plus impactées par une pollution, les classer en fonction de leur contamination, identifier celles qui doivent être restaurées en priorité et supporter ou recommander le développement de programmes de surveillance de la qualité des sédiments. L'utilisation de ces seuils de toxicité constitue des outils puissants pour évaluer la qualité d'un milieu lorsqu'ils sont couplés à des tests de toxicité, d'accumulation ou des études sur les communautés benthiques (Evrard 2009; Le Dû-Lacoste 2008).

#### **En conclusion,**

PCB et HAP entraînent de nombreux effets sur les fonctions biologiques des organismes aquatiques et ce, à différents niveaux d'organisation du vivant.

Leur présence en mélange peut, par ailleurs, exacerber les effets perturbateurs chez certaines espèces. (Ankley et al. 2010).

#### **A ce titre, peut-on évaluer la qualité du milieu en suivant la contamination des organismes aquatiques ligériens en polluants émergents?**

Existerait-il un lien entre la présence de contaminants de type perturbateurs endocriniens et d'éventuels dysfonctionnements dans la fonction de reproduction de l'anguille européenne, poisson "phare" de l'économie du secteur estuarien ligérien, et qui pourrait être un facteur supplémentaire d'explication à son déclin?

Il est donc apparu opportun d'orienter notre étude relative à l'évaluation de la contamination potentielle de l'estuaire de la Loire en PE, en s'appuyant sur la biologie de l'anguille européenne, espèce aujourd'hui menacée, en couplant les données biométriques, histologiques et physiologiques de cet organisme, à des analyses chimiques de ses tissus en contaminants.



#### 4. L'espèce sentinelle retenue : L'anguille européenne, *Anguilla anguilla*

##### 4.1. L'anguille européenne, *Anguilla anguilla* : un cycle de vie et une biologie hors du commun

Appartenant phylogénétiquement au superordre des Elopomorphes et à l'ordre des Anguilliformes, le genre *Anguilla* compte 15 espèces à l'échelle mondiale et colonisent tous les océans en dehors de l'Atlantique Sud (Watanabe et al. 2004). Depuis les investigations pionnières de (V van Ginneken and GE Maes 2005; Schmidt 1923) une ébauche de cycle de vie a pu être établie et complétée au fur et à mesure des découvertes liées aux méthodes d'investigations de plus en plus sophistiquées technologiquement. Suite à ces études remarquables (pour revue, V van Ginneken and GE Maes 2005), deux métamorphoses et deux migrations transocéaniques de longue distance ont été repérées chez l'anguille européenne (Figure 26).

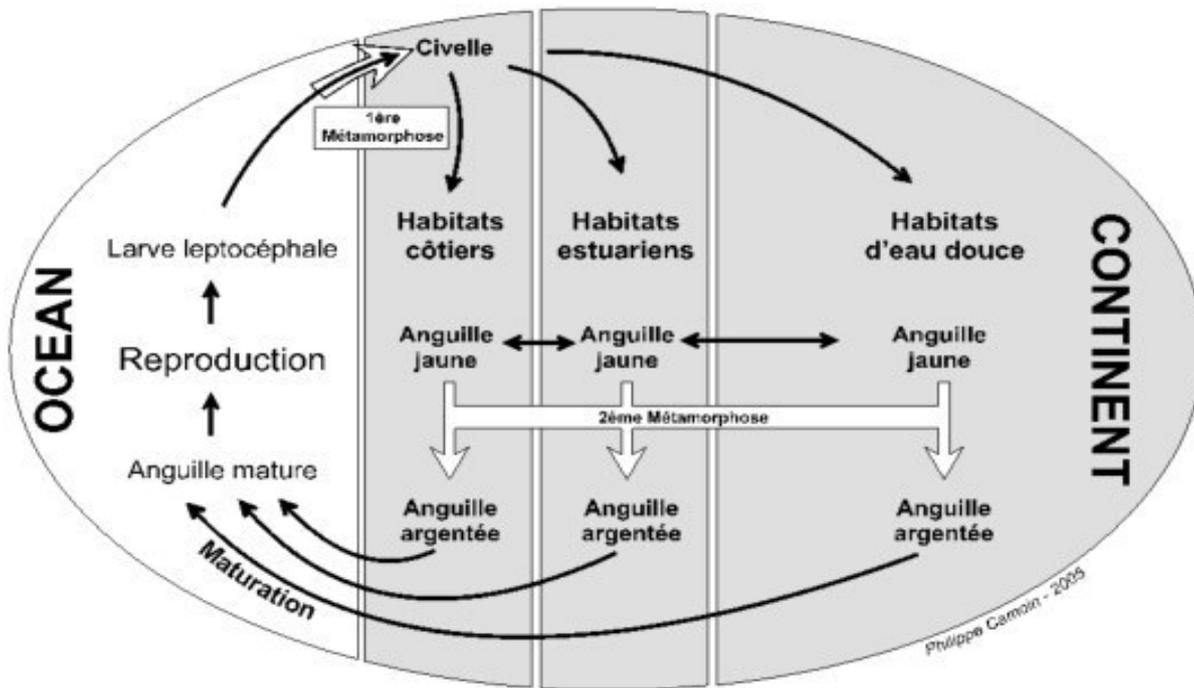


Figure 26. Cycle de vie de l'anguille Européenne par Camoin P.; 2005.

La première métamorphose est subie par la larve leptocephale (photo N°1), larve translucide en forme de feuille de saule dont la morphologie est adaptée à la vie pélagique et à la dérive océanique. Son originalité réside dans la présence d'une machoire composée de dents dont le rôle reste flou, tout comme sa biologie et le déterminisme de sa métamorphose d'ailleurs.





**Photographie 1:** Larve leptocéphale d'anguille européenne; IFREMER.

La composition en glycoaminoglycanes (GAG) du corps gélatineux de cet organisme lui confère un rôle de maintien grâce à une structure corporelle extracellulaire richement hydratée et lipophile. Ces GAG sont supposés fournir des polysaccharides de réserve catabolisés lors de la métamorphose en civelle, durant laquelle la petite anguille perd ses dents et ne s'alimente plus (Bertin 1951). Ce catabolisme des GAG lié à la métamorphose génère en outre une diminution conséquente (environ 80%) de la teneur corporelle en eau. Cette métamorphose de la larve leptocéphale en civelle (photo N°2) correspond à de profonds remaniements morphologiques, physiologiques et comportementaux, considérés comme une adaptation à la future colonisation des biotopes continentaux. En effet, la civelle acquiert une forme sub-cylindrique (anguilliforme), adaptée à la nage à contre courant et à l'enfouissement dans le sédiment (Edeline et al. 2005; Edeline et al. 2006). Une nouvelle denture est acquise et l'intestin se développe et s'allonge jusqu'à former un estomac (V van Ginneken and GE Maes 2005; Elie et al. 1982). Ainsi, les civelles acquièrent la double capacité à osmoréguler en eau de mer ou en eau douce, en s'adaptant à la salinité du milieu (Tesch 2003).



**Photographie 2:** Civelles stade II pêchées en entrée d'estuaire de Loire (Janvier 2012).

Cliché I. Blanchet-Letrouvé



Cette première métamorphose en civelles a lieu au pied du talus continental, suite à la **première migration** de retour vers les eaux continentales, laissées 1 à 2 ans plus tôt par leurs géniteurs.

La civelle colonise de façon passive les eaux continentales (estuaires, rivière, marais et lacs), et se pigmente progressivement jusqu'au stade anguilette (petite anguille jaune). Ce début de coloration permet de définir des stades pigmentaires, marqueurs de la progression de la métamorphose (Elie et al. 1982). La fin du stade civelle et donc celle de la métamorphose, correspond à la pigmentation totale du corps et au passage au stade anguilette, ou jeune anguille jaune, au cours de laquelle la croissance reprend.

Cette phase de croissance de l'anguille jaune, plus longue, va durer 4 à 6 ans chez le mâle tandis qu'elle peut durer de 8 à 20 ans, voire 40 ans chez les femelles.

**La seconde métamorphose** (Dufour et al. 2003) débute avec l'initiation de la maturation sexuelle et la mise en place d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et hormonaux conséquents, loin d'être élucidés: c'est le phénomène de l'**argenture**, phénomène progressif préparant à la longue **seconde migration**, celle de la reproduction.



**Photographie 3:** Femelle d'anguille européenne en cours d'argenture (Anonyme)

L'âge et la taille auxquels interviennent le début de la maturation sexuelle sont sexe-dépendants. Les mâles s'argentent plus jeunes et à une taille inférieure à celle des femelles (Bertin 1951, 1956). L'argenture peut être réversible, les anguilles régressant alors au stade jaune si nécessaire selon leur état de santé général (Durif et al. 2005; Chu et al. 2006).



Pré-adaptation à la migration transocéanique à grande profondeur (Sébert et al. 2007; Fontaine et al. 1985), l'argenture correspond à l'acquisition d'une robe argentée caractéristique des poissons marins, à un épaissement de la paroi de la vessie natatoire, un élargissement des diamètres oculaires (Bertin 1951; Pankhurst and Lythgoe 1983) et à l'augmentation du nombre de cellules à chlorure des branchies, afin de faciliter l'adaptation à l'hypo osmorégulation en eau salée. Ce phénomène dont on connaît mal les paramètres déclencheurs, est un processus subtil, résultat d'un ensemble d' "activateurs" environnementaux et hormonaux, peu et mal caractérisés. En effet, le début de la maturité sexuelle semble sous dépendance hormonale forte (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal 1991; Dufour et al. 2003; Leloup-Hatey et al. 1988 ; Peyon et al. 1998; Mazzeo et al. 2012; Weltzien et al. 2009), mais aussi sous dépendance de facteurs environnementaux tels que la pression hydrostatique à laquelle les anguilles argentées doivent se préparer (Sébert et al. 2007). Cependant, 3 semaines en caissons hyperbares ne suffisent pas à induire de manière significative une augmentation du rapport gonado-somatique (GSI ou RGS) (Kopecka-Pilarczyk and Coimbra 2010), contrairement aux anguilles jaunes soumises à de fortes pressions quelques jours, pour lesquelles on observe une diminution dans le contenu en glycogène (substrat anaérobie), une augmentation dans l'activité lactate déshydrogénase et une accumulation des acides gras totaux, substrat aérobie exclusif (Sébert et al. 2004).

D'autres facteurs sont suspectés d'induire la maturité sexuelle, tant chez les femelles que chez les mâles comme la nage (van den Thillart et al. 2009).

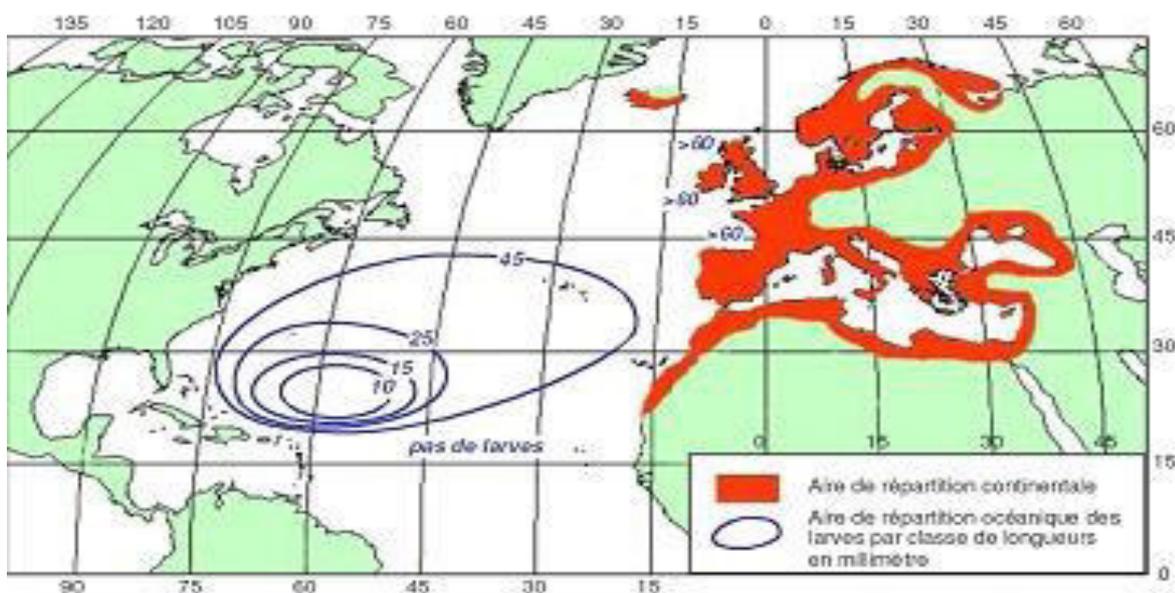
Afin d'obtenir des outils de biosurveillance des géniteurs au niveau d'un bassin versant, (Durif et al. 2005), ont développé un index relatif à l'argenture (Silvering Index), prenant en considération les différents paramètres externes (poids, taille, diamètre de l'oeil, et longueur de la pectorale), permettant d'estimer statistiquement les organismes sédentaires par rapport aux organismes réellement migrants parmi les argentées, et ce, avec une précision de 82%.

Malgré de nombreux travaux visant à comprendre la physiologie de la reproduction de l'anguille, à mimer les conditions d'une fécondation optimale chez l'anguille européenne et beaucoup d'intuitions visionnaires de la part de certains auteurs, précurseurs en ce domaine et non encore égalés (Fontaine et al. 1964; Palstra and van den Thillart 2009) la migration de l'anguille européenne reste mystérieuse tant dans sa partie comportementale (départ de la migration , décalage temporel et spatial entre les deux sexes) que dans sa partie physiologique (métamorphose leptocéphale/civelle, argenture, fécondation, ponte). En effet, cet organisme très



original et quelque peu provocateur dans sa rétention d'informations scientifiques, entreprend une des migrations de reproduction les plus longues parmi les poissons thalassotoques. Sur près de 5500 km, les anguilles européennes se déplacent vers leurs aires de frai supposées, la mer des Sargasses, au Sud des Bermudes et au large des Bahamas. Cette migration exceptionnelle l'est d'autant plus qu'elle reste partiellement inconnue, malgré les récentes découvertes. Ainsi, en 2006, Castonguay et al., (Institut Maurice-Lamontagne à Mont-Joli, Québec) montrent l'existence de migrations verticales quotidiennes lors de leur progression en mer, entre 600 mètres de profondeur le jour et 200 m de profondeur la nuit, et ce, grâce à une vingtaine de femelles adultes équipées d'un repérage satellite. Pleine de promesses, elles ont quitté l'Europe mais les appareils se sont détachés prématurément de leur dos et la trace des poissons a été perdue après 1300 kilomètres.

Il est suggéré que ces migrations verticales quotidiennes puissent correspondre à une stratégie de thermorégulation pour contrôler le développement des gonades ou bien une méthode visant à s'éloigner de prédateurs (Aarestrup and al. 2009).



**Figure 27:** Aire de répartition de l'anguille européenne (A.a L. 1758), adaptée de Germain (1927) pour l'aire continentale et SCHMIDT (1924) pour la répartition océanique des larves.

Cette migration de dévalaison en direction de la mer des Sargasses pour s'y reproduire est leur dernier voyage puisque l'anguille ne se reproduit qu'une fois (selméparité) et meurt. Ces six mois de traversée en conditions de jeûne pour atteindre leur site de frai et y pondre, ferment la boucle du cycle de vie (figure 27).



Après la rencontre des sexes, la ponte et la fécondation sur lesquelles aucune information n'a jamais filtré du fond des océans, les jeunes leptocephales décrites précédemment éclosent et empruntent plus ou moins activement le courant du Gulf Stream (Figure 27).

Les modes de déplacement restent source de discussions (van der Oost). Deux ans seront nécessaires pour revenir vers les sites parentaux en eaux estuariennes et douces, rythmés par la métamorphose en civelles.

Cependant, les travaux de thèse de Edeline, (2005) montre que l'anthropisation récente des milieux de rivière, en diminuant la fitness associée à un comportement de colonisation des eaux douces, induit probablement une baisse de l'expression du comportement migrateur chez l'anguille.

**Au niveau reproductif**, cette espèce catadrome atteint la maturité sexuelle après environ 6 ans de vie en eau douce pour les mâles et 10 à 20 ans pour les femelles (Tesch 2003). Le stade anguille jaune constitue la phase de croissance proprement dite, au cours de laquelle l'anguille va acquérir taille et réserves énergétiques suffisantes (ou normalement suffisantes) pour la migration de ponte et la maturation des gonades conjointement (Van Ginneken & Van Den Thillart 2000, Van Den Thillart et al. 2004, Van Ginneken et al. 2005). La jeune anguille jaune est hermaphrodite non fonctionnelle (Bertin 1951) et présente en parallèle dans la gonade non différenciée, ovogénèse et spermatogénèse.

Déjà en 1950, D'Ancona constatait la présence d'une phase réversible où la gonade primordiale passait par "une sorte de testicule" (Colombo, 1984).

En effet, l'individu jaune n'a pas de gonade différenciée, mais un organe dit de Syrski possédant des cellules reproductrices germinales commençant à se multiplier lorsque le poisson atteint 10-12 cm. Les cellules germinales se différencient ensuite pour partie en ovogonies (à 14 cm de longueur du corps), alors que d'autres se différencient en spermatogonies (à 18 cm de longueur du corps). La différenciation sexuelle définitive intervient lorsque le poisson atteint une taille d'environ 25-30 cm, mais les gonades sont encore très loin de leur maturité sexuelle. Les facteurs précis du **déterminisme du sexe** sont quasiment inconnus (Tesch, 1977; 2003), mais semblent principalement environnementaux et corrélés à la densité de la population (Krueger & Oliveira 1999) ainsi qu'à une compétition vis-à-vis des ressources alimentaires. Huertas M. et al., (2006) montrent que des anguilles (dont la maturité sexuelle a été induite par des extraits hormonaux) stimulent le développement de mâles immatures qu'elles fréquentent, ce qui suggère une possible communication chimique entre les organismes. Ces résultats sont en accord avec les observations



réalisées en fermes aquacoles où le développement des mâles est favorisé par la forte densité des individus (Adam et al.; 2008). L'argenture est d'ailleurs aussi corrélée à l'alimentation, et les conditions favorables de croissance diffèrent en fonction du type d'écosystème et au sein même d'un écosystème, avec l'existence d'un gradient décroissant en faveur des mâles, de l'aval vers l'amont.

Les informations dont nous disposons au niveau de la physiologie de la reproduction et de l'histologie des gonades sont donc le fruit de nombreuses études réalisées sur des anguilles en captivité, car aucune anguille n'a jamais été collectée proche ou sur son aire de frai. A ce titre, Fontaine (Fontaine et al. 1964; Fontaine 1936) a été un précurseur en la matière puisqu'il a obtenu des femelles à maturité grâce à des injections d'extraits de HCG.

#### 4.2. Une espèce sémelpare en danger

Depuis le milieu des années 60, l'anguille Européenne a enregistré une nette diminution de sa population au niveau des pays d'Europe du Nord (Moriarty and Dekker 1997); par contre, le déclin des civelles n'a été observé qu'à partir des années 80 dans le cadre de programmes internationaux de surveillance de l'espèce (Dekker, 2003), déclin finalement enregistré plus tôt que prédit; il semble qu'il ne soit pas uniquement le résultat d'une baisse dans l'immigration des civelles (van der Meer et al. 2011), mais aussi le résultat cumulatif de facteurs abiotiques.

De nombreux scientifiques s'accordent sur une diminution de l'ordre d'un facteur 10 durant les deux décennies écoulées (Moriarty and Dekker 1997). Les différentes causes proposées par les auteurs spécialistes de l'anguille Européenne ont été synthétisées par Feunteun, (2002), et cet auteur propose en parallèle une série de mesures de gestion du stock et de restauration visant à stopper cette disparition annoncée.

Les raisons de ce déclin sont probablement multiples, incluant des facteurs climatiques affectant la circulation océanique globale (Castonguay et al. 1994b, Knights 2003), et des facteurs anthropiques tels que la médiocre qualité des eaux les diverses sources d'exposition à des cocktails de contaminants (Palstra, 2006), la réduction des habitats comme les zones humides, la multiplicité des obstacles à la migration (comme les barrages), la surpêche (Dekker 2003) ou encore les infestations virales et parasitaires, en particulier celle du vers *Anguillicola crassus*, importé par l'anguille japonaise (Lefebure et al. 2004; Elie and Girard 2009; Gérard et al. 2013).



Cependant, une cause ne semble pas être plus déterminante qu'une autre et c'est plutôt de l'addition de l'ensemble de ces causes que résulte ce déclin engagé. Patrick Lambert (IRSTEA, Bordeaux) s'interdit de "hiérarchiser toutes ces causes de disparition de l'anguille. C'est toutes ensemble qu'elles deviennent si préoccupantes pour l'anguille", (communication orale). Cette espèce est d'autant plus fragilisée qu'il n'existe qu'un seul stock européen, toutes les anguilles naissant au même endroit, en mer des Sargasses, au sud de la Floride (Sruoga A. et al., 2007).

Aidées par les courants marins, le long des côtes d'Europe du sud, les civelles sont intensément pêchées, car elles sont à la base d'une forte tradition culinaire locale. Elles sont également exportées vers l'Europe du Nord pour soutenir les pêcheries et l'aquaculture locales et depuis quelques années vers les fermes aquacoles asiatiques.

La pêche est un facteur non négligeable de diminution de la population d'anguilles. Ainsi dans certains estuaires, comme celui de la Vilaine qui est fermé par un barrage, le taux de capture des civelles avoisine les 95%. Un taux d'exploitation entre 10 et 15% est estimé dans les autres estuaires salés. Si l'on ajoute à cela les 15% de civelles prélevées en eaux douces et les 10% d'anguilles jaunes, Ainsi, des scientifiques ont évalué que le stock de géniteurs de la mer des Sargasses serait trop faible pour que la reproduction se réalise convenablement.

Patrick Lambert a mis au point un modèle qui permet d'avoir une vision globale de la population d'anguilles dans un bassin versant. L'objectif est de calculer la production d'anguilles argentées à partir d'arrivées de civelles. Pour ce faire, le modèle intègre les principaux processus biologiques, le vieillissement, la différenciation sexuelle et le déterminisme du sexe, la préparation au retour vers la zone de reproduction, la mortalité naturelle et le déplacement des anguilles. Ce modèle a permis d'explorer l'influence de la densité d'anguilles sur certains processus (mortalité, déterminisme du sexe et déplacement), influence qui complique sensiblement la dynamique de la population. D'autres mécanismes peuvent aussi être ajoutés pour adapter le modèle à une situation donnée, comme les mortalités dues à l'homme ou encore l'impact des barrages. (EELREP 2005).

**Qu'en est-il des recherches actuelles et des expérimentations permettant d'observer des effets néfastes potentiels sur la reproduction de l'anguille Européenne?**



### 4.3. Les effets des contaminants sur l'anguille européenne.

En raison de sa forte teneur en matières grasses par rapport à d'autres poissons ( de 3 à 20 fois plus), les composés lipophiles comme les PCBs et autres toxiques persistants dans l'environnement ont été prioritairement recherchés chez l'anguille, espèce commercialisée et reconnue pour sa forte bioaccumulation de contaminants (V van Ginneken and GE Maes 2005; de Boer et al. 2010; de Boer and Hagel 1994; Maes et al. 2008). Les grandes différences intersites observées suggèrent que l'anguille jaune est un bon bio-indicateur de pollution locale.

Plusieurs études récentes désignent les PCB et autres composés dioxin-like comme responsables potentiels et additionnels du déclin actuel de l'anguille européenne; (Geeraerts and Belpaire 2010; Belpaire et al. 2011; Robinet and Feunteun 2002; V. van Ginneken et al. 2009), bien qu'il soit difficile de démontrer des relations de causes à effets à l'échelle populationnelle, en raison de la complexité et les zones d'ombre de leur cycle de vie.

Plus spécifiquement, en raison de sa charge importante en matières grasses, les contaminants lipophiles commencent à être suivis dans cet organisme. A ce titre, Geeraerts (2011), a suivi l'évolution de la quantité de matières grasses sur des jaunes anguilles (de 2000 à 2007 sur 38 sites avec 4 à 10 organismes /site) et obtenu un taux moyen de 0,7 à 27,4% avec de fortes variations individuelles. L'impact de la contamination par les PCBs, composés très lipophiles, en particulier sur la reproduction de l'anguille, reste indéterminée. Cependant, (Palstra et al. 2006) a stimulé artificiellement la maturité sexuelle de males et femelles argentés et étudié les effets de composés dioxin-like dans les muscles et les gonades lors du développement embryonnaire. Ainsi, le niveau de 4 ng TEQ kg<sup>-1</sup> gonade montre des "effets dévastateurs" sur le développement et la survie des embryons d'anguilles obtenus par fécondation artificielle (effets tératogènes).

En outre, Robinet et Feunteun (2002) suggèrent que ces composés pourraient entraîner le déclenchement précoce de l'argenture et de la migration d'avalaison, avant que des ressources énergétiques suffisantes n'aient été stockées par les organismes partant pour la migration transocéanique de reproduction. Certains niveaux de contamination par des polluants organiques réduiraient la fertilité des anguilles (Malarvannan et al. 2014; Van Der Oost et al. 1996b; Tapie et al. 2011).



#### 4.4. Une stratégie de préservation en cours

Les différentes recherches et investigations menées montrent un déclin effectif des anguilles Européennes, et divers programmes ont vu le jour dans plusieurs directions afin d'essayer d'enrayer le problème.

- d'une part, reconstituer à terme le stock panmictique à partir de l'objectif principal consistant à augmenter l'échappement vers la Mer des Sargasses des reproducteurs potentiels provenant de chaque bassin (Farrugio and Elie 2011).

➔ **EXTRAITS DU RÈGLEMENT (CE) No 1100/2007 DU CONSEIL du 18 septembre 2007**

**instituant des mesures de reconstitution du stock d'anguilles européennes**

*Article 2*

##### **Élaboration d'un plan de gestion de l'anguille**

1. Les États membres recensent et définissent les différents bassins hydrographiques situés sur leur territoire national qui constituent l'habitat naturel de l'anguille européenne (ci-après dénommés «bassins hydrographiques de l'anguille»); ces bassins peuvent comprendre des eaux marines.
2. Sur présentation des justifications appropriées, un État membre peut désigner l'ensemble de son territoire national ou une unité administrative régionale existante comme constituant un seul bassin hydrographique de l'anguille
3. Les États membres élaborent un plan de gestion de l'anguille pour chaque bassin hydrographique tel que défini au paragraphe 1.
4. L'objectif de chaque plan de gestion est de réduire la mortalité anthropique afin d'assurer avec une grande probabilité un taux d'échappement vers la mer d'au moins 40 % de la biomasse d'anguilles argentées correspondant à la meilleure estimation possible du taux d'échappement qui aurait été observé si le stock n'avait subi aucune influence anthropique. Le plan de gestion des anguilles est établi dans le but de réaliser cet objectif à long terme.

- d'autre part, tenter de réaliser son élevage, à partir de fécondation *in vitro* plus durable, comme il l'est déjà réalisé pour l'anguille japonaise.

En effet, dès 1998, suite aux positions et aux propositions des scientifiques européens, le CIEM (Comité International pour l'Exploration de la Mer) et la FAO ont considéré que le stock d'anguilles était en dehors de ses limites biologiques de préservation de l'espèce, et que les pêcheries n'étaient plus durables.

En 2004, le conseil de l'Union Européenne a donc préconisé des mesures d'urgence en attendant la mise sur pied d'un plan de gestion (Acou et al. 2011). En ce qui concerne la France, un plan national a été mis en œuvre (COGEPOMI, Baisez), afin de collecter et regrouper des informations (Farrugio and Elie 2011)



*Evaluation de la contamination de l'estuaire de la Loire en Perturbateurs Endocriniens*

## *EN CONCLUSION*

"L'évaluation des impacts sur la reproduction en écotoxicologie est un réel défi pour l'évaluation du risque écologique" a souligné Jeanne Garric, Directrice de recherche, IRSTEA de Lyon, lors du colloque concernant les PE et la biodiversité en Mai 2014: "Perturbateurs Endocriniens, changement de paradigme dans la Biodiversité ?".

En effet, il existe des relations avérées entre des substances chimiques et l'observation de perturbations endocriniennes (féminisation des poissons, déclin des alligators...). La priorité est donc de prévenir et de réduire le risque écotoxique, en considérant les fenêtres d'exposition afin de préserver l'équilibre de la biodiversité, et par conséquent l'adaptation écologique.

En parallèle, de nouveaux outils doivent être développés, et une harmonisation de l'ensemble des techniques expérimentales utilisées, mise en œuvre.



## ***PARTIE 2***

# ***STRATEGIE DE RECHERCHE***



## I. INTRODUCTION

A la rencontre du milieu marin et des eaux douces continentales, l'estuaire de la Loire est la partie du fleuve dont le fonctionnement est le plus complexe. Il s'y concentre d'importants enjeux aussi bien sur le plan écologique qu'économique où s'imbriquent :

- ❑ des activités portuaires et industrielles de grande ampleur (Centrale électrique de Cordemais, stockage de gaz de GDF, raffinerie Total ...)
- ❑ des agglomérations importantes (Nantes, Saint Nazaire)
- ❑ un littoral attractif, des sites d'intérêts écologiques majeurs avec la présence d'espèces patrimoniales (faune, flore), des zones naturelles très diversifiées à haute valeur productive (marais salants de Guérande, marais de Brière, de Goulaine et de l'estuaire entre autres) (GIP 2009).

## II. Approche de la zone d'étude

La présente étude a été abordée comme une quête en cascades de différents indices permettant de démontrer ou d'infirmer la présence de perturbateurs endocriniens (PE) en estuaire de la Loire, et éventuellement, d'observer et d'identifier des conséquences potentielles sur la fonction de reproduction de certains organismes vivants, en particulier l'anguille européenne. En effet, des manifestations de perturbations endocriniennes ont été démontrées chez des scrobiculaires prélevées à l'embouchures de l'estuaire (Fossi Tankoua et al. 2012).

Quelles étaient les différentes sources potentielles de perturbateurs endocriniens au niveau de l'estuaire, susceptibles d'induire de l'intersexe chez des mollusques?

### 1. Méthode d'investigation

Une investigation des différentes sources probables de contaminants, directes ou diffuses, a été réalisée avec le partenariat des administrations du début de thèse: DIREN et DRIRE (regroupées aujourd'hui en DREAL), l'ONEMA, le GIP Loire estuaire et différentes communes, communautés de communes ou d'agglomération.



Cette première démarche de recherche bibliographique a permis de rassembler les connaissances relatives à l'estuaire de la Loire et à son fonctionnement, tant au niveau socio-économique, physico-chimique, écologique, que toxicologique. Cependant, les données sont souvent peu récentes et restent fragmentaires, donc difficilement exploitables.

La seconde démarche visait à cerner la faisabilité des recherches de terrain, et surtout leur représentativité vis-à-vis des rejets d'effluents d'une part, et des compartiments en jeu d'autre part. En effet, la colonne d'eau, premier compartiment récepteur des contaminants, est en interactions constantes et complexes avec les autres compartiments (atmosphérique, biologique, sédimentaire). Se surajoute à ces phénomènes interactifs, le comportement hydrodynamique spécifique de l'estuaire et des paramètres associés (marées, crues/étiages, salinité, températures, courantologie, turbidité, bouchon vaseux, oxygénation,...). L'évaluation de la contamination potentielle de la colonne d'eau est donc apparue plus aléatoire tant la multifactorialité était conséquente (variabilité qualitative et quantitative, paramètres physico-chimiques sont nombreux et variables), même en utilisant des échantillonneurs passifs.

Les sédiments étant des concentrateurs reconnus de la majorité des contaminants, l'investigation sur les sédiments et leur imprégnation potentielle en contaminants de type Perturbateurs Endocriniens, non encore évoquée en estuaire de Loire, est-elle apparue pertinente.

## **2. Les différents sites d'échantillonnage sédimentaires**

Afin d'échantillonner les sédiments estuariens en tant que "vitrine potentielle" de la contamination des eaux estuariennes, les stations d'épuration des eaux usées (STEU), localisées en rives Sud et Nord de l'estuaire de la Loire, ont été répertoriées, catégorisées et sélectionnées.

Celles-ci représentent des rejets ponctuels d'eaux (effluents) dans l'environnement aquatique, mais dont la qualité et les quantités ne sont pas toujours bien définies.

Sur les 42 STEU existantes, 12 ont été sélectionnés en fonction des paramètres suivants: quantité et qualité des effluents, vétusté des installations, respect des normes européennes, capacité en équivalent/habitant, et ce, afin de définir des sites de prélèvements des sédiments (Tableau 3).



Des sites accessibles ont été ensuite repérés à proximité des effluents se jetant directement, ou indirectement, dans l'estuaire de la Loire, et la collecte de sédiments a été réalisée à proximité de STEU dites d'intérêt d'Octobre 2009 à Janvier 2010, en dehors des périodes de crues. Ainsi, d'aval en amont, 12 sites ont été finalement testés dont un site à vocation de témoin positif (T); (il correspond au ruisseau " le Boire torse", ancien bras de Loire dans lequel sont rejetés en direct des effluents de station d'épuration d'Anetz).

Points de prélèvements	cote	Caractéristiques STEU (m <sup>3</sup> , Kg/j de DBO <sub>5</sub> , Eq/Hab)	Type de traitement ( en 2009)
1-Saint Nazaire	0	675/243/4500	Lagunage- prétraitement
2-Donges	+2	1450/508/7600	-
3-Paimboeuf aval	+14	-	-
4-Paimboeuf amont	+25	1200/360/6000	Prétraitement déphosphatation biologique
5-Couëron	+48	Pas de STEU, refoulement vers Tougas	
6-Rezé	+56	31700/7300/122000	-
7-Nantes Hôpital	+62	-	-
8-Sainte Luce Bellevue	+70	-	-
9-Mauves sur Loire	+80	450/172/2900	Aération
10-Oudon	+82	-	-
11-Ancenis	+90	Rejets de traitement de la station de pompage d'eau potable	-
12-Anetz (T)	+94	150/54/900	Aération, boues activées

**Tableau 3.** Caractéristiques des sites échantillonnées et STEU correspondantes: quantité et qualité des effluents, vétusté des installations, respect des normes européennes, capacité en équivalent/habitant

L'objectif est de caractériser tant l'exposition des sédiments à de potentiels contaminants, que l'imprégnation des organismes échantillonnés par la suite.

### 3. Définition de la zone d'étude: la zone de balancement des marées de l'estuaire de la Loire

L'approche de la zone d'étude a donc été réalisée par compartiment (**amont, intermédiaire et aval**), correspondant d'une part, à l'évolution de la salinité des eaux et aux variations d'amplitude de la

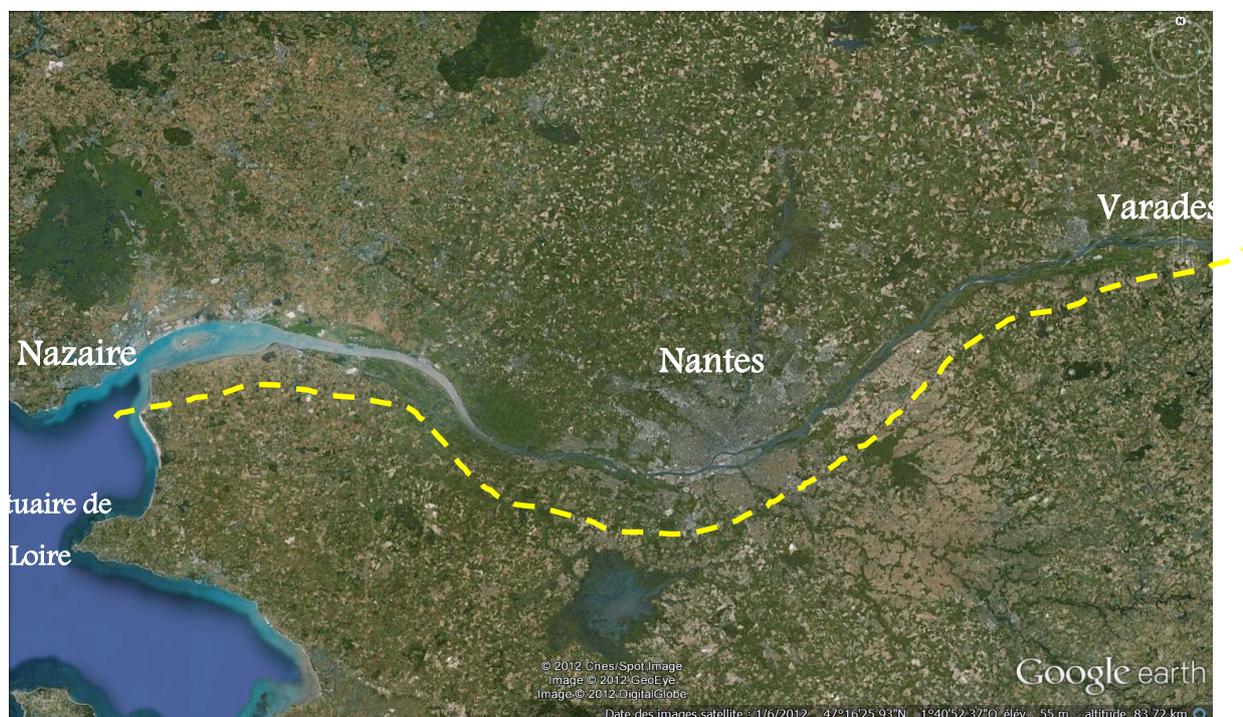


marée dynamique d'amont en aval, d'autre part, à la présence de sources potentielles de contaminants, directes ou diffuses, le long de l'estuaire.

D'un point de vue sédimentaire, l'estuaire de Loire se divise en trois zones:

- ❑ un estuaire externe ou aval correspondant à un vaste golfe dont les fonds sont de nature sableuse ou vaso-sableuse
- ❑ au centre, le fond apparaît essentiellement vaseux, avec des îles et des bancs sableux
- ❑ un estuaire interne, à l'Est du seuil de Bellevue, où la pente du lit est beaucoup plus abrupte, avec des fonds plus grossiers.

La zone d'étude s'étend sur environ cent kilomètres de long; elle est divisée en trois tronçons de prélèvement pour l'anguille : amont (Varades), intermédiaire (Nantes) et aval (Cordemais), afin de caractériser les classes de taille des organismes à une période donnée et obtenir le sex-ratio de la fraction de population d'anguilles prélevée en estuaire de Loire à ces mêmes périodes, et ce, en fonction des paramètres hydrodynamiques du secteur, et des pressions environnementales distinctes le long de l'estuaire.



**Image 4.** Visualisation générale de la zone d'étude estuarienne, de l'embouchure (St Nazaire, aval) à la limite de remontée dynamique des eaux salées (Varades, amont)



### III/ Des sédiments estuariens potentiellement exposés par des contaminants de type PE

Les différents sites de prélèvement de sédiments ont été déterminés en croisant les informations relatives à la présence d'un rejet d'effluent de station d'épuration, les caractéristiques de la station d'épuration, et la proximité de la Loire ou d'un de ses étiers (Tableau 3).

Ainsi, d'aval en amont, 12 sites ont été finalement testés dont un, à vocation de témoin positif (T); (Anetz (T) correspond à un échantillonnage ciblé sur le ruisseau " le Boire torse", ancien bras de Loire dans lequel sont rejetés en direct les effluents de station d'épuration de la commune d'Anetz) (Figure 28).

L'objectif de cet échantillonnage est d'évaluer le niveaux de contamination des sédiments de Loire, par des contaminants organiques de type perturbateurs endocriniens (PE), et ce, au niveau de sites supposés différents.

La stratégie suivante est basée sur une combinaison de tests biologiques et d'analyses chimiques afin de réaliser un criblage de différentes familles de contaminants, susceptibles d'induire des activités endocriniennes.

La première approche est basée sur l'expression de gènes cibles (gène rapporteur ou gène endogène) dont l'expression est modulée par différents types de polluants PE, à l'aide de tests *in vitro* (lignées cellulaires).

Ces tests ont été appliqués à la détection d'activités oestrogéniques, (anti)androgéniques et dioxin-like dans les extraits de sédiments.

La seconde approche consiste à réaliser en parallèle, un comparatif avec les analyses chimiques ciblées sur différentes familles de polluants organiques (HAP, PCB,...) afin de déterminer la contribution de polluants prioritaires dans les activités toxiques détectées.



## 1. Méthodologie des prélèvements de sédiments en estuaire de Loire.

Le prélèvement a été effectué avec une cuillère en aluminium nettoyée à l'alcool entre chaque prélèvement d'échantillon; chaque échantillon ainsi récolté est placé en bacs aluminium fermés, datés et localisés, afin d'être congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Lyophilisation des sédiments

La lyophilisation des sédiments est réalisée afin d'en éliminer toute trace d'eau, celle-ci pouvant générer d'éventuelles interactions lors des différentes étapes de l'extraction ASE. Cette étape est également nécessaire à des conditions expérimentales convenables lors de la manutention des sédiments en évitant qu'ils ne forment de la boue. Après lyophilisation, les sédiments sont stockés à l'abri de la lumière en attente de l'extraction.





**Figure 28** : Zone de prélèvement des sédiments et des organismes cibles : de St Nazaire à Varades, 100 km correspondant à la zone estuarienne.

**Sédiments** : 1 : Saint Nazaire, 2 : Montoir de Bretagne, 3: Paimboeuf aval, 4: Paimboeuf amont, 5: Couëron, 6: Rezé, 7: Nantes Hopital, 8: Nantes Bellevue, 9: Mauves sur Loire, 10: Oudon, 11 : Ancenis, 12: Anetz.

**Anguilles** : C: Cordemais, D: Nantes, E: Varades



*Evaluation de la contamination de l'estuaire de la Loire en Perturbateurs Endocriniens*

### 3. Evaluation de la présence de perturbateurs endocriniens à partir de tests sur lignées cellulaires

#### 3.1. Préparation des échantillons par Accelerated Solvent Extraction (ASE)

Les échantillons ont été préparés par ASE (Accelerated Solvent Extraction) à l'ISM Bordeaux II et les extraits sédimentaires obtenus ont été conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ce travail a été réalisé en collaboration avec O. Fossi-Tankoua (O. Fossi-Tankoua. 2013).

Le protocole suivi implique les étapes suivantes:

- 1-Tamissage des sédiments (mailles du tamis : 2 mm)
- 2-Préparation de 13 cellules classiques environnement d'ASE de 22 mL, une cellule supplémentaire servant de témoin)
- 3-Remplissage des 13 cellules de billes de verres de 2 mm de diamètre en introduisant au préalable au fond de la cellule un petit filtre
- 4- Disposition des cellules et flacons de verre sur l'appareil à l'endroit adéquat,
- 5-Lancement d'une extraction à blanc (rincage) de toutes les cellules selon le protocole utilisé pour l'extraction en ASE des sédiments (INERIS, 2009).

Conditions d'Extraction	
Solvants (qualité HPLC) Acétone/Dichlorométhane	(50 : 50 v/v)
Température	75°C
Pression	103 Bars
Preheat	0 min
Heat	5 min
Static	5 min
Flush	60% Vol
Purge	60 secondes
Nombre de cycles	3

**Tableau 4.** protocole utilisé pour l'extraction en ASE des sédiments (INERIS, 2009).



6-Les cellules rincées la veille sont vidées de leurs billes en verre en maintenant toutefois une petite partie au fond de la cellule. Tarées, remplies de sédiment (environ 5g de sédiment /cellule) et pesées, on rajoute ensuite d'autres billes avant de refermer hermétiquement la cellule.

7-Une cellule contenant uniquement des billes en verre servira de blanc extraction.

8-Préparation de 13 flacons de verre ambré de 60 mL de contenance. Ils sont refermés par un bouchon à insert. Ils serviront à recueillir chacun un extrait.

9-Extraction en ASE suivant le protocole précédemment mentionné

10-Récupération des extraits qui sont mis à évaporer au RapidVap (tableau 5). On rajoute 1 flacon qui contiendra juste le mélange de solvant ayant servi pour l'extraction en quantité à peu près équivalente à celle des extraits obtenus (Blanc solvant).

Speed (%)	70
Heat (°C)	51
Temps	35 min
Vaccum Bar	600

**Tableau 5** . Paramètres du RapidVap utilisés pour l'évaporation des extraits sédimentaires (INERIS, 2009).

11-Les extraits presque entièrement évaporés sont repris par le mélange des solvants d'extraction et transférés dans des flacons de verre plus petits (20 mL de contenance).

12-Les extraits repris sont mis à évaporer (éviter l'évaporation complète) au concentrateur sous flux de d'azote) à chaud.

13-Les extraits sont à nouveau repris dans très peu de solvant (mélange) et transférés dans



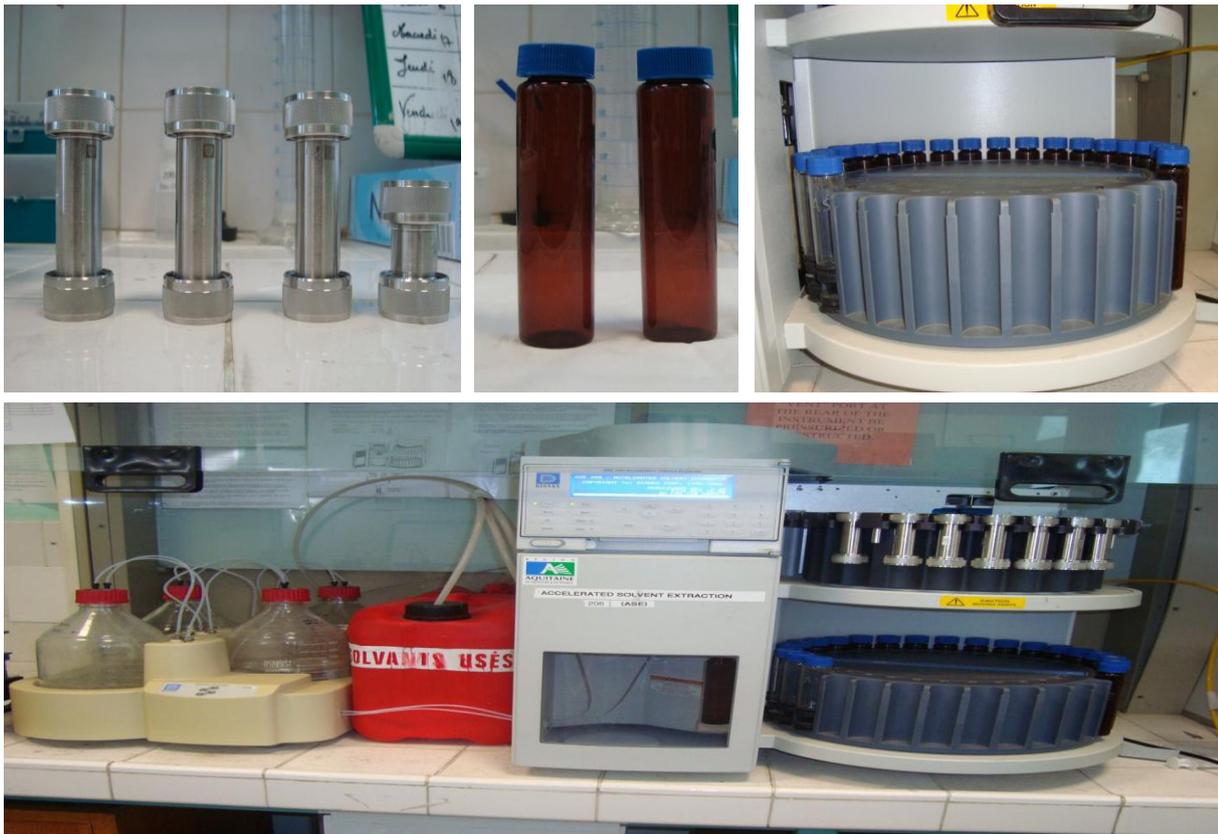
des piluliers de verre de 2 mL préalablement étiquetés

14-Les extraits contenus dans les piluliers sont remis au concentrateur jusqu'à évaporation complète des solvants

15-Les extraits secs sont ensuite repris avec 500 µL de DMSO. Les piluliers sont refermés (bouchons avec insert) et passés au vortex. Un pilulier contenant uniquement du DMSO assurera le blanc DMSO.

16-Les extraits sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.





**Photographie 4.** Matériel utilisé lors de l'extraction par ASE

A. Cellules d'ASE de 22 ml; B. Flacons ambrés collecteurs; C. Collecteur de fractions; D. Système d'extraction ASE.; clichés O.Fossi Tankoua (2010).

### 3.2. Tests *in vitro* sur cultures cellulaires

L'évaluation de la présence des contaminants de type PE dans les sédiments estuarien a été réalisée à l'aide de tests *in vitro* sur cultures cellulaires permettant une mise en évidence spécifique de composés mimant les hormones sexuelles naturelles dans des extraits sédimentaires.

Les tests sur lignées cellulaires reposent sur la capacité d'un composé à se lier au récepteur, et à activer la réponse du gène rapporteur associé à ce récepteur (Figure 29; INERIS). Les différents récepteurs cibles concernés par cette étude sont : les récepteurs des œstrogènes (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ), des androgènes (AR) et de la dioxine (AhR, aryl-hydrocarbène). Ce sont en effet les voies les plus classiques de la perturbation endocrinienne. Les activités induites par les extraits sédimentaires sont comparées à celles de témoins positifs connus que sont : le 17 $\beta$ -œstradiol (E $_2$ ) pour la mesure de l'activité œstrogénique, la flutamide (Fluta) pour la mesure de l'activité anti-androgénique, le



benzo[a]pyrène (BaP) pour la mesure de l'activité HAP-like, le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) pour la mesure de l'activité dioxine-like.

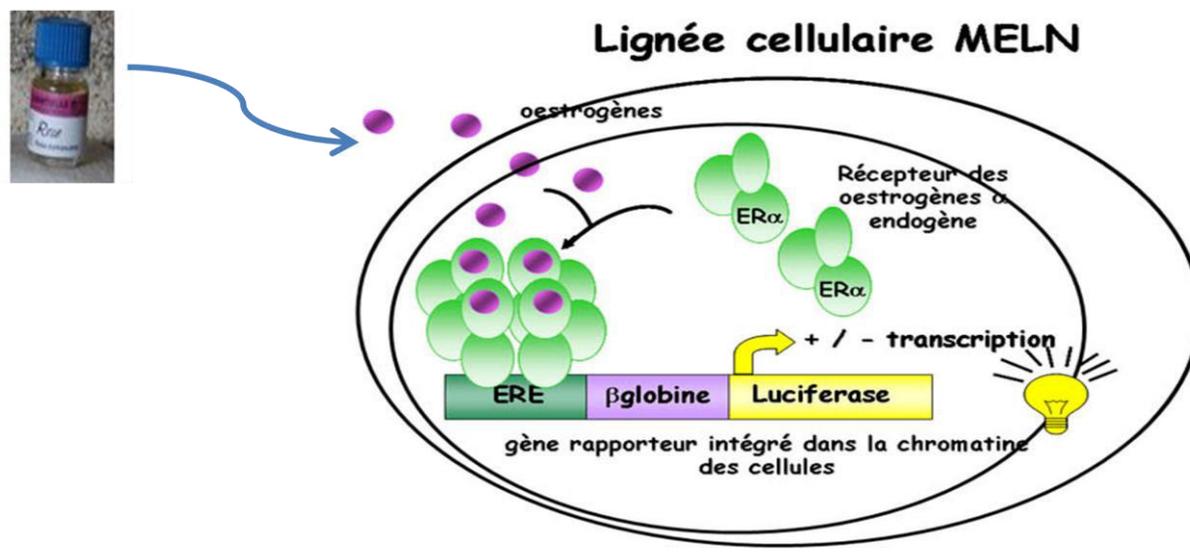


Figure 29. Principe du test sur lignées cellulaires à partir d'un extrait sédimentaire

### 3.2.1. Culture cellulaire et tests des échantillons

Les lignées cellulaires MELN et MDA-kb2, dérivées de cellules de cancer du sein, sont cultivées à 37°C sous 5 % de CO<sub>2</sub> dans du milieu nutritif complet DMEM (Dulbecco's modified Earle's Medium, Gibco) en présence de 5 % de sérum de veau fTmtal (SVF) et 1 % d'antibiotiques. Les cellules PLHC1, dérivées de cancer du foie de vairon tropical, sont cultivées à 30°C sous CO<sub>2</sub> dans du milieu EMEM (Earle's salt minimal essential medium, Gibco) supplémenté par 5 % de SVF et 1 % d'antibiotiques. Vingt-quatre heures avant le test, les cellules sontensemencées en plaques de cultures de 96 puits à raison de 50000 cellules par puits. Pour le test d'activité oestrogénique (cellules MELN), le milieu est remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol et en présence de SVF préalablement déstéroïdé.

Les cellules sont exposées pendant 4 h (PLHC-1) et/ou 24 h (MELN, MDA-kb2, PLHC-1) aux différents extraits dilués 1000 fois dans le milieu de culture (concentration finale de 0.1 % v/v), ceci afin de s'affranchir d'une toxicité du solvant. Chaque plaque de culture inclue un témoin négatif (solvant seul), un témoin positif (Oestradiol 10nM, dihydrotestostérone 10 nM, benzo(a)pyrène 0,3 µM ou dioxine 1nM, selon le test) et une gamme de différentes dilution de



chaque échantillon (0,1 à 0,001 % vol/vol). Pour les activités anti-androgéniques, le principe consiste à co-exposer les cellules MDA-kb2 à l'échantillon en présence de DHT à 0,3 nM (test d'antagonisme spécifique) et à 0,3 µM (test d'inhibition non spécifique). Après exposition, l'activité luciférase (cellules MELN et MDA-kb2) est mesurée par luminescence après ajout du substrat luciférine (0,3 mM) dans les puits. L'induction du CYP1A (cellules PLHC-1) est déterminée par la mesure de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufine-Odééthylase) au spectrofluorimètre après ajout de 7-éthoxyrésorufine (2 µM) dans les puits. Les résultats bruts sont exprimés en % de l'activité maximale obtenue par le témoin positif.

Lorsque les échantillons sont positifs, les courbes dose-réponse sont modélisées (modèle 4 paramètres de Hill) et les EC25 (concentration en échantillon donnant 25 % d'effet) sont déterminées.

Les concentrations en équivalents-toxiques (Tox-EQ) sont alors calculées selon l'équation.

**Tox-EQ = EC25 de la substance de référence / EC25 de l'échantillon, en ng/g de sédiment sec.**

Les limites théoriques de détection dans l'échantillon sont calculées à partir de l'EC5 (concentration donnant 5 %).

L'inconvénient majeur des essais *in vitro* est l'incapacité à prendre en compte la bioaccumulation *in situ* par manque de capacité métabolique.

La caractérisation et la quantification de contaminants peuvent s'appuyer sur des méthodes *in vitro* utilisant des cultures cellulaires, alternatives intéressantes à l'expérimentation animale (INERIS et al. 2009).

### **3.2.2. Préparation du test luciférase**

Les extraits sont mis à décongeler sous la hotte. Le témoin positif utilisé est l'œstradiol (E<sub>2</sub>). Les solutions diluées 200 fois à partir de la solution d'extrait brute (concentration 200) sont préparées dans des microtubes de 2,5mL. Toutes les solutions sont ensuite conservées à 4°C en attendant le lendemain pour les tests.

Chaque extrait ainsi que les témoins sont testés aux concentrations 1 (solution mère non diluée), 0,3 (30µL de 1x + 70µL de DMSO), 0,1 (30µL de 0,3x + 60µL de DMSO), 0,01 (10µL de 0,1x + 90µL de DMSO).



Pour l'échantillon d'extrait sédimentaire provenant du site d'Anetz, une dilution supplémentaire a été réalisée. 0.001 (.10µL de 0.01x + 90µL de DMSO). En effet, il s'agit d'un prélèvement réalisé dans l'objectif d'obtenir au moins une réponse oestrogénique positive sur l'ensemble des prélèvements; il a donc été échantillonné directement dans le ruisseau collectant les effluents d'une STEP(- de 100 m) dont les rejets sont caractéristiques d'une commune rurale densément peuplée (cité "dortoir").

### **3.2.3. Préparation des cellules**

La lignée cellulaire utilisée (lignée MELN) est obtenue à partir de la lignée du cancer du sein MCF-7, qui exprime naturellement le récepteur des œstrogènes ER $\alpha$ , et dans laquelle un gène rapporteur œstrogène-régulé a été transfecté (ERE- $\beta$ Glob-Luc).

Les cellules ont été repiquées une semaine avant la réalisation des tests (cultivées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, dans du milieu DMEM complet, contenant 5% de sérum de veau fœtal et 1% d'antibiotiques). Quarante-huit heures avant le test, le DMEM complet est vidé et les cellules lavées au PBS (20mmL). Vingt millilitres de milieu DMEM déstéroïdé (milieu blanc) y sont introduits. Le milieu blanc a la particularité de ne pas contenir de Rouge de phénol, colorant ayant des propriétés oestrogéniques et pouvant donc interférer avec le test (Berthois et al, 1986).

Les cellules sont ensuite trypsinées puis centrifugées (se reporter au protocole du test luciférine-Lignée MELN *in* (Kinani et al. 2009).

Une vérification microscopique de la confluence des cellules est réalisée. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Mallassez et le nombre de cellules/mL estimé. Des dilutions sont effectuées afin d'obtenir environ 100 000c /mL (5 plaques) et 50 000c/ mL (11 plaques); les cellules sont ensuiteensemencées sur des plaques blanches opaques et sur une plaque transparente à raison de 100µL/puits. Ces plaques sont mises à incuber à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> pendant une nuit.

### **3.2.4. Préparation des solutions**

Ces solutions sont préparées sous la hotte dans des microtubes de 2.5mL (stérilisés aux UV pendant 15min et étiquetés) à partir des 200x.



Pour chaque gamme de solution 200x : on prélève 3µL de solution 200x auxquels on ajoute 197µL de milieu blanc avant d'homogénéiser. Un témoin supplémentaire 3x DMSO est réalisé. 50µL x3 de chaque gamme sont distribués dans les plaques et on ajoute une gamme pour l'E<sub>2</sub>. Les 4 plaques sont mises à incuber à 37°C pendant 18h (test Luciférine) et 24h (test MTT).

### ***3.2.5. Tests ICI et préparation des solutions***

L'ICI est un antagoniste de substances oestrogéniques, car il bloque leur action en se fixant sur les récepteurs aux œstrogènes sans pour autant les activer. Ce test a pour but de rechercher le mode d'action des extraits dont l'action oestrogénique a été mise en évidence par le test sur cellules MELN. Le test ICI est effectué sur des cellules MELN (plaques de 50 000c/mL)ensemencées la semaine suivante. Les extraits sont testés non dilués.

## **4. Identification et quantification des contaminants analysés dans les sédiments**

Le but de l'analyse chimique de ces sédiments est de déterminer la contamination des sédiments de l'estuaire de la Loire et de compléter la première approche par tests cellulaires qui vient d'être effectuée.

Compte tenu des réponses obtenues, et de l'implication des HAP dans les différentes industries, ainsi que de la densification de l'urbanisation sur le secteur estuarien (circulation intense, présence de deux incinérateurs, pollution atmosphérique (INERIS/VALORENA 2003), ce sont ces composés qui ont été en priorité dosés dans les sédiments.

Ainsi, les sédiments lyophilisés subissent une extraction et les extraits obtenus sont analysés en HPLC-Fluo.

Les chromatogrammes obtenus suite à cette procédure analytique permettent d'identifier et de quantifier les différents composés présents dans les sédiments, et par conséquent, d'estimer la contamination en HAP de l'estuaire de la Loire.



#### 4.1. Extraction des sédiments lyophilisés à l'ASE 350

L'extracteur ASE 350 (Dionex) est utilisé afin de réaliser les extractions des sédiments lyophilisés. Cet appareil est relié à un ordinateur permettant le paramétrage des différentes conditions d'extraction par l'intermédiaire d'un logiciel appelé Chromeleon 7. Lors de l'extraction des sédiments, des cellules d'extraction de 22 mL inertes vis-à-vis des échantillons sont utilisées. Avant tout remplissage, un filtre est placé dans le fond de la cellule (figure 30 ). Puis, du sable de Fontainebleau ou des billes de verre sont ajoutés à l'intérieur des cellules pour terminer leur remplissage, matrices solides ayant un minimum d'interactions avec les composés à étudier. Avant chaque utilisation des cellules, du sable de Fontainebleau ou des billes de verre, un lavage approfondi de chacun est réalisé à l'aide de l'ASE en utilisant la même méthode d'extraction que celle utilisée ultérieurement pour l'extraction des échantillons.

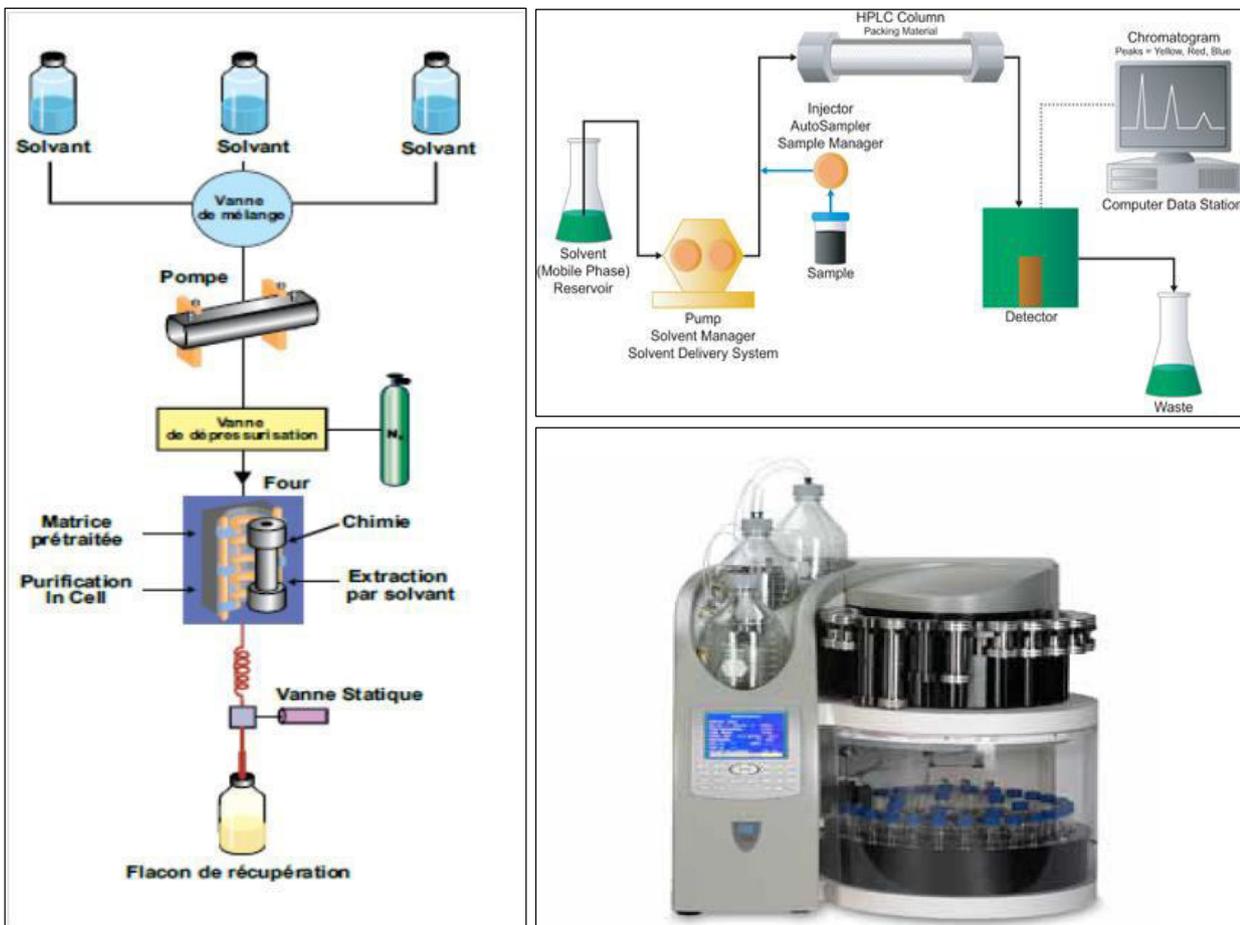


Figure 30. Matériel d'extraction et d'analyse des sédiments

L'extraction à proprement parlé peut alors débuter: les cellules sont placées sur le carrousel supérieur de l'ASE tandis que les flacons permettant de recueillir les extraits sont placés dans le



carrousel inférieur de l'ASE. En raison de ses propriétés chimiques (gaz inerte), l'azote est utilisé pour augmenter la pression au sein de la cellule et purger l'extrait de la cellule en fin d'extraction. Le nombre de cycles d'extraction optimal est défini lors de l'élaboration de la méthode afin d'extraire un maximum de contaminants des sédiments.

#### 4.1.1. Extraction des HAP

3 réplicats d'extraction ont été réalisés sur 3 prises d'essai de 1 g de sédiments pour chacun des points de prélèvement sédimentaire. A chaque série d'extraction un blanc est réalisé. Celui-ci correspond à une cellule ne contenant que du sable de Fontainebleau. La méthode d'extraction utilisée a déjà été mise au point au laboratoire Mer, Molécule et Santé (MMS, équipe CONTAMAR) et suit les conditions décrites dans le tableau 6. Les rendements d'extraction des HAP sont déterminés à l'aide d'un sédiment certifié (référence: CRM104-50G).

Conditions d'Extraction	
Solvants (qualité HPLC)	Hexane puis dichlorométhane
Température	150°C
Static	5 min
Flush	60% Vol
Purge	60 secondes
Nombre de cycles	2

**Tableau 6** : protocole utilisé pour l'extraction en ASE des sédiments dans l'objectif de la détermination des teneurs en HAP.

#### 4.1.2. Préparation des extraits à analyser

Lorsque l'extraction est terminée, l'extrait est transvasé, ainsi que les volumes de rinçage, dans des flacons munis d'une tétine sur la partie inférieure. Les volumes de rinçage des flacons recueillant les extraits permettent de recueillir un maximum de composés à analyser. Ces flacons munis d'une tétine sont ensuite placés dans un appareil appelé TurboVap II (Biotage). Leur contenu va ainsi être évaporé jusqu'à ne laisser que le volume de la tétine, soit 1 mL environ. L'évaporation se fait sous azote qui est un gaz inerte et à l'aide d'un bain marie à 35°C. Une fois l'évaporation jusqu'à environ 1 mL terminée, l'extrait restant et les volumes de rinçage sont



transférés dans des vials de 2 mL. L'étape de rinçage est réalisée à 3 reprises afin de récupérer un maximum des composés. Cette première étape d'évaporation ne doit pas être faite à sec car certains des composés à analyser sont volatils et pourraient être perdus le cas échéant. Néanmoins, à ce stade de la préparation des extraits, les composés sont dans le solvant d'extraction qui est plutôt apolaire. L'analyse se faisant ensuite par HPLC en phase inverse, il faut faire en sorte que ces composés se trouvent dans un solvant plutôt polaire (acétonitrile). A chacun des extraits ainsi récupérés dans un vial sont alors ajoutés 200 µL de diméthylformamide (DMF). Le DMF est un solvant dense et très peu volatil. Une deuxième évaporation sous azote intervient alors pour permettre d'évaporer les solvants apolaires présents dans l'extrait tout en préservant les composés volatils à analyser restant dans le DMF qui s'évapore peu. Lorsqu'il ne reste plus que 200 µL de liquide dans les vials environ (volume correspondant à celui du DMF ajouté), leur volume est complété jusqu'à un volume précis de 1 mL avec de l'acétonitrile et à l'aide d'une seringue Hamilton de 500 µL. Les vials sont ensuite stockés dans un frigo en attente de l'analyse HPLC-Fluo.

## **4.2. Analyse des extraits sédimentaires par HPLC-Fluo**

### ***4.2.1. Matériel utilisé***

La chaîne HPLC utilisée est appelée commercialement Ultimate 3000 (Dionex) Elle est couplée à un détecteur de fluorescence du même fabricant. Le logiciel d'acquisition et de retraitement des données est Chromeleon 7. La colonne HPLC utilisée est une colonne apolaire Supelcosil LC-PAH (Sigma-Aldrich), la taille des particules est de 5 µm, sa dimension : 25 cm de longueur et 3 mm de diamètre. La pré-colonne est de même nature que la colonne (Supelco LC-18, 2 cm de longueur et 3 mm de diamètre). Il s'agit donc d'une HPLC en phase inverse. La phase mobile utilisée est par conséquent polaire et est composée d'un mélange d'eau MilliQ et d'acétonitrile (ACN).

### ***4.2.2. Paramètres de l'analyse en HPLC-Fluo***

La chaîne d'HPLC permet la séparation de solutés contenus dans un mélange grâce aux différentes propriétés physico-chimiques des composés. En fonction des interactions entre solutés/phase stationnaire/phase mobile, le temps de séjour des composés dans la colonne est variable ce qui conduit à des temps de rétention différents. La séparation des solutés se matérialise sur le



chromatogramme par la présence de pics bien séparés. L'identification des composés se réalise grâce à l'observation des temps de rétention et la quantification peut alors être faite grâce à l'aire de leur pic. Pour réaliser une séparation correcte des composés, il faut adapter le gradient d'élution, c'est-à-dire la composition de la phase mobile (proportions eau MilliQ/ACN) pour modifier sa polarité au cours du temps. L'HPLC en phase inverse indique que la phase stationnaire est apolaire et aura donc tendance à retenir les composés apolaires, la phase mobile utilisée sera donc de plus en plus apolaire au cours du temps pour permettre l'élution des composés les plus apolaires. La température de la colonne est aussi un paramètre sur lequel il est possible de jouer pour améliorer la séparation entre les différents solutés. En sortie de colonne et une fois séparés, les solutés seront mis en évidence par un détecteur de fluorescence.

Avant chaque injection d'un échantillon, un blanc est réalisé et correspond à l'injection d'ACN. Il est utilisé pour permettre un rinçage de la chaîne. Puis, un standard est injecté à son tour afin de vérifier la reproductibilité de l'analyse d'un jour à l'autre et il sert de référence pour les futurs échantillons. Grâce au logiciel Chromeleon 7, la méthode d'acquisition et celle du traitement des chromatogrammes sont sélectionnées. Lors de l'analyse d'un échantillon, lorsque les pics obtenus sur le chromatogramme sont saturés, l'échantillon en cause est dilué avec de l'ACN et injecté à nouveau.

#### 4.2.3. Analyse des HAP par HPLC-Fluo

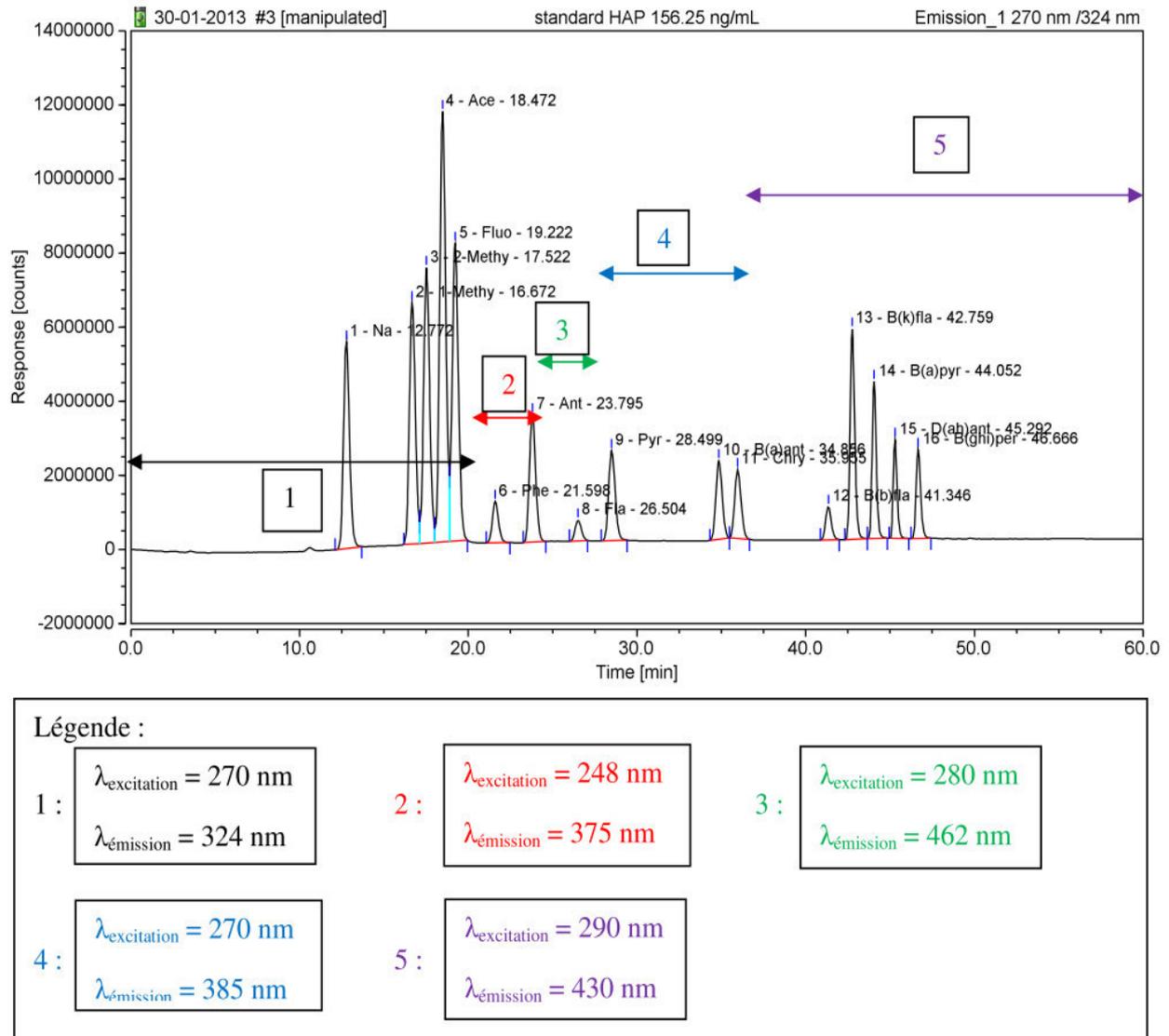
Après conditionnement de la chaîne HPLC nécessaire à l'acquisition des données, les échantillons sont injectés. La méthode utilisée pour analyser les échantillons de sédiments a déjà été mise au point au laboratoire. Les différents paramètres, notamment le gradient d'élution, sont donnés dans le tableau suivant.

Temps (min)	débit (mL/min)	% eau MilliQ	% acétonitrile	Température du four à colonne (°C)
0	0.51	50	50	35
5	0.51	50	50	
36	0.51	20	80	
40	0.51	0	100	
50	0.51	0	100	
60	0.51	50	50	

**Tableau 7** : Gradient d'élution utilisé pour l'analyse des HAP



Il faut ajouter que la température du passeur d'échantillons et celle de la cellule du détecteur sont respectivement de 10°C et 50°C. Les temps de rétention des différents HAP et les couples de longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisés sont indiqués sur la figure 31.



**Figure 31** .Identification des HAP, de leur temps de rétention et couples de longueurs d'onde utilisés

Suite à ces investigations relatives à l'exposition à d'éventuels perturbateurs endocriniens, il convient maintenant d'appréhender l'imprégnation potentielle des organismes vivants ainsi que les effets induits.



## IV- Une imprégnation potentielle des organismes ligériens en PE

### 1. Choix et échantillonnage de l'espèce sentinelle sur la zone d'étude

L'**anguille européenne** (*Anguilla anguilla*) est caractérisée par un cycle catadrome, une place de super prédateur amphihalin thalassotoque et un régime trophique carnassier. Leur mode de vie benthique (contact avec les sédiments), une longue phase de croissance (+20ans) suivie d'une période de reproduction unique (selméparité couplée à un fort dimorphisme sexuel), ainsi qu'une forte teneur en lipides représentent autant de facteurs supplémentaires de risque face à une bioaccumulation de contaminants lipophiles de type PE. C'est en outre aujourd'hui une population menacée à l'échelle du globe.

L'intérêt de ce "modèle" biologique, déjà évoqué plus longuement en partie I, est triple :

- en tant que sentinelle de la qualité du milieu, au travers des études de bioaccumulation et de l'utilisation des biomarqueurs
- en terme de maintien de la biodiversité et de la ressource piscicole (espèces d'intérêt économique)
- en tant que source de contaminants au sein de la chaîne trophique aboutissant à l'Homme.

L'échantillonnage de cette espèce a été réalisé en mai 2009 (individus jaunes et argentés) sur trois sites de l'estuaire (Cordemais, Nantes, Varades; n=27 à 30 /site) ainsi qu'en novembre 2010 (individus argentés dévalants; n=10).

### 2. Paramètres biologiques des organismes échantillonnés

#### 2.1. Biométrie de l'espèce sentinelle par site

La dissection des anguilles a permis le prélèvement de 5 organes (muscle, foie, vésicule biliaire tube digestif, gonades) ainsi que du sang (plasma).





**Photographie 5.** Biométrie d'une anguille (longueur en cm) le long d'une toise en bois.

En raison du prélèvement d'un morceau de foie nécessaire à l'amplification de l'expression génique par q RT PCR, la paillasse est RNase free, le support de dissection réfrigéré par de la glace pillée (maintien à 4°C), et l'ensemble des ustensiles utilisés sont stériles à usage unique.

Les données biométriques récoltées (taille, poids, diamètres des yeux gauche et droit, taille de la nageoire pectorale, poids des différents organes extraits) ont permis de calculer des indices biologiques nécessaires à la caractérisation des individus quant à leur état de santé et leur stade de développement sexuel en utilisant les formules validées par (Durif et al. 2005; Huertas et al. 2006; Beullens et al. 1997a).



**Photographie 6.** Dissection d'une anguille européenne et extraction des organes après biométrie.  
Cliché: I.Blanchet-Letrouvé

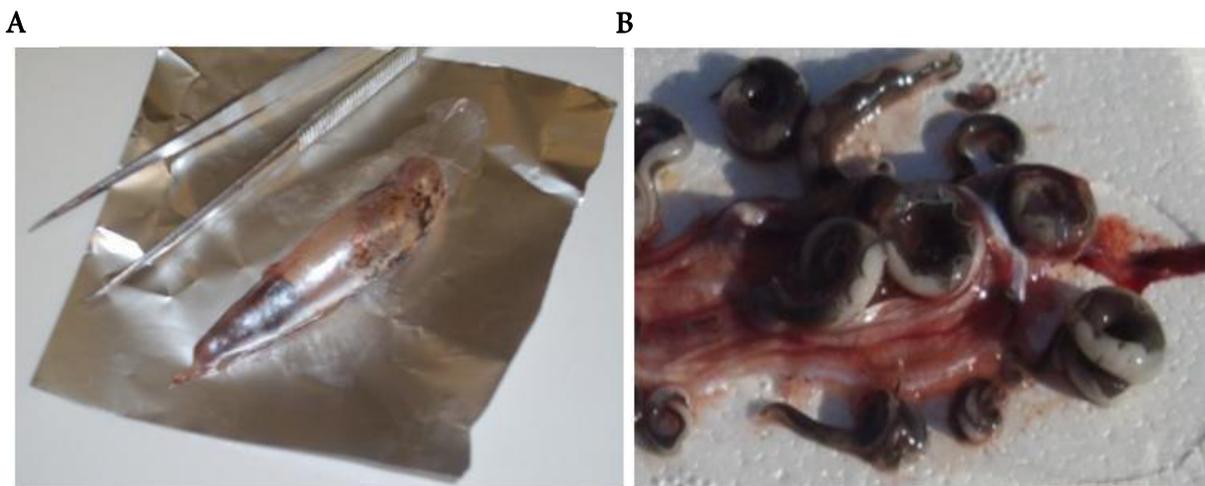


## 2.2. Infestation par le parasite *Anguillicola crassus*

En complément, l'état parasitaire des poissons est vérifié au niveau de la vessie natatoire en recherchant la présence ou non du nématode *Anguillicola crassus* (nombre et poids). Il s'agit d'un parasite exclusif et spécifique des trois espèces d'anguilles, *A. japonoca*, *rostrata* et *anguilla*, introduit en Europe de l'Ouest dans les années 80 et détecté en Camargue par l'équipe de (Dupont and Petter 1988). Il est responsable de l'anguillicolose, qui se traduit par des lésions traumatisantes de la vessie natatoire (réaction de type inflammatoire, nécroses, hémorragies et hypertrophie de la paroi), impliquée directement dans l'osmorégulation (Lefebure et al. 2004). La démarche suivie vise à dénombrer les individus de ce parasite, afin de calculer un indice parasitaire, et comparer ainsi l'état de santé de notre fraction de population avec d'autres peuplements européens.

Cet index complémentera les indices biométriques et sera incorporé dans l'analyse en composante principale de fin d'étude, afin d'observer d'éventuelles corrélations avec la charge en contaminants des organismes, le sexe, ou encore le stade de maturité sexuelle.

Malgré les travaux récents de (Fazio et al. 2009; Fazio et al. 2012), les recherches de terrain sur les effets de ce parasite sont insuffisantes (Elie and Girard 2009).



**Photographie 7.** Vérification de l'état parasitaire de la vessie natatoire; infestation par le nématode *Anguillicola crassus*

**A.** Prélèvement et pesée de la vessie natatoire

**B.** Dénombrement et pesée du parasite *Anguillicola crassus*.



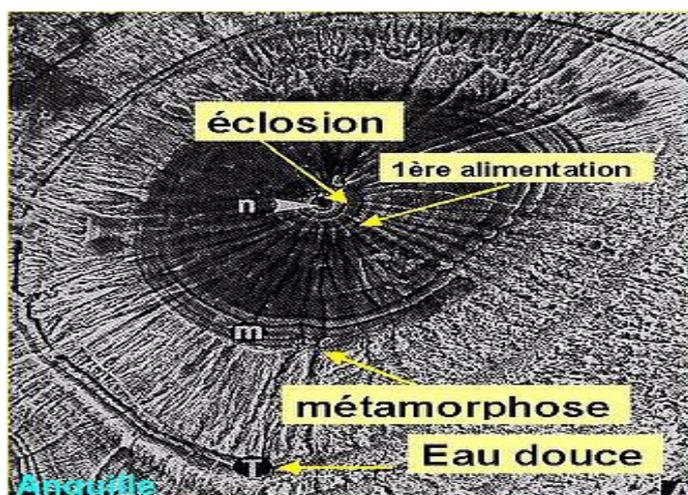
### 2.3. Estimation de l'âge des organismes par otolithométrie

L'extraction des otolithes (Photo 8), la réalisation des préparations gélifiées, le ponçage des préparations d'otolithes et la lecture du marquage coloré, se sont effectués selon la méthodologie proposée par (ICES WKAREA 2009).



**Photographie 8.** Extraction des otolithes depuis la tête d'une anguille. Cliché I. Blanchet-Letrouvé

L'extraction des deux otolithes a permis d'évaluer l'âge des anguilles selon la méthode de l'IRSTEA (Bordeaux) en utilisant 3 lecteurs différents. Une moyenne est effectuée à partir de ces trois lectures. La zone de comptage correspond à l'espace *entre le nucleus* (n, image 5) et la partie externe la plus longue.



**Image 5.** Observation microscopique d'un otolithe d'anguille. Cliché Mouneix, (1981).

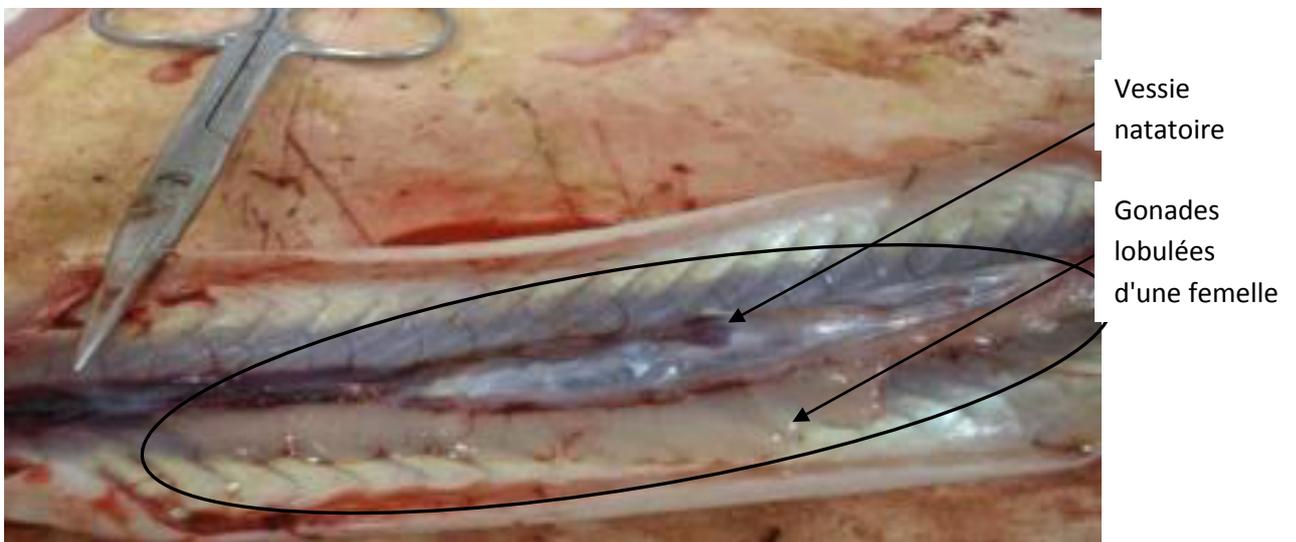


## 2.4. Histologie gonadique

Chez l'anguille, les gonades présentent une structure particulière, suspendue sur la totalité de la longueur de la cavité corporelle (Tesch 2003), avec la gonade gauche plus longue que la droite.

Le stade le plus précoce permettant de distinguer macroscopiquement un mâle d'une femelle correspond à une taille d'anguille d'environ 20 cm (Colombo and Grandi 1996). Cependant une étude microscopique est nécessaire pour confirmer une différenciation définitive, et n'est possible que pour des organismes de taille supérieure à 30 cm (Tesch 2003).

### 2.4.1. Extraction des gonades



**Photographie 9.** Dissection des gonades chez un individu femelle; masse blanchâtre très allongée, accolée au muscle et lobulée. Cliché: I. Blanchet-Letrouvé

L'extraction des gonades est extrêmement délicate de par leur longueur et leur texture très grasse, avec des risques de déchirure important. Cependant, les parties antérieure et postérieure doivent être bien identifiées, car les sections nécessaires à la réalisation des préparations microscopiques seront prélevées à trois endroits spécifiques: en positions antérieure, médiane et postérieure, en raison de la différenciation graduelle des gonades.

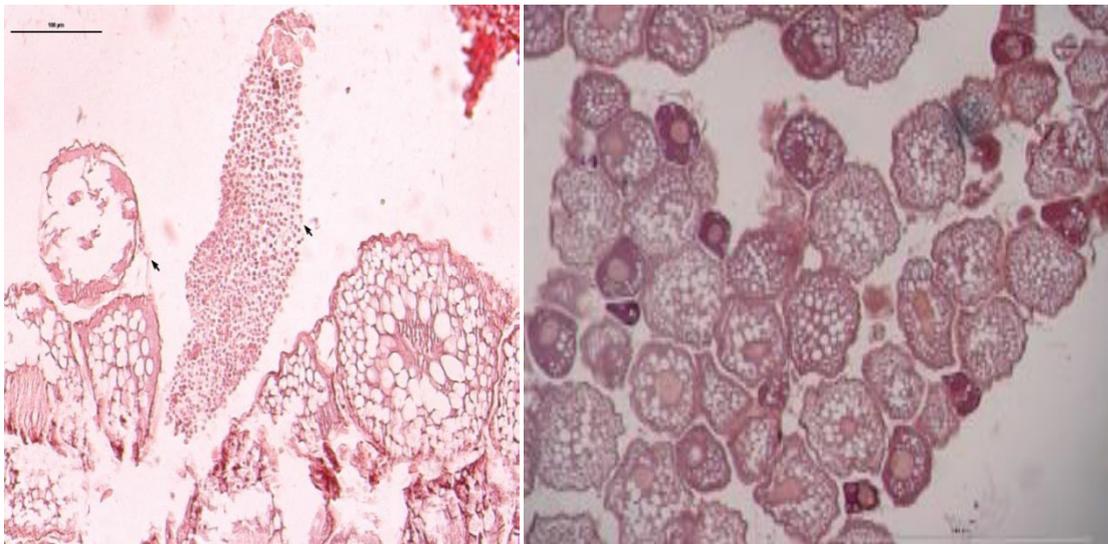


#### *2.4.2. Réalisation et observation des coupes histologiques*

Suite aux trois coupes réalisées en duplicat, et positionnées en histocette dans le liquide de Bouin, les coupes sont déshydratées et incorporées dans la paraffine.

Chaque bloc de paraffine est ensuite coupé au microtome afin de réaliser des tranches de 5 ou 7 microns; chaque organisme est ainsi "représenté" par 6 lames microscopiques, colorées à l'haemalin-éosine grâce à un automate.

Chaque coupe est observée au microscope, photographiée, répertoriée, et permet l'identification du stade de différenciation de l'anguille, son sexe et éventuellement son degré de maturité sexuelle. Les caractéristiques utilisées sont celles décrites dans la littérature (Huertas et al. 2006; Beullens et al. 1997b; Beullens et al. 1997c).



**Photographie 10.** Observation microscopique de coupes histologiques de gonade femelle au microscope optique (oocytes de 100 µ environ). Clichés (I. Blanchet-Letrouvé)



### 3. Les contaminants analysés dans les matrices biologiques .

#### 3.1. Extraction et quantification des PCB et des PCDD/F

L'imprégnation de l'anguille Européenne aux contaminants de type PE a été évaluée à l'aide de dosages chimiques dans différentes matrices (muscles, gonades). Les contaminants recherchés en priorité ont été les polychlorobiphényles (PCB) et les polychlorodibenzodioxines/furanes (PCDD/PCDF). En ce qui concerne ces études, la partie analytique a été menée en partenariat avec le LABERCA-ONIRIS, Nantes. Le protocole suivi pour la préparation des échantillons, l'extraction et la quantification des PCB dans les muscles et les gonades, ainsi que la quantification des PCDD/F dans les muscles sont détaillés dans les publications présentées dans ce travail.

Brièvement, les échantillons d'anguilles (muscles ou gonades) et les pools de civelles ont été homogénéisés, pesés et lyophilisés. Cinq grammes (poids sec) de prise d'essai ont été broyés à l'aide d'un mixeur équipé d'un bol de verre. Les échantillons ont ensuite été transférés dans des cellules d'ASE 300 (cellule de 22 mL) afin d'être extraits . Avant extraction, 18 congénères marqués au  $^{13}\text{C}$  ont été ajoutés aux échantillons (étalons internes). La pression et la température de l'ASE ont été réglés à 100 bars et 120 ° C respectivement. Le solvant d'extraction est un mélange de toluène / acétone 70:30 (v / v), et trois cycles d'extraction successives (5 min chacun) ont été effectués. Chaque extrait est ensuite évaporé à sec au rotavapor (40 ° C), permettant la détermination gravimétrique de la teneur en matière grasse (estimation du poids de lipide par échantillon exprimé en% du poids humide). Les extraits ont été dissouts dans 25 ml d'hexane avant purification. Trois étapes de purification ont ensuite été réalisées, utilisant des colonnes de silice acidifiée, de Florisil® et de célite / charbon actif. Après élimination de la graisse sur la première colonne de silice activée avec de l'acide sulfurique, les PCB ont été séparés des PCDD / PCDF sur la colonne de Florisil®. La fraction PCDD / F est ensuite purifié sur une colonne de Carbopack C / célite 545. La séparation des PCB coplanaires (non-ortho) et des PCB non coplanaires a été effectuée sur une phase stationnaire composée d'un mélange de Florisil®/ Carbopack C / Celite 545 (une nuit à 130 ° C). Après l'ajout d'étalons externes permettant le calcul des rendements de récupération ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB # 111 pour les PCB, et  $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4-TCDD pour les PCDD/F), les extraits ont été évaporés sous un courant d'azote sec et reconstitué dans 20 µL, 50 µL et 10 µL de toluène pour les PCB coplanaires, PCB non coplanaires et PCDD/F, respectivement.



L'identification et la quantification des PCB et des PCDD/F ont été réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (GC-HRMS) à l'aide d'un chromatographe en phase gazeuse 7890A (Agilent) couplé à un 700D JMS ou un JMS 800D spectromètre de masse haute résolution à secteur magnétique (Jeol, Tokyo, Japon). Une colonne capillaire DB5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (J & W) a été utilisée en mode d'injection splitless. La programmation de température du four était de: (i) pour les PCB, 120 ° C (3 min), 20 ° C / min jusqu'à 170 ° C (0 min), 3 ° C / min à 245 ° C (0 min), et enfin 20 ° C / min jusqu'à 275 ° C (7 minutes), (ii) pour les PCDD/F, 120 ° C (3 min), 20 ° C / min jusqu'à 170 ° C (0 min), 3 ° C / min jusqu'à 260 ° C (0 min), et enfin 25 ° C / min jusqu'à 300 ° C (5 min). L'ionisation a été effectuée par ionisation électronique (42 eV). La résolution spectrométrique a été fixée à 10 000 et l'acquisition du signal a été réalisé en mode SIM (Single Ion Monitoring) en se concentrant sur les deux ions les plus abondants de chaque massif isotopique (<sup>35</sup>Cl et <sup>37</sup>Cl). Les signaux ont été intégrés par le logiciel JEOL Diok (v.4).

#### 4. Des biomarqueurs d'effets de perturbation endocrine

Les atteintes éventuelles à la fonction de reproduction ont été étudiées chez l'anguille européenne à l'aide d'indices biométriques et d'études histologiques des gonades permettant de caractériser les différents stades de maturité sexuelle; couplés à la quantification de l'expression de biomarqueurs hépatiques spécifiques de la reproduction (vitellogénine et aromatasase pour l'anguille). La vitellogénine (Vg) est une protéine précurseur de la synthèse du vitellus (réserve énergétique utilisée au cours du développement embryonnaire chez les organismes ovipares). Elle est de ce fait fortement impliquée dans la reproduction et directement induite par des hormones sexuelles, elles-mêmes régulées par l'axe hypothalamo- hypophysaire (système nerveux central). La présence de Vg plasmatique chez les mâles et les femelles immatures est le signe d'une perturbation (Peter Matthiessen et al. 2002; Peter Matthiessen and Ian Johnson 2007; Matthiessen 2007). L'aromatase est, quant à elle, une enzyme impliquée dans la transformation des androgènes en oestrogènes lors de la différenciation et de la maturation sexuelle. Ces deux protéines fonctionnent *via* des récepteurs nucléaires ou membranaires spécifiques (ER et AhR respectivement), présents tant au niveau des cellules hépatiques, qu'au niveau des gonades ou du cerveau. Ces récepteurs interagissent aussi avec des molécules homologues de type PE, qui viennent prendre la place des molécules endogènes (naturelles) sur ces sites, d'où une synergie ou



une inhibition de leur fonctionnement (van der Oost et al. 2003; van der Oost et al. 1996a; van der Oost et al. 1996c).

#### 4.1. Une lipoprotéine de la maturité sexuelle femelle : la vitellogénine (Vg)

De nombreuses études ont montré que la Vg était très faiblement exprimée chez l'anguille, rendant ce biomarqueur peu pertinent chez cette espèce pour évaluer les perturbations endocrines, et plus particulièrement les anguilles jaunes (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal 1991). Dans ce contexte, nous avons envisagé la quantification de l'expression génique de la Vg hépatique par qRT PCR, méthode plus sensible que les méthodes immunologiques classiquement utilisées (ELISA, RIA) (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal 1991; Peyon et al. 1998; Peyon et al. 1993). Cette méthode de quantification a été, dans un premier temps, validée par une expérimentation *in vivo* sur des mâles argentés exposés à des composés oestrogéniques (estradiol) et androgéniques (testostérone et 11-cétotestostérone).

Cette méthode de quantification de l'expression génique de la Vg a alors été appliquée aux individus prélevés *in situ* sur Varades et Nantes en mai 2009 et aux individus dévalants collectés en novembre 2010. La limite de détection (LD) de l'expression des ARNm de la vitellogénine (Vg) a été établie à 0.4 UA (unité arbitraire) en fonction du stade de maturité sexuelle (analyse histologique) et de certaines caractéristiques de l'argenture (IGS: Indice Gonado-somatique, IO: Indice oculaire).

#### 4.2. Une enzyme nécessaire à la synthèse d'oestrogènes en androgènes: l'aromatase

L'aromatase est une enzyme permettant de transformer les androgènes en oestrogènes. L'induction du gène de l'aromatase pourrait être un biomarqueur pertinent de perturbation endocrine. Ainsi, (Cheshenko et al. 2008) ont réalisé une revue de la variété de mécanismes pouvant affecter l'expression ou l'activité des gènes de l'aromatase et par conséquent, les conséquences probables sur la reproduction des Poissons Téléostéens.

Cependant, l'expression de ce cytochrome est le plus souvent quantifiée dans le cerveau. Nous avons cherché à mesurer cette expression dans les cellules hépatiques, lieu de synthèse de la vitellogénine, bien que celle-ci y soit faiblement induite.

Les hépatocytes permettent en outre de réaliser des cultures et de tester ainsi des molécules potentiellement perturbatrices en screening.



### 4.3. Un outil performant et hautement sensible ( qRT PCR)

Il s'agit d'une méthode d'amplification génique *in vitro* permettant de copier en très grand nombre une séquence d'ARN (ou d'ADN), à partir d'une quantité d'acides nucléiques faible (de l'ordre du picogramme) correspondant à des amorces spécifiques d'oligonucléotides de synthèse (environ 20 à 25 nucléotides ou amplicon).

#### 4.3.1. Principe général de la PCR quantitative en temps réel : q RT PCR

Cette technique utilise les propriétés d'hybridation et de déshybridation des brins complémentaires de l'ADN en fonction de la température, ainsi que les potentialités d'initiation et de synthèse de l'ADN polymérase provenant d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*: Taq pol).

Le contrôle de l'activité enzymatique de cette Taq est assuré par des séquences à températures variables grâce à l'utilisation d'un thermocycleur, moins contraignant qu'une succession de bain-marie, et surtout plus reproductible, permettant d'ajuster le nombre de cycles nécessaire au bon déroulement de la réaction (d'où la réaction en chaîne).

La PCR en temps réel permet de s'affranchir d'étapes expérimentales contraignantes sources de contamination et rend la méthode quantitative. Le gène de référence utilisé est l'actine. Cette phase expérimentale a été réalisée en collaboration avec le MNHM, Paris (sous la direction de Sylvie Dufour et l'aide technique de Sylvie Baloché). Un seul gène de référence a été utilisé en raison d'études précédentes ayant validé ce choix (Pierron et al. 2009; Aroua et al. 2007). Toutes les étapes sont réalisées suivant le protocole de ces auteurs.

#### 4.3.2. Préparation des échantillons

L'expérimentation se réalise en conditions RNase free. Après anesthésie des anguilles à l'Eugénol, un morceau de foie est prélevé (environ 50 milligrammes), et placé immédiatement dans un tube Eppendorff autoclavé contenant une solution d'ARN later, puis congelé à -20°C ; les poissons sont ensuite sacrifiés pour d'autres prélèvements.



### 4.3.3. Extraction des ARN totaux de tissus hépatiques d'anguilles

L'extraction des ARN totaux se réalise selon la technique au Trizol (phénol + isocyanate de guanidine).

#### Protocole expérimental.

##### Broyage du tissu hépatique

1. Passer une lingette Ambion (antiRNAses) sur la tige du broyeur (Ultra Turrax), le portoir et les pinces de dissection. Rincer la tige avec un aliquot d'H<sub>2</sub>O stérile pour culture. Passer la paillasse à la soude 0.1N.
2. Numéroter les Eppendorf de 1.5 ml ou 2 ml RNA/DNA free (ou autoclavés) et manipuler sous la hotte aspirante.
3. Mettre 0.5 ml de Trizol (rose) dans un tube compatible avec le broyage.
4. Ajouter le morceau de foie (ou d'ovaire) en évitant de transférer du RNA later et broyer à l'ULTRATURRAX ; verser immédiatement dans le tube correspondant et boucher en raison des odeurs et de la toxicité. (prendre la pipette réservée aux phénols). Rincer la tige dans 3 solutions de Trizol pour nettoyer le broyeur entre chaque échantillon.
5. Ranger le broyeur et laisser 5' à température ambiante.
6. Ajouter 100 µl de chloroforme sous la hotte, mélanger 15" à la main, puis laisser 5' à température ambiante.
7. Centrifuger 20' à 14000 G à 4°C.
8. Récupérer la phase aqueuse (200-300 µl) dans des tubes de 1,5 ml (à numéroter) à l'aide de cônes de 100 µl ;
9. Ajouter 100 µl d'ISOPROPANOL froid (-20°C) puis Vortexer.
10. Laisser précipiter 2H à 20°C ou 1H à 80°C (penser à décongeler le tampon Buffer X10 et le RNA storage)
11. Centrifuger 17', à 14000G, 4°C
12. Jeter le surnageant au moyen de cônes de 200 µl, puis de 20 µl, puis, effectuer un lavage avec 500 µl d'ETHANOL 75% froid (à -20°C).
13. Centrifuger 10', à 10000G, 4°C
14. Enlever l'éthanol, et centrifuger à nouveau pour enlever les dernières gouttes d'éthanol, puis laisser sécher le culot à l'air libre, à l'abri de la poussière, - de 30'.
15. Ajouter 50 µL de RNA storage solution (Ambion), tapoter les tubes, puis 5 µL de buffer 10X, centrifuger à la paillasse, puis transvaser dans des tubes de 200 µl numérotés et datés. Ajouter au final, 1 µl de DNase Roche. Placer les tubes dans le thermocycleur et utiliser le programme 3, n°8-RNA extra= 45 mn à 37°C pour l'action de la DNase, puis laisser 10 mn à 75°C pour inactiver l'enzyme, enfin, mettre sur glace.
16. Utiliser le NANODROP pour la lecture de la densité optique (DO) des ARN
17. Stockage des ARN totaux de tissus hépatiques d'anguilles à -80°C.

##### Obtention d'ADNc par transcriptase inverse :

L'ADN complémentaire (ADNc) est en fait plus stable que l'ARN, il offre donc plus de liberté pour les analyses. Les échantillons d'ARN sont donc soumis à une rétrotranscription afin d'obtenir des ADNc sur lesquels seront effectués la quantification de l'expression des gènes d'intérêt (actine comme standard, vitellogénine et aromatase). La paillasse étant rincée à la soude 0.4N, les ARN



totaux sont décongelés et la reverse transcription peut alors s'effectuer grâce au kit "*in vitro*gen, SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l)". Les solutions de MIX sont préparées en fonction de la quantité nécessaire de telle sorte que pour X  $\mu$ l de dNTP, il y ait 2xX  $\mu$ l de random primers et 8xX  $\mu$ l d'eau Roche. 10  $\mu$ l de ce MIX sont distribués dans chacun des tubes auxquels sont ajoutés 3  $\mu$ l d'ARN.

Le mélange est placé pendant 10 minutes à 65°C dans le thermocycleur Biometra, puis laisser à 35°C pour permettre la fixation des amorces de nucléotides sur les ARN cibles.

Un second MIX est préparé avec X  $\mu$ l de DTT, 4xX  $\mu$ l first strand Buffer et en dernier lieu, X  $\mu$ l RNase out et X  $\mu$ l SuperScript III RT ; 7  $\mu$ l de ce MIX sont distribués dans chaque tube et mis à incuber 10 mn à 10°C, puis 60 mn à 50°C, et finalement 15 mn à 70°C afin d'inactiver la réaction.

Une mesure de densité optique (DO) des ADN simple brin est ensuite réalisée sur Nanodrop afin de réaliser un pool de l'ensemble des échantillons nécessaires à la réalisation de courbes standard (dilutions au 1/2, 1/6, 1/18, 1/54, 1/162, 1/486, 1/1458), et définir en parallèle, la meilleure dilution à effectuer lors des manipulations ultérieures, et ce, avant de les congeler à -20°C.

#### ***4.3.4. Détection et quantification des produits amplifiés au cours de la réaction de polymérisation***

La programmation de la qPCR se réalise grâce à un logiciel performant, le Tm calculator. Outil :LightCycler 1.5.Roche.

L'expérimentation nécessite en outre un gène de référence ou standard interne, (ici l'actine  $\beta$ ), s'exprimant tout le temps et de la même manière quelque soit le tissu considéré. Cela permet de quantifier la variation d'expression d'ARN dans un échantillon par rapport à un autre, et de façon relative par rapport à un gène de référence (les mesures sont ainsi normalisées dans la mesure où l'expression du standard interne ne doit pas varier).

(R normalisé = R gène cible/R gène référence).

Cette partie fait référence aux travaux de (Pierron et al. 2009; Aroua et al. 2007)

Dans un capillaire en verre (LightCycler Capillaries(20  $\mu$ l).Roche), on dépose 6  $\mu$ l de Mix (SYBR + Polymérase) + 4  $\mu$ l de standard ou d'échantillon



Le MIX Vitellogénine ( ou Aromatase) est préparé comme suit :

2 x X  $\mu$ l d'eau cellulaire ou eau Roche

1 x X  $\mu$ l arom 5' (ou Vg)

1 x X  $\mu$ l arom 3' (ou Vg)

2 x X  $\mu$ l de SYBRGreen.

32 capillaires sont préparés dans des puits, bouchonnés délicatement puis centrifugés avant d'être intégrés dans le lightCycler.

Les dilutions et échantillons sont enregistrés sur ordinateur et le run peut être lancé, chaque run comportant 14 échantillons en duplicat, une dilution de référence et un blanc.

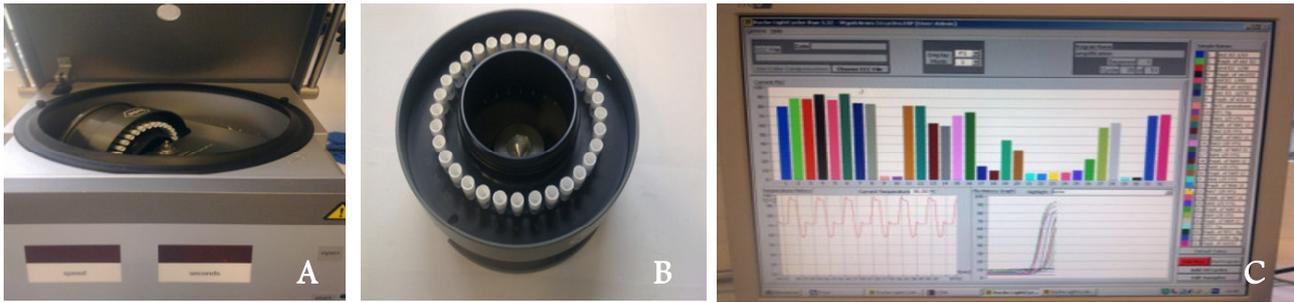
3 phases alternent:

- Phase de dénaturation de l'ADN
- Phase d'hybridation (= appariement des amorces)
- Phase d'élongation ou d'amplification

: A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN, copie de la séquence cible, est mesurée grâce à un marqueur fluorescent ; il s'agit d'un intercalant (LightCycler FastStart DNA Master<sup>plus</sup> SYBR-Green I.Roche) composé d'une molécule Reporter et d'un Quencher que la Taq déplace, puis coupe, d'où l'émission de fluorescence qui sera mesurée.

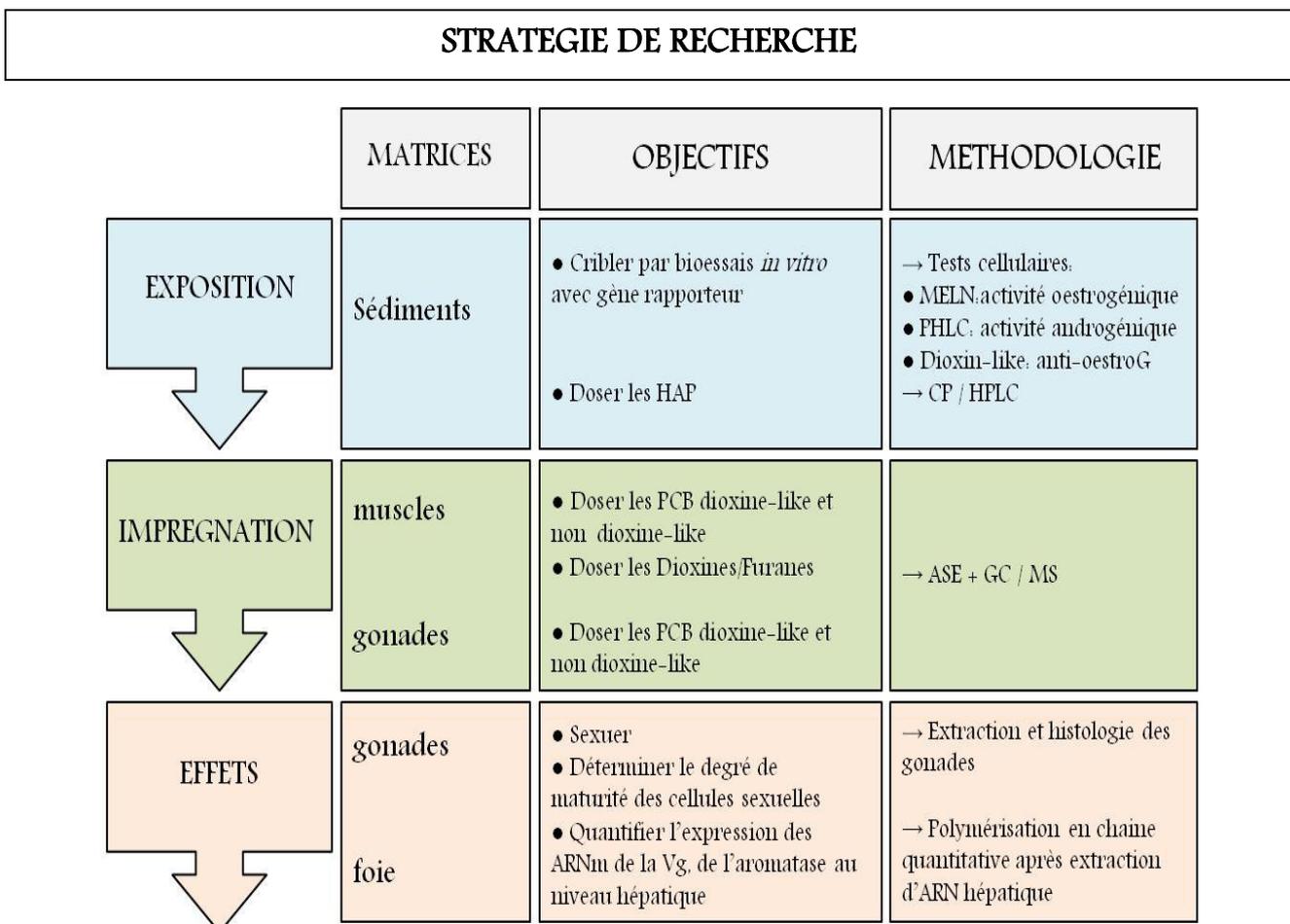
La PCR en temps réel consiste donc à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle grâce à un marqueur fluorescent.





**Photographie 11.** Matériel utilisé pour la q RT PCR. A: Thermocycler Biométra, dans lequel est inséré le portoir circulaire (B) contenant l'ensemble des capillaires en verre où les dilutions ont été déposées. C: suivi informatique instantané de l'évolution du run au cours des 40 cycles de polymérisation, pour l'ensemble des échantillons en duplicat. (Museum National d'Histoires Naturelles, Paris); Clichés: I.Blanchet-Letrouvé.

## Pour conclure



## *PARTIE 3*

# *Des sédiments potentiellement contaminés par des Perturbateurs Endocriniens*



## I-INTRODUCTION

Le travail de terrain a donc permis de repérer des sites accessibles, et la collecte de sédiments a été réalisée à proximité des STEU d'intérêt. Les sédiments étant des concentrateurs reconnus de la majorité des contaminants, ils sont utilisés comme "mémoire" de la charge polluante des eaux.

Afin de caractériser l'exposition des sédiments échantillonnés à d'éventuels PE, des tests *in vitro* (lignées cellulaires) basés sur l'expression de gènes cibles (gène rapporteur) dont l'expression est modulée par différents types de polluants PE, ont été mis en oeuvre. On cherche ainsi à quantifier des activités cellulaires correspondant à des réponses de type oestrogéniques, (anti)androgéniques et dioxin-like dans les extraits de sédiments estuariens. En effet, les tests sur lignées cellulaires reposent sur la capacité d'un composé à se lier à un récepteur spécifique, et à activer une réponse du gène rapporteur associé à ce récepteur. Les différents récepteurs concernés par cette étude sont:

- les récepteurs de oestrogènes (ER $\alpha$  et  $\beta$ )
- les récepteurs des androgènes (AR)
- les récepteurs de la dioxine (AhR: aryl-hydrocarbène).

Ce sont les voies les plus classiques de la perturbation endocrinienne. Les activités induites par les extraits sédimentaires, sont comparées à celles de témoins positifs connus (Figure 33) :

- le 17 $\beta$  oestradiol (E<sub>2</sub>) pour la mesure de l'activité oestrogénique
- la flutamide (Fluta) pour la mesure de l'activité anti-androgénique
- le benzo[a]pyrène (BaP) pour la mesure de l'activité HAP-like
- le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) pour la mesure de l'activité dioxine-like.

Activités mesurées	Bioessais <i>in vitro</i> avec gène rapporteur (Sanchez et Aït-Aïssa, 2010)	Polluants type détectés
Oestrogénique	- cellules MELN: (ER /luciférase) ( étalons: E2)	Hormones, pesticides,HAPs,Alkylphénols, Bisphénol A,...
Androgénique	- Cellules MDA (AR/Luciférase) - Cellules PHLC- 1/ FLUTAMIDE	Hormones, pesticides,Alkylphénols
Dioxine-like (activité anti-oestrogénique)	AhR/EROD(BaP, TCDD.)	HAPs, Dioxines, Furanes,pesticides, Alkylphénols, autres,...

**Figure 32:** Méthodologie des tests cellulaires réalisés sur les différents extraits sédimentaires.



Un comparatif avec des analyses chimiques ciblées est ensuite réalisé, afin de déterminer la contribution de polluants prioritaires dans les activités toxiques détectées.

Cette démarche bio-analytique nécessite de caractériser la composition granulométrique et organique des sédiments.

## II. Sédiments estuariens et résultats physico-chimiques

### 1. Granulométrie des échantillons

Selon leur granulométrie, les sédiments n'adsorbent pas les contaminants de la même façon. Les particules grossières de sable sont principalement présentes sur la plage de St nazaire, ainsi qu'au niveau de Oudon et d'Ancenis, lorsque la remontée de la marée dynamique est moins marquée; ces sites correspondent aux deux extrémités de l'estuaire, et présentent très peu de dépôt fins (figure 34).

Au contraire, les autres sites sont marqués par la présence de particules fines, majoritairement comprises entre 2 et 50  $\mu\text{m}$ , correspondant à l'estuaire interne, où évolue le bouchon vaseux. Celui-ci est un piège à contaminants et à bactéries, en mouvements lents mais permanents au cours des saisons et au grès des marées (GIP 2009; GIP Loire estuaire 2014).

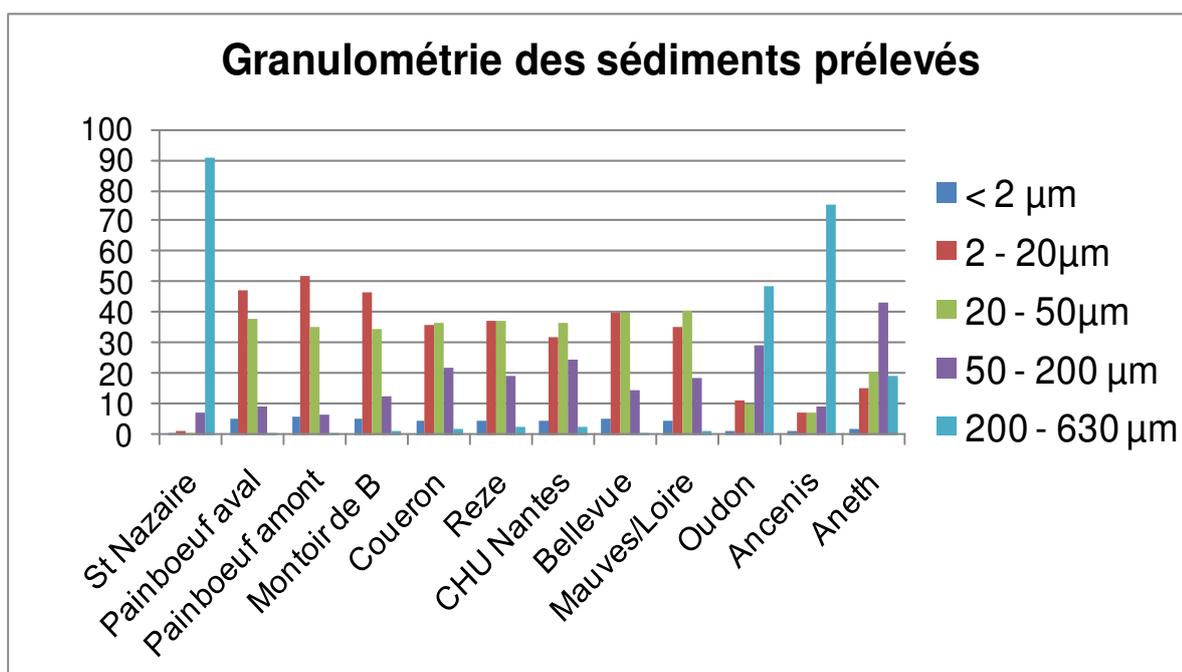
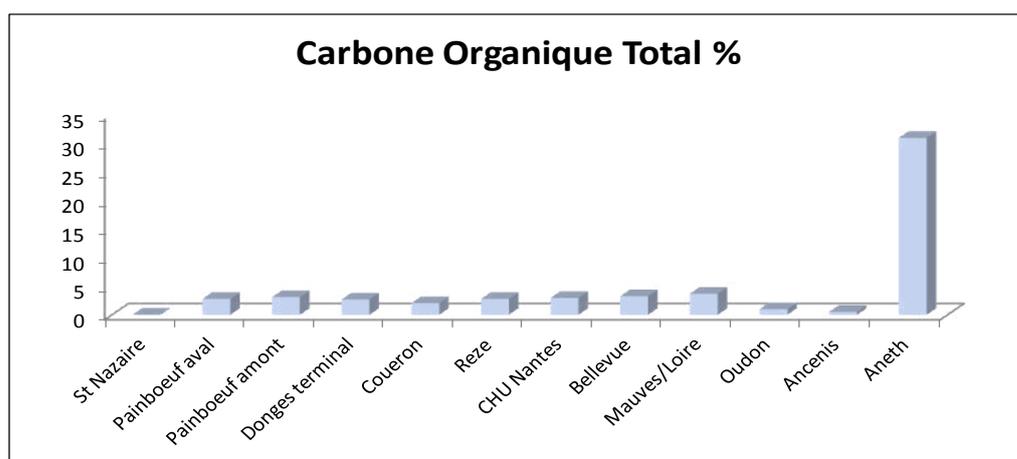


Figure 33. Granulométrie des sédiments prélevés au niveau des 12 sites échantillonnés ( Estuaire de Loire)



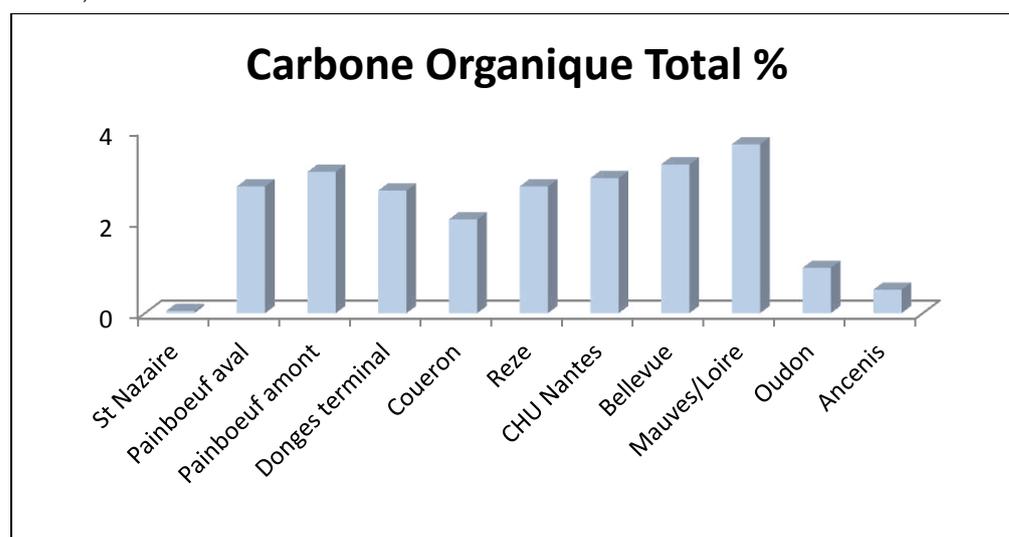
## 2. Composition en carbone organique total (COT)

Les sédiments possédant donc une charge plus ou moins conséquente en vase et en matières organiques, il convient de calculer la concentration en carbone organique total des extraits sédimentaires, afin de normaliser les résultats relatifs à la contamination des sédiments en polluants. Ainsi, la figure 35 permet de souligner la concentration quasiment 10 fois plus importante du COT du point de prélèvement N°12, correspondant au témoin supposé positif quant à sa potentielle réponse oestrogénique.



**Figure 34.** Pourcentage en Carbone Organique Total (COT) des sédiments prélevés au niveau des 12 sites échantillonnés

La figure 36, sur laquelle le point 12 a été volontairement enlevé, permet d'observer plus finement la charge en matière organique des sédiments de l'estuaire, de l'aval (St Nazaire à gauche) vers l'amont (Ancenis, à droite).



**Figure 35.** Pourcentage en COT des sédiments prélevés sur les 11 sites échantillonnés (absence du site témoin positif)



Au niveau de l'embouchure de l'estuaire, l'influence des marées apparaît nettement, la charge en matière organique étant très faible malgré les apports de matière organique en provenance du continent. A cela s'ajoute la configuration du site de prélèvement et le dénivelé de la plage, favorable à un lessivage conséquent des sables qui ne retiennent pas ces matières organiques, déposées plus au large. Un profil un peu identique se retrouve au niveau de Oudon et d'Ancenis, où les sables alluvionnaires dominent et ne retiennent pas les matières organiques. De plus, la turbidité des eaux est moins conséquente, les prélèvements ayant été réalisés en dehors des périodes de crues automnales. Au niveau de l'estuaire interne, on retrouve la masse de matières organiques liées aux lessivages des terres continentales et aux apports de matières organiques par les effluents divers.

L'intégration des COT dans les résultats correspondant aux activités des extraits sédimentaires, entraînent globalement des réponses plus marquées, sauf pour le site d'Anetz, (activité en baisse), dont le prélèvement a été réalisé dans le ruisseau de la Boire Torse (à l'état de boue à cette période de l'année), et qui collecte l'effluent de la STEU d'Anetz, pour l'emmener vers la Loire.

### **III- Sédiments et contamination potentielle à des perturbateurs endocriniens**

En ce qui concerne les résultats des tests d'activités cellulaires, les réponses obtenues sont positives sur les 12 sites échantillonnés même si les valeurs restent faibles par rapport à d'autres estuaires (ex.: Seine) (Sanchez et al., 2008). Elles mettent en évidence la présence, dans les sédiments de Loire, de substances qui miment les hormones sexuelles naturelles comme les œstrogènes, et montrent qu'il existe une activité toxique potentielle des sédiments pour les organismes aquatiques y étant directement exposés.

Sur les figures 37 et 38, les extraits sédimentaires ont été classés d'aval en amont afin de rechercher un éventuel effet de dilution le long de l'estuaire de la Loire.

#### **D'aval en amont.**

➤ **St Nazaire.** aucune activité n'est détectée, probablement en raison d'une forte granulométrie et de l'ouverture du site de prélèvement sur le large (Plage du grand Trait possédant un fort dénivelé), soumis aux marées, aux vents et à un hydrodynamisme de type battu, beaucoup plus conséquent que sur les autres sites.

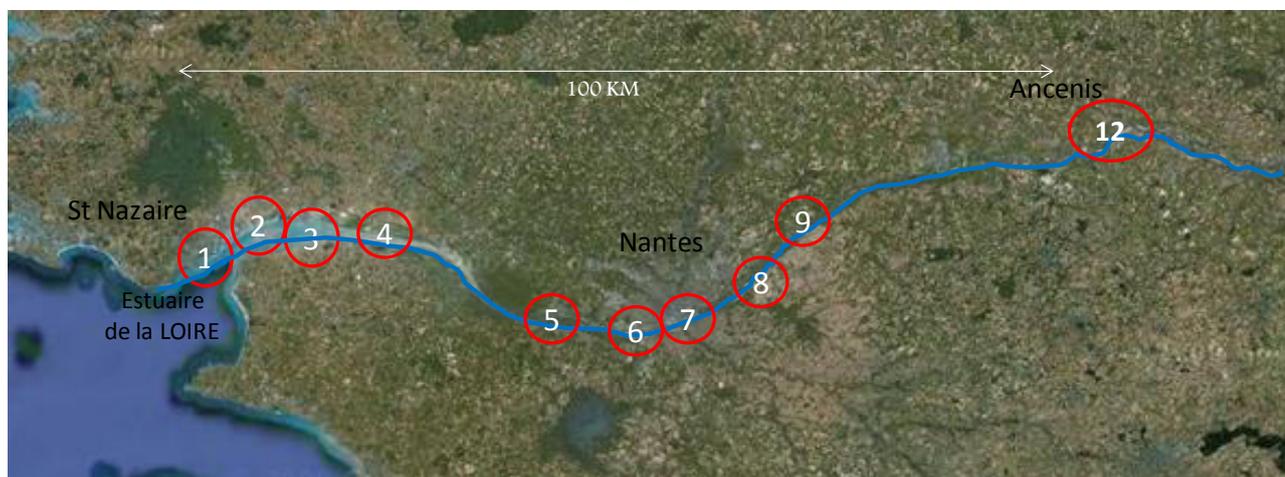
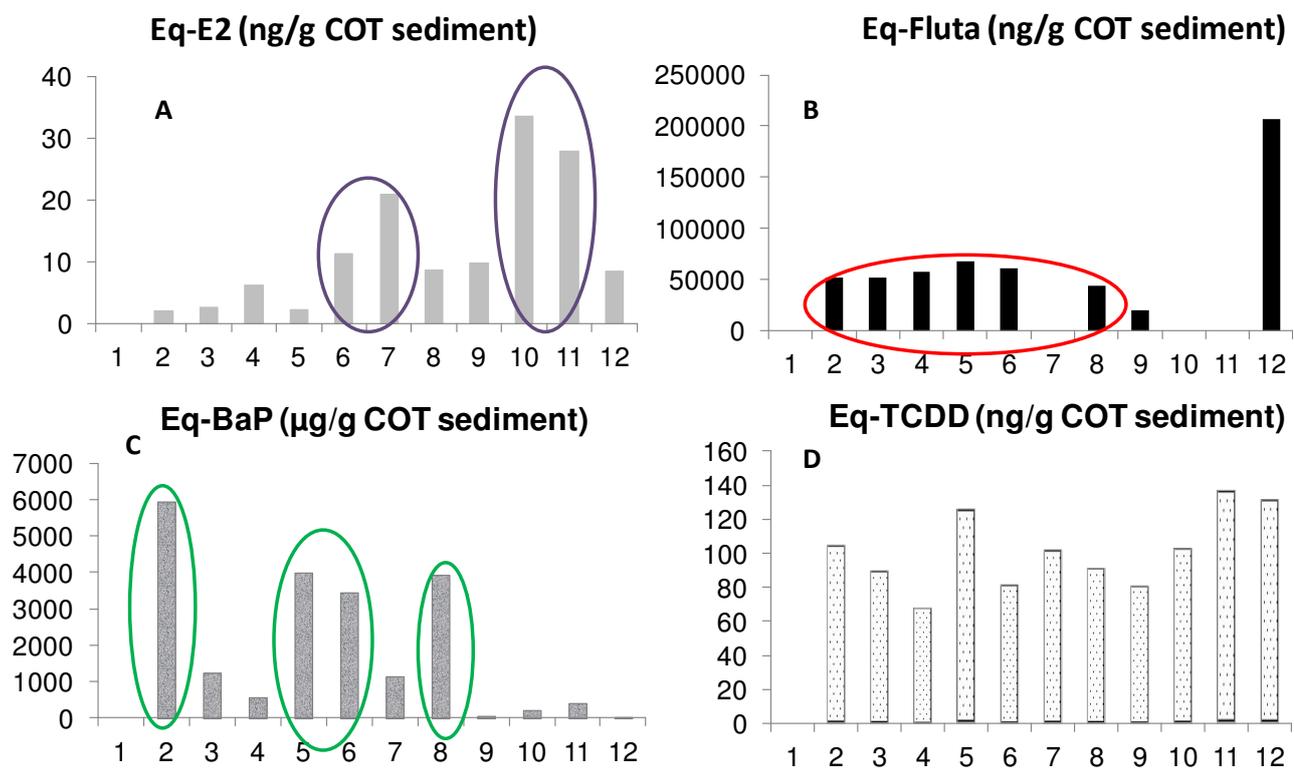


- **Paimboeuf aval.** (en face de Donges–Montoir de Bretagne, zone industrialo–portuaire), une faible activité oestrogénique, une **activité anti–androgénique de 50 µg/g COT**, des activités dioxine et HAP–like parmi les plus conséquentes (**6000 µg Eq –BaP / g de COT**, environ **100 Eq–TCDD en ng/g COT de sédiment** respectivement).
- **Paimboeuf amont.** une activité oestrogénique d'environ **3ng Eq –E2 / g COT sdt**, activité anti–androgénique équivalente à l'aval, activité dioxine–like d'environ **90 Eq–TCDD en ng/g COT de sdt** et une activité HAP–like peu importante par rapport aux autres sites (env **1000 µg Eq –BaP / g de COT**).
- **Donges.** activité oestrogénique d'environ **6 Eq–E2 en ng/g COT sdt**, activité anti–androgénique équivalente aux sites précédents, une activité dioxine–like inférieure aux sites précédents (env . **65 ng Eq–TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP–like parmi les plus faibles (**500 µg Eq–BaP / g COT sdt**).
- **Couéron.** activité oestrogénique d'environ **3 Eq–E2 en ng/g COT sédiment**, activité anti–androgénique plus conséquente que les sites précédents, une activité dioxine–like supérieure aux sites précédents (env . **125 ng Eq–TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP–like parmi les plus fortes (**4000 µg Eq–BaP / g COT sédiment**).
- **Rezé.** (zone intermédiaire de l'estuaire), activité oestrogénique d'environ **11 Eq–E2 en ng/g COT sédiment**, soit 2 à 4 fois plus conséquente que les valeurs observées en aval, activité anti–androgénique identiques aux sites précédents, une activité dioxine–like supérieure aux sites précédents (**80 ng Eq–TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP–like parmi les 4 plus fortes (**3500 µg Eq–BaP / g COT sédiment**).
- **Nantes (CHU).** activité oestrogénique d'environ **21 Eq–E2 en ng/g COT sédiment**, activité anti–androgénique non recherchée, une activité dioxine–like parmi les 6 plus élevées (env. **100 ng Eq–TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP–like la moins élevée des sites intermédiaires (**1000 µg Eq–BaP / g COT sédiment**).
- **Bellevue.** activité oestrogénique d'environ **8 Eq–E2 en ng/g COT sédiment**, activité anti–androgénique conséquente, une activité dioxine–like conséquente (env. **90 ng Eq–TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP–like parmi les 3 plus fortes (**4000 µg Eq–BaP / g COT sédiment**).
- **Mauves sur Loire** (secteur de prélèvement d'eau de Loire pour potabilisation), activité oestrogénique d'environ **10 Eq–E2 en ng/g COT sédiment**, activité anti–androgénique la plus faible, une activité dioxine–like équivalente au site de Rezé (env. **80 ng Eq–TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP–like parmi les plus faibles (env. **100µg Eq–BaP / g COT sédiment**).



- Oudon, activité oestrogénique la plus conséquente en amont et sur l'ensemble du secteur d'environ **33 Eq-E2 en ng/g COT sédiment**, activité anti-androgénique non détectable, une activité dioxine-like conséquente (env. **100 ng Eq-TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP-like parmi les plus faibles du secteur d'étude (**200 µg Eq-BaP / g COT sédiment**).
- Ancenis, activité oestrogénique d'environ **28 Eq-E2 en ng/g COT sédiment**, activité anti-androgénique plus conséquente que les sites précédents, une activité dioxine-like supérieure aux sites précédents (env. **140 ng Eq-TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP-like parmi les plus faibles (**400 µg Eq-BaP / g COT sédiment**).
- Anetz, activité oestrogénique d'environ **8 Eq-E2 en ng/g COT sédiment**, activité anti-androgénique 4 fois supérieure aux sites précédents, une activité dioxine-like parmi les deux plus conséquente (env. **130 ng Eq-TCDD en ng/g COT sédiment**) et une activité HAP-like parmi les plus faibles (**100 µg Eq-BaP / g COT sédiment**).





**Figure 36.** Activités cellulaires des sédiments.

Les points 1 à 12 correspondent respectivement aux sites de prélèvement présentés en Tableau 3.



## 1. Une activité oestrogénique

Tous les sites présentent une activité oestrogénique (figure 36 A) (hormis St Nazaire) variant de **1.97 ng/g COT de sédiment à 28.0** (Ancenis). Ainsi, les sites de Oudon et Ancenis (sites rurbains en partie amont de l'estuaire), présentent les plus fortes activités oestrogéniques et le site de Rezé présente une activité plus conséquente que Mauves sur Loire. Les analyses chimiques des extraits sédimentaires devraient nous apporter les éléments nécessaires à une analyse plus pointue.

## 2. Une activité anti-androgénique

L'activité anti-androgénique (figure 36 B) est présente au niveau de 8 sites parmi les 12 échantillonnés, avec une moyenne de **50000 Eq-Fluta en ng/g COT de sédiment**, en dehors du site témoin positif d'Anetz.

Deux lots s'individualisent entre une zone aval et une zone amont, peut-être lié à un facteur hydrodynamique marqué par la présence du « bouchon vaseux ». Une approche plus globale de l'ensemble des paramètres estuariens ainsi qu'une recherche de contaminants dans les sédiments du bouchon vaseux pourra peut-être nous apporter des renseignements supplémentaires et/ou confirmer notre hypothèse du rôle de piège à contaminants du bouchon vaseux qui se déplace entre le flot et le jusant et en fonction de l'intensité des marées.

Les sédiments provenant d'Anetz étaient très chargés en matière organique et l'extrait correspondant extrêmement dense. Il s'est aussi révélé être le plus actif (activité en moyenne 2000 fois supérieure à celle des autres extraits), suivi de Rezé, Nantes CHU, Mauves/Loire, Oudon, Bellevue et Donges terminal pétrolier.

L'échantillon prélevé à Saint-Nazaire (plage de Sautron) s'est révélé le moins actif, ce qui résulte probablement de la nature sableuse du sédiment et de l'effet de marée bi quotidien.

## 3. Une activité HAP-like

Les activités HAP-like (figure 36 C) sont quant à elles plus hétérogènes, et mettent en évidence une nette différence entre les sites aval et les sites intermédiaires par rapport aux sites amont. 11 sites présentent une activité HAP-like. Mauves/loire et Anetz présentent des réponses très faibles et 4



extraits sédimentaires (sites de Paimboeuf aval, Couéron, Rezé, Bellevue) possèdent des activités très élevées (6000,4000, 3500 et 4000 Eq-BaP en  $\mu\text{g/g}$  COT respectivement).

#### ***4. Une activité dioxine-like***

L'activité type dioxine-like (figure 36 D) est conséquente pour les différents extraits sédimentaires testés, et relativement uniforme sur l'ensemble des sites échantillonnés, révélant la présence de contaminants dioxines-like, avec une moyenne d'environ 100 ng d'Eq -TCDD/ g COT.de sédiment.

#### **EN CONCLUSION,**

L'activité oestrogénique est présente sur l'ensemble des sites mais semble ciblée sur les pôles urbains avec 3 pics bien individualisés : Nantes CHU, Oudon et Ancenis, ces deux derniers sites présentant les activités les plus fortes bien que de faible densité urbaine. Les analyses chimiques des extraits sédimentaires devraient nous apporter les éléments nécessaires à une analyse plus pointue, en lien avec le niveau d'épuration sur le secteur et les activités, industrielles, agricoles, ou domestiques présentes sur les sites correspondants ou à proximité.

L'activité anti-androgénique est représentée sur 8 sites /12 avec une moyenne de 50000 Eq-Fluta en ng/g COT de sédiment, en dehors d'Anetz.

Le fait majeur est la contamination des extraits sédimentaires en composés dioxines-like pour des concentrations particulièrement conséquentes avec une moyenne d'environ 100 ng d'Eq -TCDD/ g COT .

Les activités HAP-like sont, quant à elles plus hétérogènes, et mettent en évidence une nette différence entre les sites aval et les sites intermédiaire par rapport aux sites amont.

Pour l'ensemble des activités, et corrélativement aux informations disponibles sur les sources potentielles de contaminants, il apparaît que les conditions hydrodynamiques de l'estuaire jouent un rôle important dans la distribution des polluants et des mouvements sédimentaires naturels (marées, saisons, crues, bouchon vaseux, vents dominants,...) ou anthropiques (creusement du chenal navigable, extraction sédimentaire, mobilité de la crème de vase), (Dore et al, 2010; Romana et al., 1994; Desmazes et al., 2010; Sanchez et Delanoë, 2006).

Le temps de demi-vie de ces composés varie pour les moins persistants, de 25 à 258 jours pour le naphthalène (Nap) et pour les plus persistants, de 2360 à 2600 jours pour le benzo(ghi) pérylène



(B(ghi)per) et de 2400 à 2920 jours pour l'indéno(123cd) pyrène. En revanche, en milieu aérobie, leur demi-vie est beaucoup plus faible par rapport à celle obtenue en milieu anaérobie.

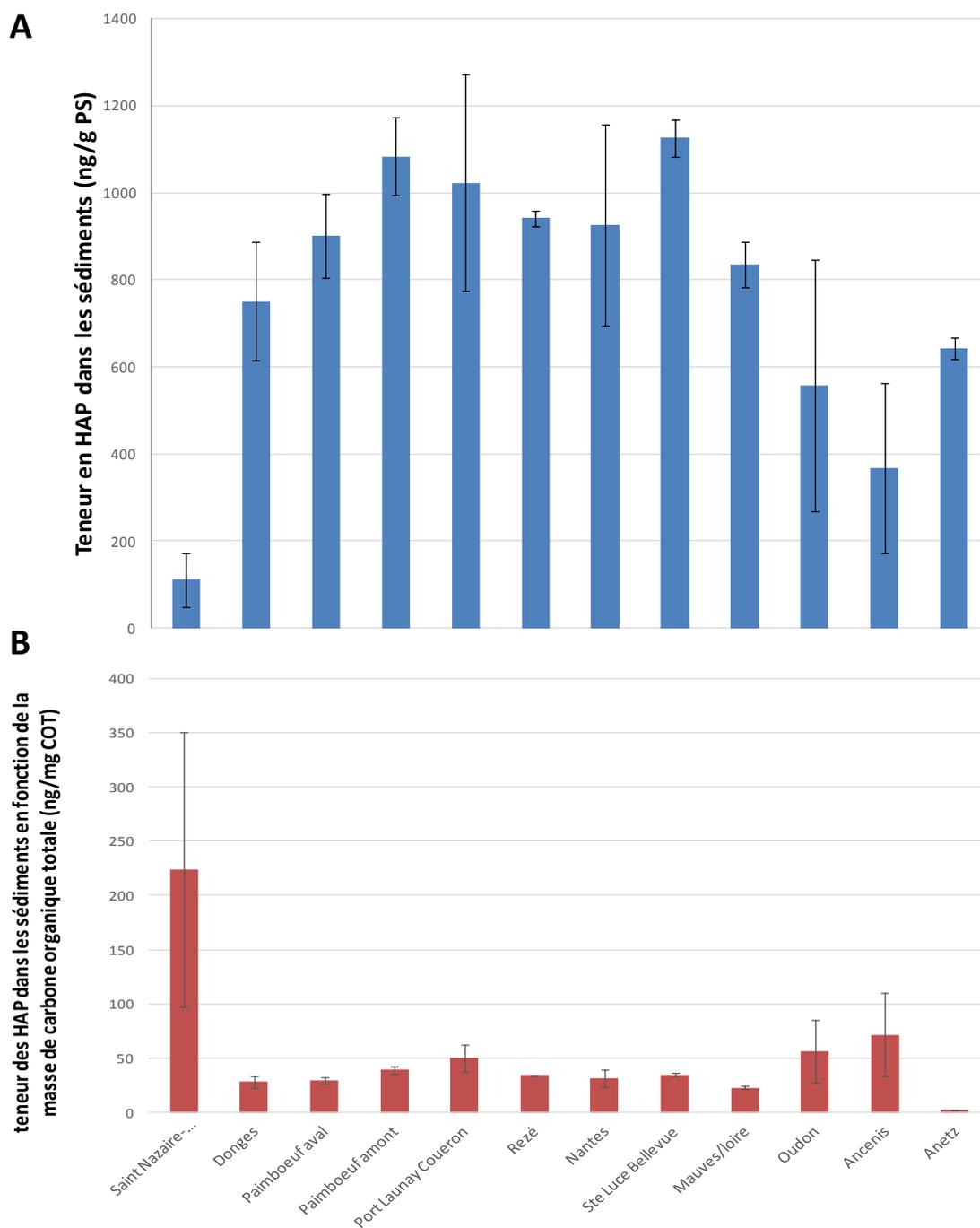
#### **5- Analyse chimique des HAP dans la matrice sédimentaire**

Les teneurs en HAP contenues dans les sédiments (ng/g PS) évoluent entre  $110,4 \pm 62,6$  (St Nazaire) et  $1125,7 \pm 43,0$  (Ste Luce-Bellevue).

Lorsque cette teneur en HAP est exprimée en ng/ mg de Carbone Organique Total (COT), la contamination estuarienne entre les différents sites reste toujours hétérogène et évolue entre  $2,08 \pm 0,08$  (Anetz) et  $223,92 \pm 126,97$  (St Nazaire). Ces différentes valeurs de COT sont en accord avec la structure sédimentaire de l'estuaire de la Loire d'aval en amont.

D'après les tests statistiques non paramétriques de Friedman, seuls les sites de prélèvements de Saint Nazaire-Sautron et de Sainte- Luce Bellevue ont des teneurs en HAP dans les sédiments significativement différentes (en ng/g PS). Selon les mêmes tests statistiques, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les différents sites pour leur teneur en HAP par mg de COT.





**Figure 37:** Teneurs en HAP exprimées en ng/g PS (bleu) et ng/mg de COT (rouge) dans les différents sites de prélèvement.

Quelque soit le site (figure 38), la teneur en HAP est globalement comprise dans la gamme de 722 à 1418 ng/g PS.



D'après les données collectées par le Groupement d'Intérêt Public (GIP) de la Seine, la contamination estuarienne moyenne par les HAP de l'estuaire de la Seine est de 1289 ng/g PS (Cachot et al. 2006), soit une contamination légèrement supérieure à celle de l'estuaire de la Loire en 2009..

La contamination estuarienne des différents sites étudiés se caractérise par son hétérogénéité. En effet, sur les 12 sites analysés, 7 possèdent une contamination supérieure à la moyenne calculée (772 ng/g PS). (Figure 38).

Les sites présentant une contamination inférieure à cette moyenne sont:

- Saint Nazaire-Sautron, Donges, Oudon, Ancenis et Anetz.
- Sainte Luce Bellevue est le site où la contamination estuarienne est la plus forte (1126 ng/g PS) alors que Saint Nazaire-Sautron est le site où elle est la moins élevée (110 ng/g PS).



## Pour résumer

### SEDIMENTS et EXPOSITION

#### 1- Les réponses aux tests cellulaires

- Une activité oestrogénique sur l'ensemble des sites et une absence d'activité androgénique
  - Une activité anti-androgénique détectée dans 8 sites /12 : moy. de 50000 Eq-Fluta en ng/g COT de sédiment
  - La présence dans tous les extraits sédimentaires de composés dioxines-like
  - Une activité HAP-like conséquente en aval et en position intermédiaire, discriminante
  - Des valeurs restant globalement faibles par rapport à d'autres estuaires (ex.: Seine)
- Une exposition réelle, modérée, exceptée pour les HAP.

#### 2- Les analyses chimiques

- Une teneur en HAP globalement comprise dans la gamme de 722 à 1418 ng/g PS quelque soit le site , contre une contamination moyenne de l'estuaire de la Seine de 1289 ng/g PS,
- Une hétérogénéité de la contamination estuarienne des différents sites étudiés
- Sur les 12 sites analysés, 7 possèdent une contamination supérieure à la moyenne calculée (772 ng/g PS).



# ***PARTIE 4***

*Imprégnation des muscles d'anguilles européennes  
par les Polychlorobiphényles, corrélations avec les  
paramètres biométriques*



## I. Introduction

Nous avons constaté que les sédiments de Loire sont imprégnés par plusieurs familles de contaminants, reflétant potentiellement les polluants présents dans la colonne d'eau, adsorbés plus ou moins rapidement sur les particules en suspension et les sédiments. Ces substances peuvent provenir de rejets directs ou indirects, plus ou moins diffus. Ils correspondent à des eaux continentales issues d'activités anthropiques (industries, agricultures, maraîchage, urbanisation, ...), mais aussi des eaux de ruissellement et de lessivage des sols (en lien avec les pollutions atmosphériques).

Ainsi, les Polychlorobiphényles dioxine-like (PCB dl) et non dioxine like (ndl) ont été, de par leur forte rémanence dans les milieux et tissus lipophiles, étudiés et analysés chez de nombreuses espèces de poissons dont les anguilles. Le plan INDICateurs d'abondance et de colonisation sur l'ANGuille européenne *Anguilla anguilla* (INDICANG, <http://www.ifremer.fr/indicang/>), a débuté en Mai 2004, et seuls quelques échantillons ponctuels ont été analysés en Loire, ne pouvant scientifiquement donner un sens écotoxicologique à la contamination sur le secteur estuarien, ni aux effets potentiels sur la santé des anguilles. Par contre, la santé des consommateurs de ces anguilles potentiellement contaminées, a fait l'objet d'une étude sanitaire (ANSES. and InVS. 2011b)

Parallèlement, la pêche civellière en estuaire de Loire et la ressource "anguilles adultes", montrent des signes forts de fragilisation, liés à une diminution de la ressource d'une part, et à la mise en place de quotas européens d'autre part (de Casamajor et al. 2005).

Mais qu'en est-il de l'impact potentiel de la contamination de l'estuaire de Loire, sur la santé d'anguilles potentiellement exposées à des sédiments contaminés, représentatifs de la mémoire de la charge aquatique en polluants?

Le résultat majeur des expérimentations précédentes est la contamination des extraits sédimentaires en composés dioxine-like, avec des concentrations particulièrement conséquentes, correspondant une moyenne d'environ **100 ng d'Eq –TCDD/ g COT**.

Afin d'investiguer plus précisément l'impact de cette exposition, les muscles de 65 anguilles européennes ont été analysés pour 18 PCB dont 12 PCB dl (4 coplanaires : 77, 81, 126, 169; et 8 non-coplanaires : 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189) et 6 PCB ndl, également dénommés indicateurs (28, 52, 101, 138, 153, 180).



En parallèle, 35 organismes ont été analysés pour 7 congénères de PCDD et 10 PCDF, selon la réglementation de l'Union Européenne (EC/1259/2011).

Ce travail s'est donc attaché à rechercher le niveau de contamination des anguilles du secteur estuarien ligérien afin d'obtenir un "point zéro" de ce milieu, point fort et reconnu des professionnels de la pêche civellière comme porte d'entrée massive des civelles sur la côte ouest Atlantique.

Les niveaux de contamination en PCB-dl et ndl ainsi que les niveaux en PCDD /F ont donc été investigués sur des anguilles prélevées en estuaire de Loire, au niveau de trois sites distincts, selon trois objectifs..

**1** - Caractériser la contamination par ces substances lipophiles d'une fraction homogène de la population d'anguilles européennes échantillonnées, en fonction du stade de développement des organismes, depuis les civelles jusqu'aux individus argentés prépubères.

**2** - Mettre en évidence une éventuelle variabilité spatiale (entre les 3 sites échantillonnés sur les 100 km de zone estuarienne) et ce, en fonction de classes de taille homogènes

**3** - Evaluer le risque potentiel pour la santé des consommateurs d'anguilles selon les recommandations de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), relatives aux niveaux de contaminations en PCDD/F et PCB-dl exprimés en TEQ {WHO/UNEP, 2013 #3216}.(Toxique équivalent (TEQ)).

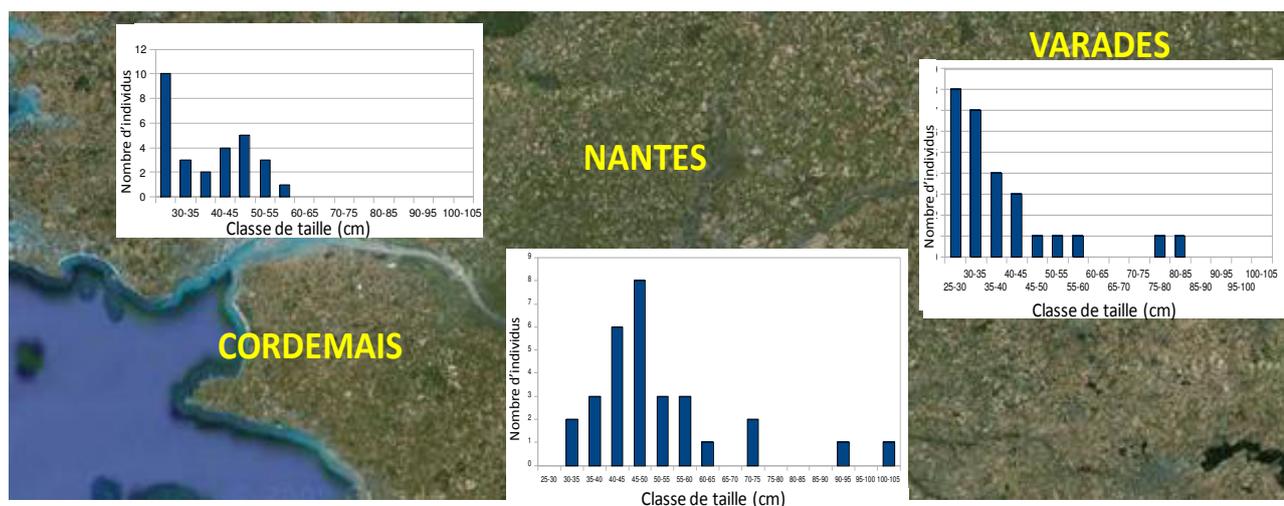


## II. Tendances paramétriques de la fraction de population échantillonnée en estuaire de Loire

### 1- Des descripteurs biométriques

[voir Tableaux 9,10 et 11 (en annexe) relatifs aux données biométriques des échantillons d'anguilles prélevées au niveau des trois sites]

Dans un premier temps, la fraction de population étudiée a été échantillonnée de manière aléatoire afin d'obtenir une représentation la plus proche possible de la population d'anguilles de l'écosystème estuarien de Loire. En effet, pour orienter nos choix d'analyse, il est nécessaire d'avoir auparavant une vision globale de l'écologie des anguilles sur l'estuaire de la Loire, et de comparer les descripteurs à d'autres estuaires. Cependant, le nombre de nos échantillons reste modeste et l'étude de cette fraction de population peut être plus ou moins éloignée du fonctionnement de la population d'anguilles à l'échelle du Bassin versant, particulièrement étendu en Loire, et alimenté par plusieurs zones humides et étendues d'eau conséquentes (Carrière de Ste Luce, Lac de Grand-lieu, Brière, rivières de l'Erdre, Gèvres et Sèvres, entre autres).

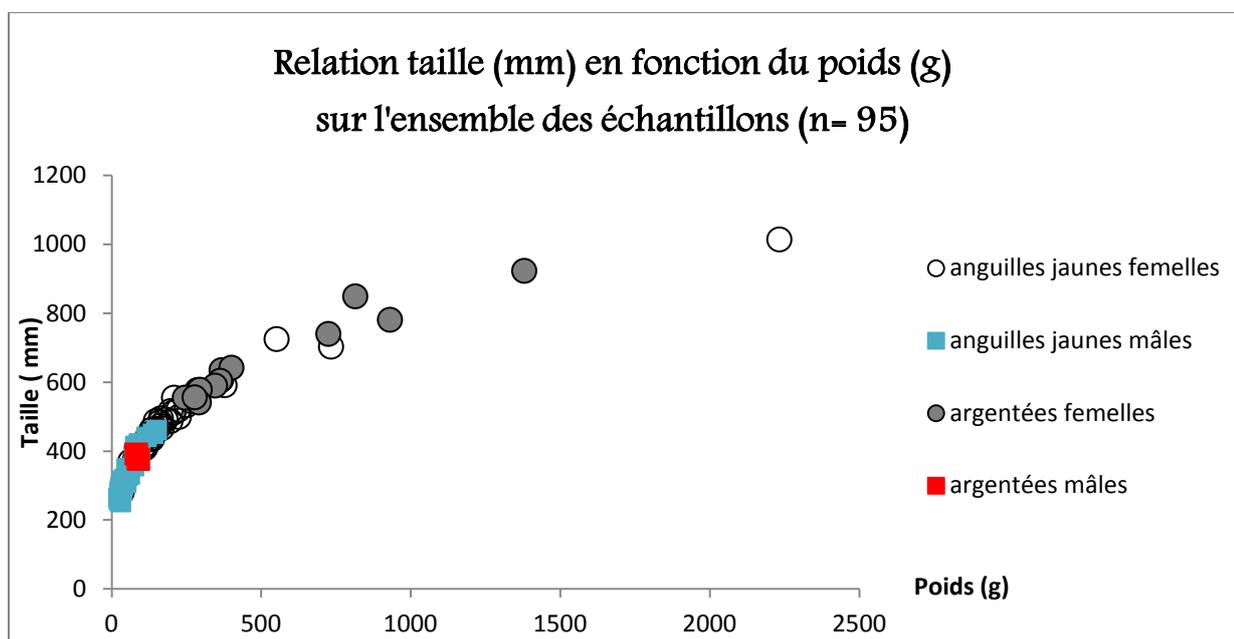


**Figure 38:** Cartographie des classes de tailles des anguilles en fonction des sites échantillonnés (Varades en amont, Nantes en situation intermédiaire et Cordemais, en aval)

La biométrie de la taille des anguilles (figure 39) révèle une zonation des organismes, les anguilles les plus petites (< 60 cm) étant principalement localisée en aval, tandis que les anguilles présentant une taille plus conséquente semblent se concentrer sur le site intermédiaire, le site amont étant colonisé par des anguilles présentant des tailles plus hétérogènes.



Il apparait donc que l'estuaire de la Loire possède une spécificité quand à la répartition des anguilles qui le colonisent, sans doute en relation avec le fonctionnement hydrodynamique du secteur et des conditions trophiques qui lui sont associées (Adam et al. 2008). Cependant, lorsqu'on considère l'ensemble de la fraction de population échantillonnée (n=95), on observe une corrélation entre la taille et le poids des individus (Figure 40) pour l'ensemble de la fraction étudiée. Les mâles argentés se distinguent par leur fort dimorphisme sexuel par rapport aux femelles jaunes et argentées.



**Figure 39.** Relation taille (mm) –poids (en g) de l'ensemble des anguilles échantillonnées (de Mai 2009 à Novembre 2010)

Cette structuration de la population échantillonnée est aussi visible entre la taille et l'âge des organismes; il existe une corrélation pour les organismes jaunes, qui sont aussi les plus jeunes. Par contre, cette corrélation n'existe plus pour les organismes âgés, en raison du déterminisme du sexe, d'une part, mais aussi en fonction de la maturité sexuelle.



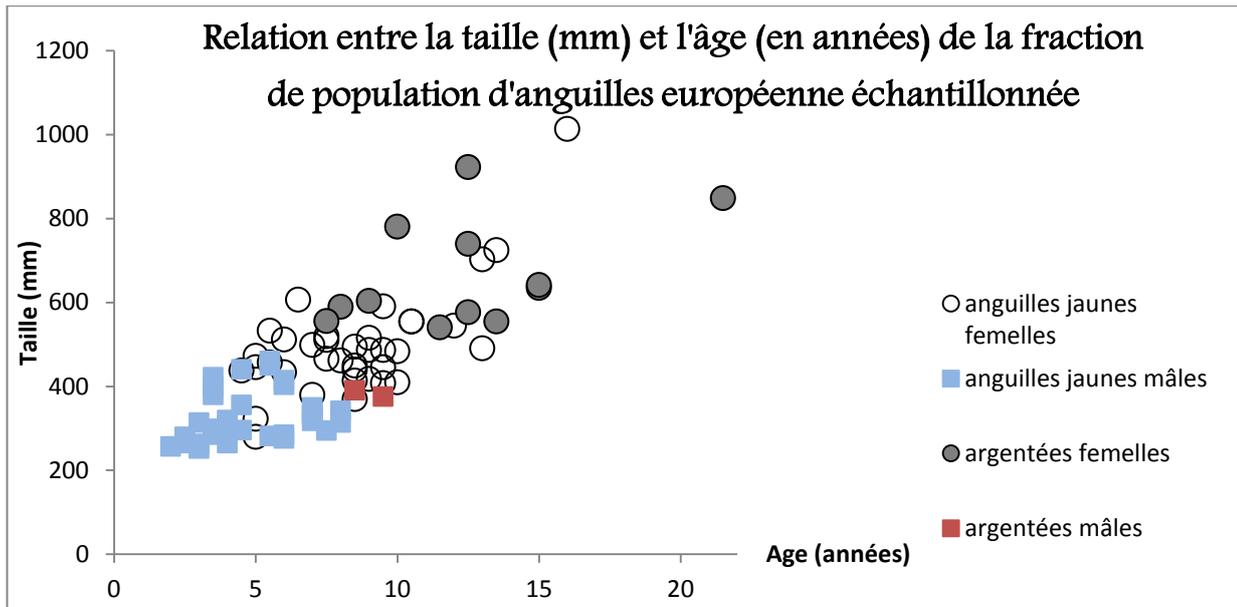


Figure 40: Relation taille (mm) - âge (années) des anguilles prélevées en estuaire de la Loire (Mai 2009 à Novembre 2010)

On peut aussi observer qu'il ne semble pas exister d'âge prédéterminé pour le passage du stade jaune au stade argenté, même si les individus femelles de grande taille (>60 cm) semblent davantage prédisposés à devenir des génitrices dévalantes (figure 41).

### Estimation du sexe - ratio des anguilles européennes en estuaire de Loire : Une prédominance des femelles se dessine



Figure 41: Estimation de la fréquence des sexes le long de l'estuaire de la Loire

A ce titre, la figure 42 permet de souligner le sexe-ratio de la fraction de population échantillonnée, caractérisé par une importance des femelles au niveau du site de Nantes Bellevue,

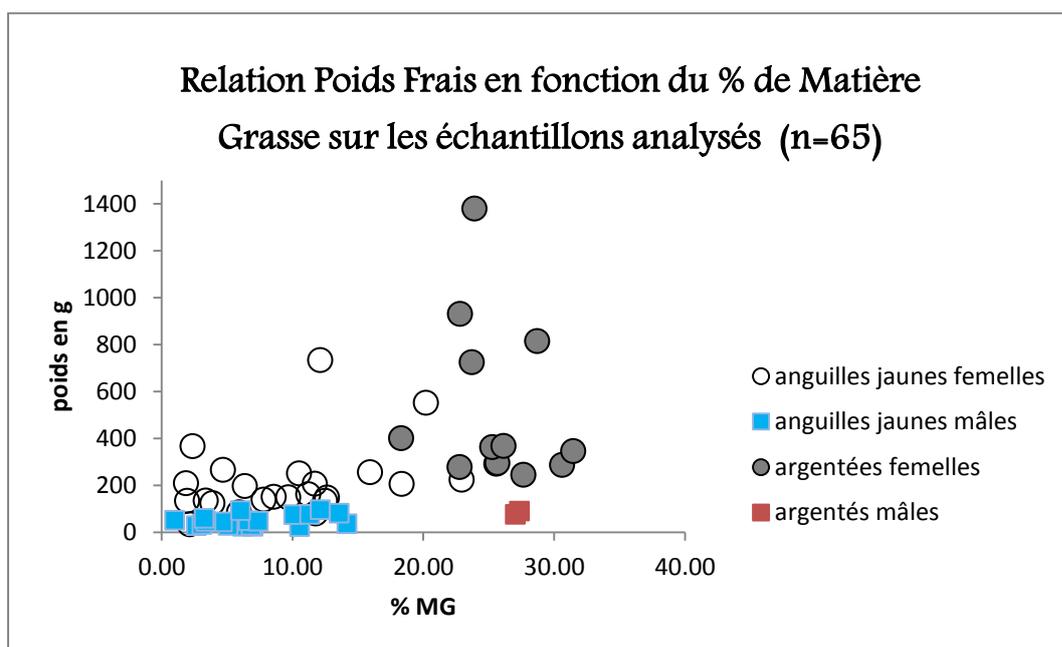


sans doute lié à la présence d'une situation écologique particulière (présence d'une fosse au niveau du pilier du pont?, conditions trophiques privilégiées?, conditions biotiques favorables à de vieilles carnassières solitaires?,...).

## 2- Une imprégnation globale en PCB

Cet "état des lieux" de la fraction de population d'anguilles échantillonnées étant réalisé, il convient d'analyser les tissus de nos organismes, potentiellement exposés aux sédiments.

En effet, les anguilles vivent toute leur vie au contact, et même dans les sédiments, et semblent donc particulièrement exposées à un risque toxicologique. De plus, les anguilles sont des organismes présentant une peau et des muscles riches en matières grasses, susceptibles de renforcer ce risque vis - à - vis de substances lipophiles comme les PCB, entre autres.



**Figure 42:** Relation poids frais des échantillons d'anguilles en fonction de la matière grasse présente dans les muscles (n=65)

Il apparaît clairement que le taux de matière grasse évolue au cours de la vie de l'anguille, et plus particulièrement, lors de la phase de croissance et la phase de prématuration sexuelle (figure 43). Il est à noter que les mâles argentés, malgré leur faible taille, se démarquent des mâles jaunes, contrairement au graphique précédent présentant la corrélation taille-poids.



Afin d'investiguer davantage cette imprégnation, 62 anguilles jaunes parmi 65 analysées ont été retenues afin de "calibrer" de manière cohérente les classes de taille.

Cet ajustement nous permet d'obtenir des nombres équivalents pour chaque site et dans chaque classe de taille; les comparaisons avec les autres études sont ainsi plus cohérentes, les échantillonnages étant le plus souvent effectués sur des anguilles jaunes.

Les niveaux de PCB dl, ndl et des PCDD/F dans les muscles des anguilles échantillonnées ainsi que l'étude de leurs variations en fonction du stade de développement et du site de prélèvement ont fait l'objet d'une publication dans *Science of the Total Environment* (article 1) et sont présentés ci-après.



III. Article 1 "Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum. Spatial and biological variabilities" *in* Science of the Total Environment





## Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: Spatial and biological variabilities



I. Blanchet-Letrouvé<sup>a,\*</sup>, A. Zalouk-Vergnoux<sup>a</sup>, A. Vénisseau<sup>b</sup>, M. Couderc<sup>a</sup>, B. Le Bizec<sup>b</sup>, P. Elie<sup>d</sup>, C. Herrenknecht<sup>a</sup>, C. Mouneyrac<sup>c</sup>, L. Poirier<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Université de Nantes, MMS, EA 2160, 9 rue Bias, Nantes F-44322, France

<sup>b</sup> LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes F-44307, France

<sup>c</sup> Université Catholique de l'Ouest, IBEA, CERE, 44 rue Rabelais, Angers F-49008, France

<sup>d</sup> IRSTEA, 50 avenue de Verdun, Gazine, Cestas F-33612, France

### HIGHLIGHTS

- PCBs and PCDD/Fs in eels from a moderately polluted estuary (France) were determined.
- Variability according to the site and life stage was observed.
- PCB pattern of glass eels underlined a different bioaccumulation pathway.
- Overall, eels from this estuary showed an intermediate contamination level.
- More than 60% of silver eels displayed values higher than the EU permissible level.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 12 July 2013

Received in revised form 6 November 2013

Accepted 6 November 2013

Available online xxx

#### Keywords:

European eel contamination

Life stage

Polychlorinated biphenyls

Dioxins

### ABSTRACT

To characterize the eel contamination by dioxin-like (dl) and non dioxin-like (ndl) polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans (PCDD/Fs), sixty-two eels from the Loire estuary (France) were analyzed. PCB contamination significantly increased from glass eel stage ( $3.71 \pm 1.85$  and  $15.2 \pm 4.2$  ng g<sup>-1</sup> dw) to other life stages (for yellow eels:  $62.8 \pm 34.4$  and  $382 \pm 182$  ng g<sup>-1</sup> dw; for silver eels:  $93.7 \pm 56.3$  and  $463 \pm 245$  ng g<sup>-1</sup> dw respectively for dl and ndl – PCBs). An inter-site variability based on PCB levels and profiles was observed among the three studied sites. For glass eels, the profile was mainly characterized by less chlorinated PCBs contrary to the other eels, displaying a different bioaccumulation pathway. Overall, the contamination level in the eels from this estuary was shown to be low for PCDD/Fs and intermediate for dl and ndl-PCBs, compared to other international/national areas. However, more than 60% of the studied silver eels displayed higher values for PCDD/F and dl-PCB WHO<sub>2005</sub> TEQ than the EU permissible level of 10 pg g<sup>-1</sup> ww. This statement suggests a potential exposure to PCBs through eel consumption, especially with silver eels, and also points out apparent contamination that could eventually affect the reproductive success of the species.

© 2013 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Since the 1980s, monitoring studies in European countries have shown the decline of glass eels arriving in coastal waters and estuaries (ICES, 2006). Similar steep declines of the prepubertal European eel (*Anguilla anguilla*) were also reported a few decades earlier and stocks were now estimated to be divided by ten (Dekker, 2003; Moriarty and Dekker, 1997). Several factors were brought forward to explain this decrease such as overfishing, obstacles to migration (Robinet and Feunteun, 2002), pathogens (Palstra et al., 2007b), climate change

(Castonguay et al., 1994) and contaminants (Geeraerts et al., 2011; Palstra et al., 2007a; Roosens et al., 2010; Van Ginneken et al., 2009).

Among these different factors, polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and furans (PCDD/Fs) seem to be particularly incriminated because of their potentials as estrogenic and anti-estrogenic disruptors (Canapa et al., 2002) and their neuroendocrine effects (Kodavanti and Curras-Collazo, 2010). They endanger several fish species including the eel population (Van Ginneken et al., 2009). PCBs represent a particularly persistent chlorinated chemical group of 209 congeners, which is ubiquitous in the environment and from an anthropological origin exclusively. Two classes of PCBs were distinguished according to their toxicological properties: the dioxin-like PCBs (dl-PCBs) which present analogous toxicity as dioxin

\* Corresponding author. Tel.: +33 685329898.

E-mail address: [isabelle.blanchet-letrouve@ac-nantes.fr](mailto:isabelle.blanchet-letrouve@ac-nantes.fr) (I. Blanchet-Letrouvé).

compounds and the non dioxin-like PCBs (ndl-PCBs) (European Union, 2011). These classes were related to chemical structure features such as the number and positions of the chlorine atoms. Due to their chemical stability, insulating and fire retardant properties, PCBs were used in the manufacturing of electrical equipment, heat exchangers, hydraulic systems, and several other specialized applications. In spite of the ban on their production during the 1980s, the accumulated production all over the world was estimated at 1,200,000 t and approximately 30% of this production is scattered in the environment, with essentially all in the oceanic environment (Votura and French, 2000). The contamination of aquatic organisms depends on the chemical properties of each congener. The exposure level in the environment and various biotic factors such as the metabolic capacity influence the bioaccumulation processes (Hubaux and Perceval, 2011).

Considered as a bottom dwelling fish, showing high body lipid content, a significant longevity and a carnivorous status, the European eel is extremely exposed to lipophilic persistent contaminants, such as PCBs, and represents a species sensitive to their bioaccumulation (Roche et al., 2000). Moreover, eels constitute an important economic value for nearby estuaries and rivers and an essential food resource (Després, 2009). Significant levels of PCBs have already been reported in European eels from the Gironde and Adour estuaries (France) (Tapie et al., 2011), in the Mondego estuary (Portugal) (Nunes et al., 2011), in the rivers of Italy (Mezzetta et al., 2011) and were suggested to be responsible for migration or reproduction impairments (Van Ginneken et al., 2009). Assessing PCB contamination of the European eel is therefore of great interest since their level is threatening public health, beyond a maximum value (European Union, 2011) and is also a potential risk for eel health itself (for review, Geeraerts and Belpaire, 2010). The Loire estuary's basin (117,800 km<sup>2</sup>) drains tributaries and runs through important urban sites (Nantes, Saint-Nazaire) with shipping, industrial and agricultural activities. It displays a diffusive pollution including a mixture of contaminants such as heavy metals (Grosbois et al., 2012), pesticides (Marchand et al., 2004), PAHs and PCBs (Hubaux and Perceval, 2011). For European eels, this estuary constitutes one of the most important continental migration paths of glass eels. The preservation of its chemical quality is therefore essential for eel health. However, a significant lack of data on the POPs contamination levels of European eels exists in this ecosystem, as only few individuals, sampled on the entire Loire River, have been analyzed in the French PCB framework (ONEMA, 2012). These results cannot be sufficiently representative of eels living in the estuary. In the present study, dl-PCB, ndl-PCB and PCDD/F levels were investigated in European eels fished in the Loire estuary. The present study was set out to reach three objectives: i) to get a representative assessment of PCB and PCDD/F contamination of European eel in the Loire estuary, according to the life stage; ii) to assess spatial PCB contamination

variations with yellow individuals (similar size class distributions), along three different Loire estuary sites (Fig. 1), and iii) to evaluate health risks for local consumers according to WHO recommendations (Van den Berg et al., 2006).

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling sites

As shown in Fig. 1, three sampling sites were selected in this study. Varades is a small city (about 3550 locals), located at the upstream boundary of the estuary (100 km from the Loire mouth); it also presents few industrial activities and is under particular agricultural pressure. The intermediate site is close to an important city, Nantes (about 600,000 locals) located at 50 km from the mouth, characterized by an industrial harbor and an urban zone including two incineration factories. The third site, Cordemais, is downstream of Nantes. It is strongly influenced by the North Atlantic Ocean and is well-known for its industrial activities, particularly the presence of a coal-fired power plant and its close proximity to an industrial complex including oil refineries. These three sampling sites were chosen to display different kinds of human activities on the estuary.

### 2.2. Sampled animals

Eels were sub-sampled from a previous ecotoxicology study (Blanchet-Letrouvé et al., 2013). The number of samples was in agreement with similar studies involving eel contamination (Daverat et al., 2011; Ferrante et al., 2010; Quadroni et al., 2013). During a year and a half, i.e. from May 2009 to January 2011, European eels were captured by local fishermen according to the fishing regulations, in the three sampling sites described above. Sixty-two yellow and silver eels were collected with fyke and stow nets respectively. Sixteen yellow eels were captured in Varades, 16 in Nantes and 17 in Cordemais. The captured eels were preferentially selected in order to obtain a similar size class distribution, i.e. about 4 to 5 eels per size class and per site. To evaluate the trend in contaminant level over life stage, glass eels (two pools of 40 individuals) and 13 silver eels were also captured. Individuals were transported to the laboratory in aerated 200 L tanks filled with water from the sampling site. They were maintained in the laboratory for a few hours until dissection under a natural photoperiod (L15/D9) and at a temperature around  $12 \pm 2$  °C, which is equivalent to the fishing site conditions. Glass eels were collected with a specific fishing net (authorized mesh size) in January 2011 in the estuary entry, near Cordemais. These glass eels had no pigment and corresponded to a stage before the onset of the feeding (Elie et al., 1982). They were

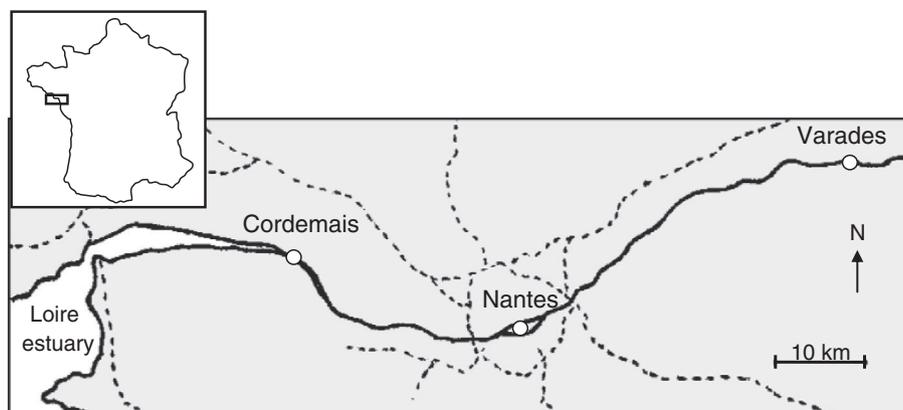


Fig. 1. Studied area: the Loire estuary (France). Three sampling locations (Cordemais; Nantes and Varades).

directly frozen at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in aluminum foil after fishing and later divided into two different pools.

### 2.3. Biometric parameters and life stages of the biological samples

Eels were anesthetized in a water bath of 10 L added with 1.5 to 2 mL of clove oil solution dissolved in ethanol (70%), according to the weight of eels (Palstra et al., 2007a). Once anesthetized, the body length (BL in mm) and the body weight (BW in g) of each European eel were measured. The animals were then killed, skinned and dissected in order to collect filets and otoliths. Biometric parameters were recorded to evaluate the Fulton's condition factor ( $K = (BW \times 10^5)/BL^3$  with BW and BL respectively expressed as g and mm) (Fulton, 1904).

The otoliths were used to determine the age of the organisms. The pair of otoliths named sagitta were removed from the eel's head. After extraction, otoliths were cleaned of all organic membranes in distilled water and dried with ethanol. The otoliths were later embedded in synthetic resin (Synolithe), and then polished to the nucleus with a polishing wheel (Streuers Rotopol-35) using two different grits of sandpaper (1200 and 2400). Fine polishing was done by hand with alumina (1  $\mu\text{m}$  grain) on a polishing cloth. Etching was done using 10% EDTA. A drop of this solution was applied on the mold for fifteen minutes. Then, the otoliths were rinsed with distilled water, stored in dry condition and stained with a drop of 5% Toluidine blue following grinding of the convex side (ICES, 2006). After drying, growth rings were counted using a light stereomicroscope. Individual age of eel was determined from reading annual otolith rings starting from the nucleus, considered as year 1 of the eel's life. The otolithometry was realized in partnership with the IRSTEA (Cestas, France). The life stage of silver eel was determined by macroscopic characteristics such as the differentiated lateral line (presence of black corpuscles), a contrasting skin color (dark dorsal surface and a white ventral surface), the ocular diameter and the pectoral fin length.

### 2.4. PCB and PCDD/F analysis

Eel filets and pools of glass eels were analyzed for 18 PCBs ( $n = 62$  and 2 pools of glass eels). Among them, 12 are dl-PCBs (#77; 81; 105; 114; 118; 123; 126; 156; 157; 167; 169; 189) and 6 are ndl-PCBs (#28; 52; 101; 138; 153; 180). PCDD/F analyses were achieved on 11 out of 62 eels (5 yellow and 6 silver individuals) and on the 2 pools of glass eels. The PCDD/Fs analyzed were the 17 congeners regulated by the European Union (EC/1259/2011). DI, ndl and marker PCBs in eel filets and pools of glass eels were expressed as a sum of all congeners or by congeners in  $\text{ng g}^{-1}$  wet, dry or lipid weight (ww, dw or lw respectively). Moreover, to estimate health risks from consumption and effects on eel, Toxic Equivalent (TEQ) values were calculated according to the World Health Organization Toxic Equivalency Factors (WHO TEFs) for human. To easily compare results from our study with literature, WHO<sub>1998</sub> TEFs and WHO<sub>2005</sub> TEFs were used (Van den Berg et al., 1998; Van den Berg et al., 2006). Results of dl-PCBs and PCDD/Fs were thus expressed in  $\text{pg g}^{-1}$ , in  $\text{pg WHO}_{1998} \text{TEQ g}^{-1}$  and in  $\text{pg WHO}_{2005} \text{TEQ g}^{-1}$  on a fresh weight basis.

#### 2.4.1. Reagents and chemicals

All organic solvents (Promochem) were Picograde<sup>®</sup> quality. Silica (Fluka), sodium sulfate (Merck), and sulfuric acid (SDS) were of superior analytical quality. Native and  $^{13}\text{C}$ -labeled standards were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (CIL) and Wellington Laboratory. Standard solutions were prepared in toluene. All reference solutions were stored in darkness at a temperature  $<6\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.2. Sample preparation procedure

Eel filets and pools of glass eels were homogenized, weighed and freeze-dried. Five grams (dw) of filets and pools of glass eels were cut, dehydrated, and milled using a turbo-mixer with glass bowl. Then,

samples were powdered and transferred into cells in order to be extracted by Accelerated Solvent Extraction (ASE) using a Dionex ASE 300. Before extraction, eighteen  $^{13}\text{C}$ -labelled PCB congeners were added to the samples for quantification by the isotope dilution method. Pressure and temperature were set to 100 bars and  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  respectively. The extraction solvent was a mixture of toluene/acetone 70:30 (v/v), and three successive extraction cycles (5 min each) were performed. The extract was evaporated to dryness by rotary evaporation ( $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), allowing the gravimetric determination of the fat content, in order to assess the filet lipid weight (LW in % of wet weight). The extracts were dissolved in 25 mL of hexane for sample clean-up.

Three purification steps were then performed, using acid silica, Florisil<sup>®</sup> and celite/carbon columns. After removal of fat on the first silica gel column activated with sulfuric acid, PCBs were separated from PCDDs/PCDFs on the second Florisil<sup>®</sup> column. The PCDD/F fraction was purified on a Carbo-pack C/Celite 545 column. The separation of coplanar (non-ortho) PCBs from non coplanar PCBs was achieved on an activated mixture of Florisil<sup>®</sup>/Carbo-pack C/Celite 545 (overnight at  $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). After the addition of external standards for the recovery calculation ( $^{13}\text{C}_{12}$ -PCB #111 for PCBs, and  $^{13}\text{C}_{12}$ -1,2,3,4-TCDD for PCDD/Fs), final sample extracts were evaporated under a nitrogen stream to dryness and reconstituted in 20  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$  and 10  $\mu\text{L}$  of toluene for coplanar PCBs, non coplanar PCBs and PCDD/Fs respectively.

#### 2.4.3. GC-HRMS measurement

PCB and PCDD/F measurements were performed by gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (GC-HRMS) using an 7890A gas chromatograph (Agilent) coupled to a JMS 700D or a JMS 800D magnetic and electric sector high resolution mass spectrometer (Jeol, Tokyo, Japan). A DB5MS (30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$ ) capillary column (J&W) was used in the splitless mode. The GC program for PCBs was  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  (3 min),  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  (0 min),  $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $245\text{ }^{\circ}\text{C}$  (0 min) and finally  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $275\text{ }^{\circ}\text{C}$  (7 min), for PCDD/Fs the GC program was  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  (3 min),  $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  (0 min),  $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $260\text{ }^{\circ}\text{C}$  (0 min) and finally  $25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  to  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$  (5 min). Ionization was achieved in the electron ionization mode (42 eV electron energy). The spectrometric resolution was set at 10,000 (10% valley), and the signal acquisition was performed in the Single Ion Monitoring (SIM) mode focusing on the two most abundant signals from each target molecular ion ( $^{35}\text{Cl}$  and  $^{37}\text{Cl}$  isotopic contributions). Signals were integrated by JEOL Diok software (v.4). The detection and quantification limits (LOD and LOQ respectively) are calculated by a JEOL Diok software according to the regulation for dioxin compounds analysis (LOD = LOQ at Signal/Noise = 3). A LOD is calculated for each congener and each sample (according to the sample mass).

#### 2.4.4. Quality assurance/quality control

All these procedures integrated quality control parameters to fulfill the requirements of the Commission Directive 2012/252/EC and 2012/278/EC, laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of dioxins and the determination of dl-PCBs in foodstuffs and feeding stuffs respectively. Moreover, all analyses were performed upon a double quality management system associated with an accreditation system according to the ISO 17025:2005 standard for analytical measurements.

### 2.5. Statistical analysis

The Shapiro–Wilk and the Kolmogorov–Smirnov tests were employed to determine the normality of the results. Consequently to these tests, non-parametric test (Kruskal–Wallis followed by Conover–Iman post-hoc test) was used to compare PCB levels and fingerprints in filets of eels with different life stages and from different sites. The significant level of each test was determined according to Bonferroni correction (corrected significant level of 0.005). To compare PCB levels in eel filets from different sites and facilitate their

discrimination, Principal Component Analysis (PCA) was performed. PCDD/F and dl-PCB WHO<sub>2005</sub> TEQ values were compared according to life stages using Mann–Whitney test at a significant level of 5%. All statistical treatments were performed with XLstat software.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Biometric parameters

Table 1 shows biometric parameters of the European eels collected in the Loire estuary according to life stage, sampling site and size class. These parameters allow characterizing of the local status of sampled individuals. The increase of BW was positively correlated with the increase of BL whatever the life stage (yellow or silver). The linear regression equations were  $BL = 128.92 \ln BW - 169.82$   $R^2 = 0.97$  ( $n = 49$ ) for yellow eels and  $BL = 220.94 \ln BW - 685.9$   $R^2 = 0.98$  ( $n = 13$ ) for silver eels. For yellow eels, no significant difference in the regression was shown according to the different sampling sites. These high correlations are in agreement with those found in other different European sites (Adam et al., 2010) and permit to divide the sampled fraction of the population according to a coherent set of biological characteristics. The age of eels is associated to BL and BW, only for yellow individuals from Cordemais ( $BL = 60.9 \text{ Age} + 109.2$   $R^2 = 0.77$  ( $n = 17$ )). No significant correlation was observed for yellow individuals from other sites and for silver eels. Regarding the Fulton's condition factor values (K), no significant difference was found between eels from the different sampling site with values ranging from 0.13 to 0.17. As well, no difference was observed between silver and yellow eels, except with those from Varades ( $p$ -value <0.003). According to Feunteun (2002), these values are representative of good eel health in the Loire estuary. Such values are similar to Fulton's condition factor values found in other studies about European areas (Gravato et al., 2010; Palstra et al., 2007b; Tapie et al., 2011). Nevertheless, better eel conditions were reported for eels in some other studied sites like the River Rhine Watershed and Lake IJsselmeer despite higher PCB contamination levels (Haenen et al., 2010; Santillo et al., 2005). Eels from less impacted Italian water bodies showed a low growth rate and condition status (Quadroni et al., 2013). No relationship between the Fulton's condition factor and levels of contaminants can be noticed since this heterogeneous factor characterizes also the habitat context and trophic conditions (Melià et al., 2006).

#### 3.2. Influence of life stage, sampling site and size class on dl and ndl-PCB levels

Table 1 shows the PCB levels (dl and ndl-PCBs) according to the life stage, the sampling site and the size class. As it was already reported in a previous work (Tapie et al., 2011), PCB levels determined for glass eels were higher than the limit of quantification of the analytical methods (the LOQ ranged from 0.16 (PCB #169) to 1.72 (PCB #156)  $\text{pg g}^{-1}$  ww for dl-PCBs and from 0.67 (PCB #101) to 13.4 (PCB #28)  $\text{pg g}^{-1}$  ww for ndl-ones). The sums of dl and ndl-PCBs are  $3.71 \pm 1.85 \text{ ng g}^{-1}$  dw and  $15.2 \pm 4.2 \text{ ng g}^{-1}$  dw respectively. These low but significant levels could be the result of a contamination via the food web during the leptocephali stage and of a direct exposure from the aquatic compartment. Indeed, at the end of the reproduction period in the Sargasso Sea, eel eggs hatch and free leptocephali larvae drift back towards the Atlantic coasts (Tesch and White, 2003). During their 6000 km migration from important pollution sources, these larvae eat essentially oceanic plankton and are mainly contaminated by feeding uptake. When they approach the continental shelf claim, the metamorphosis in glass eels occurs and is associated with a feeding interruption (Elie et al., 1982). During this period, glass eels are exposed to contaminants only by direct exposure from the abiotic compartment (dissolved phase, particles and sediments) (Tapie et al., 2011). Another explanation could be an intergenerational transfer of contaminants during oogenesis

**Table 1** Means and standard deviations of PCB levels (dl, ndl and seven markers) and biometric parameters (Body Length BL, Body Weight BW, Lipid Weight LW), Fulton's condition factor (K) and age of sampled European eels ( $n = 62$ ) from the three studied sites in the Loire estuary according to life stage and size classes.

Life stage	Sampling site	Size class (mm)	n	BL (mm)	BW (g)	Age (year)	LW (%)	K	Σ dl-PCBs			Σ ndl-PCBs			Σ 7 PCBs		
									ng g <sup>-1</sup> ww	ng g <sup>-1</sup> dw	ng g <sup>-1</sup> lw	ng g <sup>-1</sup> ww	ng g <sup>-1</sup> dw	ng g <sup>-1</sup> lw	ng g <sup>-1</sup> ww	ng g <sup>-1</sup> dw	ng g <sup>-1</sup> lw
Glass eels	Varades	<200	2	≤90	62 ± 12	<1	4.0 ± 0.8	n.d.	0.78 ± 0.48	3.71 ± 1.85	18.6 ± 8.3	3.03 ± 0.43	15.2 ± 4.2	78.1 ± 26.3	3.49 ± 0.16	89.2 ± 21.8	
		200–300	5	279 ± 14	30 ± 3	5.2 ± 0.8	4.9 ± 2.3	0.14 ± 0.02	13.0 ± 4.6	41.4 ± 12.4	286 ± 69	79.7 ± 28.6	254 ± 78	1764 ± 458	86.8 ± 31.3	1918 ± 491	
		300–400	5	349 ± 31	59 ± 17	5.7 ± 1.8	6.4 ± 4.9	0.14 ± 0.01	12.1 ± 4.2	37.6 ± 9.3	349 ± 372	72.7 ± 22.2	228 ± 47	1183 ± 510	79.3 ± 24.7	1284 ± 546	
		400–500	4	433 ± 26	111 ± 21	5.6 ± 1.8	6.0 ± 4.4	0.14 ± 0.01	14.0 ± 2.2	48.2 ± 6.5	334 ± 198	76.7 ± 14.2	261 ± 12	1770 ± 1006	84.5 ± 15.2	1953 ± 1111	
		500–600	2	533 ± 31	207 ± 2	9.0 ± 2.1	10.1 ± 11.7	0.14 ± 0.02	10.1 ± 7.5	29.0 ± 13.8	169 ± 121	69.1 ± 58.8	195 ± 118	1041 ± 619	74.6 ± 63.0	1132 ± 682	
Yellow eels	Nantes	300–400	5	366 ± 37	81 ± 28	8.6 ± 0.7	10.4 ± 5.7	0.16 ± 0.02	23.3 ± 8.9	71.8 ± 15.7	266 ± 131	144 ± 49.1	449 ± 78.5	1657 ± 722	158 ± 54.7	1810 ± 799	
		400–500	4	452 ± 33	129 ± 30	9.5 ± 0.5	10.2 ± 3.2	0.14 ± 0.01	26.0 ± 3.0	82.2 ± 10.3	278 ± 103	152 ± 16.4	482 ± 74.4	1669 ± 797	167 ± 17.3	1827 ± 852	
		500–600	4	546 ± 24	259 ± 49	10.5 ± 1.2	11.2 ± 6.7	0.16 ± 0.01	32.5 ± 13.5	97.8 ± 31.0	344 ± 135	181 ± 77.2	543 ± 171.3	1909 ± 767	199 ± 84.5	2100 ± 828	
		>600	3	678 ± 63	551 ± 183	11.0 ± 3.9	11.6 ± 8.9	0.17 ± 0.03	46.6 ± 37.7	135 ± 83	488 ± 244	252 ± 188	735 ± 402	2706 ± 1365	279 ± 210.0	2986 ± 1508	
		200–300	5	272 ± 10	26 ± 2	3.1 ± 0.7	6.6 ± 2.8	0.13 ± 0.01	13.4 ± 3.6	45.6 ± 11.4	238 ± 126	95.8 ± 23.5	327 ± 78.8	1291 ± 490	102 ± 25.1	1910 ± 1258	
Silver eels	Cordemais	300–400	5	342 ± 36	61 ± 19	3.8 ± 0.6	12.0 ± 3.6	0.15 ± 0.02	20.8 ± 9.0	61.8 ± 22.7	172 ± 45.5	136 ± 63.1	404 ± 166	1130 ± 378	146 ± 67.7	1217 ± 401	
		400–500	4	455 ± 17	147 ± 12	5.5 ± 0.4	7.7 ± 3.3	0.16 ± 0.01	13.2 ± 2.9	46.1 ± 6.7	191 ± 68.8	88.1 ± 21.0	307 ± 42.6	1275 ± 476	94.9 ± 22.4	1372 ± 508	
		500–600	3	522 ± 11	227 ± 22	6.3 ± 1.0	15.0 ± 6.8	0.16 ± 0.00	26.2 ± 7.2	76.1 ± 17.2	185 ± 54.4	165 ± 37.0	479 ± 68.9	1170 ± 285	178 ± 40.9	1263 ± 312	
		>500	13	659 ± 124	517 ± 344	12.4 ± 3.8	25.6 ± 3.5	0.16 ± 0.01	41.5 ± 26.5	93.7 ± 56.3	205 ± 113	463 ± 245	800 ± 425	229 ± 130	895 ± 485		

n.d.: non determined.

and vitellogenesis (Van Ginneken et al., 2009). It has been shown that PCBs and other hydrophobic pollutants can be transferred from females to eggs and thus impairing larval survival and development (Gutleb et al., 1999, 2007). This has been demonstrated in different Teleost fish (for instance, the European hake *Merluccius merluccius* and the zebrafish *Danio rerio*) for congener #153 (Bodiguel et al., 2009; Daouk et al., 2011).

Concerning yellow eels, the PCB contamination was significantly higher than that of glass eels whatever the sampling site and the size class considered. Regarding each site, no significant difference in ndl or dl-PCB levels expressed as ng g<sup>-1</sup> dw or lw was found between the different size classes (Kruskal–Wallis, p-value >0.1). This observation could be attributed to the low sample number per size class. For eels from Nantes, ndl and dl-PCB levels expressed on dw basis increase with increasing length, weight and age (Pearson correlations with p-values <0.05 for correlations between ndl and dl-PCB levels (dw basis) and BW; and p-values <0.01 for correlations between ndl and dl-PCB levels (dw basis) and BL or age). These correlations were not observed for Cordemais and Varades eels. Eels from Nantes were relatively older (9.8 ± 1.9 years compared to 4.4 ± 1.4 and 5.9 ± 1.9 years for eels from Cordemais and Varades, respectively; p-values <0.006). Moreover, they presented a Fulton's condition factor equivalent to silver eels. Comparatively, in Cordemais and Varades, individuals were globally smaller and tend to present a lower Fulton's condition factor. This statement could indicate that yellow eels sampled in Nantes present some physiological specificity suggesting for instance a reversal silver process or sedentism (Adam et al., 2010).

Regarding the silver eels, dl-PCB levels (dw basis) were significantly higher than dl-PCB levels for yellow eels from Varades and Cordemais. Considering the same unit, ndl-PCB levels of silver eels were significantly higher than levels depicted for yellow eels from Varades only. Considering dl- and ndl-PCB levels expressed on lw basis, the results of silver eels tend to be lower than those of the yellow ones. This statement was however only significant when comparing to yellow eels from Nantes regardless of the size class. These differences could be linked to physiological modifications occurring with silvering process. On the one hand, silver eels accumulated energy reserves in order to ensure their sexual maturation and their swimming towards spawning areas (Durif et al., 2005). This accumulation is gradual during the silvering. In this study, significant high lipid content was noticed for silver eels compared to yellow eels. Several authors showed an accumulation of pollutants linked to the increase of eel lipid content (Durif et al., 2005; Robinet and Feunteun, 2002). This could partially explain the higher dw basis PCB concentrations in silver eels. On the other hand, silver eels are migrants and could come from less contaminated upstream fresh water areas. In these areas, pollutants could be less accumulated which could explain the lower lw basis concentrations in silver eels. Finally, when eels start their downstream migration, they begun their starvation and must have started to mobilize their energy supply from liver and fat (Durif et al., 2005). This process induces a release of lipophilic compounds such as PCBs into the blood (Geeraerts and Belpaire, 2010). This hypothesis was not validated in our work and requires to be tested by specific PCB measures on lipids using a sufficient number of larger yellow and silver eels growing towards their sexual maturity.

In a previous work (Tapie et al., 2011), a literature review about marker PCB levels in *A. anguilla* filets was achieved. The seven marker PCB congeners are #28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180 and correspond to about half of the amount of total PCBs. This sum is considered as an appropriate marker for occurrence and human exposure of PCBs (European Union, 2011). The dl-PCB congener #118 was usually used as a marker PCB until the current regulation (European Union, 2011) which defined now 6 PCBs markers on the basis of the ndl-ones exclusively. To compare PCB levels of eels from the Loire estuary to biomonitoring results from other countries, the values obtained in this study for the seven marker congeners were summed, and expressed as ng g<sup>-1</sup> ww and lw (Σ 7 PCBs; Table 1).

At the international scale, eels from the Loire estuary appear to be more contaminated than those from some other sites in Poland, Ireland, Spain, Italy and the UK, where Σ 7 PCBs ranged from 14 to 756 ng g<sup>-1</sup> lw (Bordajandi et al., 2003; Corsi et al., 2005; McHugh et al., 2010; Santillo et al., 2005). However, higher levels were observed for the River Elbe in Czech Republic, the Tevere river in Italy, Flanders in Belgium, different lakes in Finland and some estuaries in The Netherlands, where Σ 7 PCBs ranged from 2176 to 9947 ng g<sup>-1</sup> lw (Belpaire et al., 2011; De Boer et al., 2010; Maes et al., 2008; Santillo et al., 2005; Tulonen and Vuorinen, 1996). Throughout France, eels from the Loire estuary are slightly more contaminated than those from the Vacares lagoon (Σ 7 PCBs = 176 ng g<sup>-1</sup> ww) and about two times more than those from the Thau pound (Σ 7 PCBs = 1036 ng g<sup>-1</sup> lw) (Oliveira Ribeiro et al., 2008; Santillo et al., 2005), whereas they are less contaminated than eels from the Rhone River (Σ 7 PCBs ranging from 4117 to 12759 ng g<sup>-1</sup> lw) and the Gironde estuary (Σ 7 PCBs ranging from 2569 to 4410 ng g<sup>-1</sup> lw) (Tapie et al., 2011).

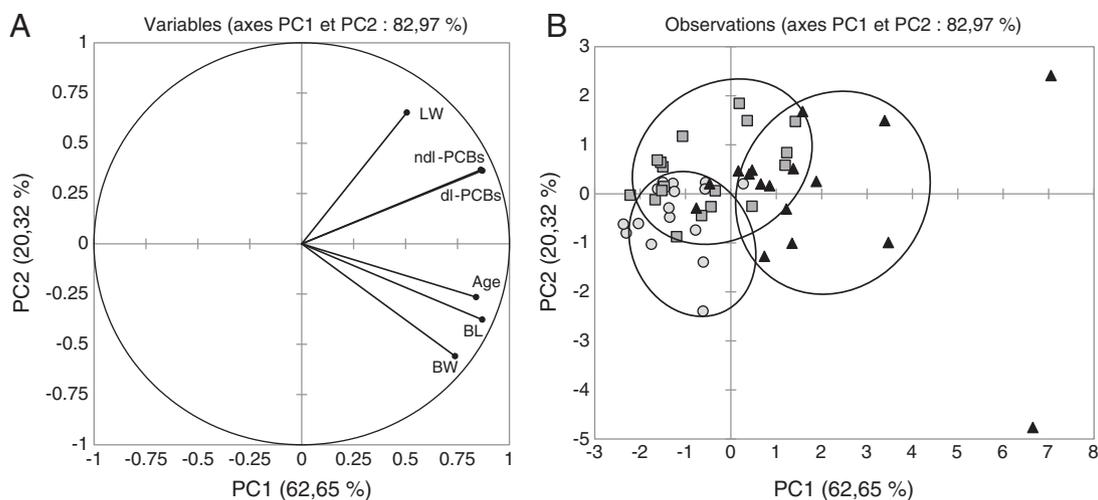
In order to evaluate the correlations between biometric parameters and PCB levels as well as the sampling site effect, a Principal Component Analysis (PCA) was performed by using biometric parameters (age, BW, BL and LW) and dl and ndl-PCB levels expressed on dw basis. Since silver eels are not strictly territorial, due to their downstream migration, they could have originated from other sites than the sampling ones. For that reason, the PCA was performed with yellow eels only. As it was shown in the Table 1, the size class distributions between the 3 studied sites are comparable. Consequently, it is possible to study and discuss the presence of an eventual sampling site effect on yellow eel impregnation.

The correlation loading and sample representation are shown on Fig. 2 (respectively Fig. 2A and B). The first two principal components (respectively PC1 and PC2) describe 82.97% of the total variability among eels. PC1 and PC2 represent respectively 62.65 and 20.32%.

The correlation loading (Fig. 2A) highlights that biometric parameters (BW, BL and age) are correlated to each other as it was depicted in Table 1. Concerning LW, it appears to be quite correlated to both levels of dl- and ndl-PCBs.

This observation is consistent with the results of other authors and was to be expected according to the lipophilic properties of PCBs and the increase of lipid content during the last years of the yellow phase (Van der Oost et al., 1996; Durif et al., 2005). This positive relationship could explain the increase of PCB levels with growth depicted for yellow eels from Nantes.

Regarding the sample presentation in Fig. 2B, the eels are relatively clustered according to the three different sampling sites. The comparison of Fig. 2A and B underlines that eels from Varades are the lowest contaminated by dl and ndl-PCBs (dw basis). This result was however closely related with lower LW (Mann–Whitney U test, p-value = 0.03). Lipid normalized PCB concentrations in eels from Varades, were actually comparable with those from Cordemais and Nantes (Mann–Whitney U tests, p-values for dl and ndl-PCBs respectively: 0.11 and 0.22 comparing to Cordemais; 0.33 and 0.47 comparing to Nantes). Considering this lw basis, the contamination level in Varades was then similar with Cordemais and Nantes. The eels from Nantes tend to be the most contaminated, with a high heterogeneity. A significant difference of lipid normalized PCB levels was found between eels from Nantes and Cordemais (Mann–Whitney U tests, p-values = 0.004 and 0.030 for dl and ndl-PCBs respectively). Varades, which is located upstream in the estuary, is a small and quite preserved city with about 3550 locals and with few industrial activities. It is relatively unexpected that the contamination level of this site was similar with Cordemais and Nantes. Nantes is indeed an important city with about 600,000 locals and Cordemais is downstream of Nantes and well-known for its industrial activities. Therefore, the living area of eels seems therefore to affect the contamination level as it was already shown in the Gironde estuary (Tapie et al., 2011). These differences were also closely related to variations of biometric parameters such as BL and age, both characterizing for



**Fig. 2.** Principal Component Analysis of biometric parameters and dl- and ndl-PCB levels expressed in  $\text{ng g}^{-1}$  dw in muscles of yellow eels from 3 sampling sites ( $n = 49$ ): Varades, Nantes and Cordemais. A: correlation loadings (BW: body weight; BL: body length; LW: lipid weight); B: sample representation (circles = eels from Varades; triangles = eels from Nantes; squares = eels from Cordemais).

instance a higher exposure time for yellow eels from Nantes, such as previously described. These inter-site differences are highlighted in the next section dealing with each PCB profile.

### 3.3. PCB profiles

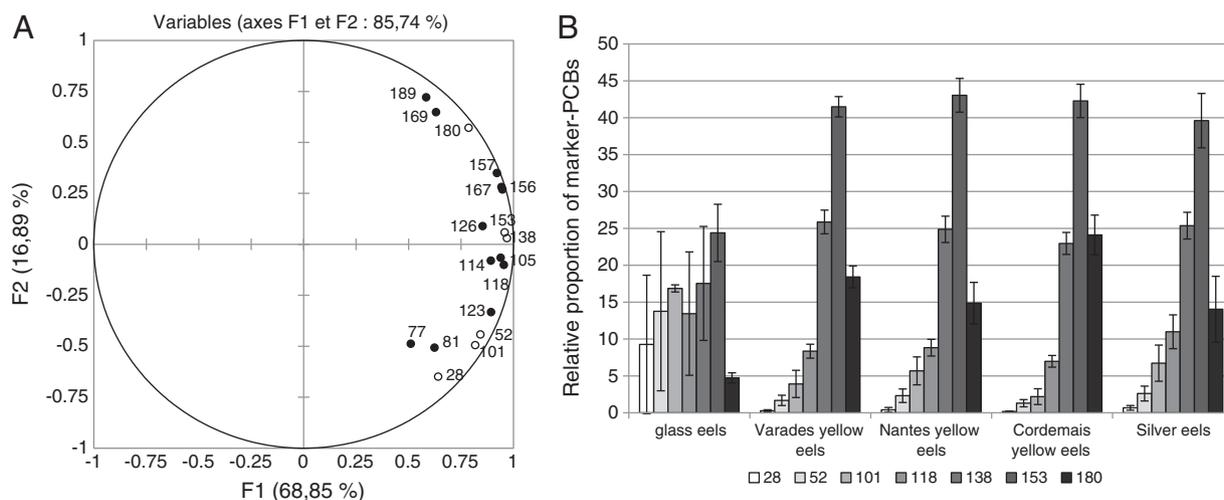
To evaluate the influence of the sampling site on PCB profiles in yellow eels, a second PCA was performed using each individual PCB level expressed as  $\text{ng g}^{-1}$  dw. The result of the PCA correlation loading is shown in Fig. 3A. The first two principal components (respectively PC1 and PC2) describe 85.74% of the total variability among eels. PC1 and PC2 respectively represent 68.85 and 16.89%. This figure highlights that the first principal component is positively correlated to all individual PCB levels. The second one is negatively correlated to low chlorinated PCBs and positively to highly chlorinated congeners.

Each PCB congener is represented around the right part of the correlation circle. Nevertheless, the repartition of the different PCBs seems to be due to their chemical structure, i.e. the number and the position of Cl atoms. Low chlorinated PCBs with few Cl atoms in meta and para positions are on the right bottom of the correlation circle. The higher chlorinated congeners with several Cl atoms in meta and para positions are located in the right top of the circle. Ndl-PCBs are

considered as particularly persistent and ubiquitous contaminants in the environment, representing about 50% of all of the PCB congeners found in food from animal origin (AFSSA, 2006). According to Fig. 3A, they were well distributed around the right part of the correlation circle and among all the other PCBs, emphasizing their qualitative representativeness of all the PCB congeners (Cariou et al., 2010).

#### 3.3.1. Influence of the life stage

Overall, the ndl-PCBs contributed mainly to total PCB levels compared to dl-PCBs. Their shares were on average 79.4% for glass eels, 86.0% for yellow eels and 83.0% for silver eels. The accumulation profiles of the seven marker-PCBs in glass, silver and yellow eels from the three sampling sites were presented in Fig. 3B. Whatever the life stage, the main congener was PCB #153. Interestingly, this PCB is considered as a non metabolizable congener, a tracer of bioaccumulation process. Variation in its proportion suggests a difference of contamination profiles related to a difference of diet, ecology, physiology or metabolization capacities (Tapie et al., 2011). Its share was the lowest for glass eels with a mean value of 24.7%. For silver eels, this congener contributed to the marker-PCB profile with a mean of 39.3%. A higher value (mean 41.5%) was found for yellow eels from Varades. The highest contributions (mean 42.3 and 42.8% respectively) were depicted for individuals



**Fig. 3.** Representation of PCB patterns. A: correlation loadings of Principal Component Analysis of dl and ndl-PCB muscle levels expressed in  $\text{ng g}^{-1}$  dw in yellow eels from 3 sampling sites ( $n = 49$ ): Varades, Nantes and Cordemais (dl-PCBs: black circles; ndl-PCBs: white circles); B: relative proportion (in %) of marker-PCBs in eel filets according to the life stage and the sampling site.

from Cordemais and Nantes. These values were significantly higher than values depicted for glass and silver eels (Kruskal–Wallis test,  $p$ -values  $<0.003$  and  $0.002$  respectively). Overall, PCB profiles of silver eels were closer to those depicted by yellow eels from Nantes as only PCBs #28 and #153 were different, with the percentage of PCBs #28 being significantly higher in silver eels ( $p$ -value  $<0.0001$ ). The eels from Cordemais displayed the most significant difference because all the PCB relative percentages are significantly different from those of silver eels ( $p$ -values ranging from  $0.0001$  to  $0.002$ ). The singular profile of silver eels could be the result of several factors. Silver eels fished during the downstream run could have come from upstream, from less contaminated fresh water areas far from PCB sources. In these areas, the less chlorinated PCBs are more present as these light compounds are transported over longer distances because of their longer residence time in the atmosphere (Motelay-Massei et al., 2004). On the other hand, we could suppose that the mobilization of lipids during silverying process lead to differences of PCB profiles according to the life stage.

Concerning the glass eels, a contrasting profile was noticed, mainly characterized by an important proportion of less chlorinated PCBs to the detriment of the heaviest PCBs, which implied a different bioaccumulation process. This was already shown in a previous study (Tapie et al., 2011) in which congeners 28, 50, 52, 101, and 118 represented 51% of accumulation profile for glass eels sampled in the Gironde estuary. Comparatively, the relative proportion of these congeners (without the PCB #50 not analyzed in this study) represents 53% of glass eels in our study. On one hand, according to Tapie et al. (2011), this singular profile could confirm a contamination mainly by direct exposure during the period of metamorphosis into glass eels. In the water column, the less-chlorinated compounds, more polar, shared a significant percentage of the dissolved phase and particulate matter (Cailleaud et al., 2007). On the other hand, the transfer of low chlorinated PCBs during the oogenesis, more efficient than those of the heavy chlorinated PCBs, could be linked to this singular profile (Bargar et al., 2001; Verreault et al., 2006).

### 3.3.2. Influence of the sampling site and environmental parameters

The sampling site influence has been explored regarding the non-migrant yellow eels. A variability of PCB profiles was observed, particularly for eels from Cordemais which displayed profiles with significantly lower proportions of PCBs #28 ( $p$ -values  $<0.004$ ) and 118 ( $p$ -values  $<0.0002$ ), and higher proportion of #180 ( $p$ -values  $<0.0001$ ) compared to eels from other sites. PCB #180 appeared to be the only congener able to discriminate amongst the sampling sites. Its proportion was shown to be high in Cordemais eels, low in Nantes eels and intermediate in Varades eels. For the marker-PCB#153, no significant difference was observed according to the sampling site ( $p$ -values  $>0.047$ ).

In estuaries, the PCB sources are multiple and the contamination could be done following atmospheric or aquatic routes. PCBs are mainly sorbed to suspended particulate matter and sediment, but they may also be free in the dissolved phase, bound to dissolved organic matter (Cailleaud et al., 2009). Hydrophobic organic contaminant exchanges between the suspended particulate matter or sediments and the water

column have been shown by resuspension of in-place sediments during tidal and wind events (Eggleton and Thomas, 2004). In several estuaries, inputs resulting from PCB resuspension processes were shown to be the dominant source compared to fluvial inputs or atmospheric depositions (Cailleaud et al., 2009). Moreover, the Loire estuary is clearly tidally dominated, leading to strong hydrodynamic, sedimentary and abiotic parameters (Dauvin, 2008). The marine tidal effects can be observed up to 97 km away from the estuary mouth. This dynamic modifies the temperature from the mouth of the estuary to the upstream boundary leading to variations of  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  from downstream to upstream. The Loire estuary is also characterized by a fluid mud which extends over 20 km in the downstream part (Cordemais site) and the magnitude is influenced by tidal currents; so the turbidity varies from  $2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  at the surface to  $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  near the bottom (GIP, 2010). All these parameters (salinity, turbidity, temperature and tidal cycles) were known to affect the bioavailability of PCBs (Cailleaud et al., 2009; Turner, 2003). For instance, in the Seine estuary, highest PCB levels were observed in surface and bottom waters when suspended particulate matter remobilizations were maximum, in relation to higher speed currents. In the Loire estuary, geochemical processes and transport of organochlorinated contaminants during tidal cycles are lacking and must be investigated to assess the water quality of this estuary.

On the other hand, the three sampled sites showed different anthropogenic pressures. Indeed, Varades is a relatively small city, marked by several agricultural activities where PCB sources are probably less important than in Nantes or Cordemais. On the contrary, Nantes is an important urban and industrial city, with a significant economic and demographic development, where various maritime and industrial activities exist. High amounts of domestic, industrial and agricultural effluents are discharged into the Loire estuary, with somewhat efficient preliminary depollution in sewage treatment plants. The eels from Cordemais presented a unique PCB profile, which could be explained by the presence of PCB sources around Cordemais. Indeed, this area is dominated by substantial industrial activities such as a coal-fired power plant, an incinerator factory, an industrial complex including oil refineries and an old industrial waste dump (Boudet, 2003).

### 3.4. Dioxins, furans and dl-PCBWHO TEQ values

Table 2 presented the mean concentrations of PCDD/Fs and dl-PCBs in eels, according to the life stage. Mean concentration of PCDD/Fs ( $\Sigma$  PCDD/Fs) was  $1.42\text{ pg g}^{-1}$  ww for glass eels. A higher value ( $2.94\text{ pg g}^{-1}$  ww) was noticed for yellow eels and a maximum level of  $3.61\text{ pg g}^{-1}$  ww has been reached for silver eels. According to WHO<sub>1998</sub> TEFs, mean values ( $\Sigma$  PCDD/F TEQ 98) of 0.12, 0.68 and  $1.00\text{ pg WHO}_{1998}\text{ TEQ g}^{-1}$  ww were respectively obtained. The WHO<sub>2005</sub> concentrations ( $\Sigma$  PCDD/F TEQ 05) were about 18% less on average. These levels are similar to concentrations measured in eel from Polish lagoons ( $0.30$ – $1.88\text{ pg WHO}_{1998}\text{ TEQ g}^{-1}$  ww; Szlinder-Richert et al., 2010). Lower concentrations were measured in eels from the River Turia in Spain ( $0.369$ – $0.580$  with mean of  $0.2\text{ pg WHO}_{1998}\text{ TEQ g}^{-1}$  ww; Bordajandi et al., 2003). Higher concentrations have

**Table 2**  
Concentrations of PCDD/Fs and dl-PCBs in the European eels from the Loire estuary. For each life stage and contaminant class, the number of eel analyzed (n), the mean concentrations expressed as  $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$  wet weight ( $\Sigma$ PCDD/Fs or  $\Sigma$ dl-PCBs),  $\text{pg WHO}_{1998}\text{ TEQ g}^{-1}$  ( $\Sigma$  TEQ 98) and  $\text{pg WHO}_{2005}\text{ TEQ g}^{-1}$  ( $\Sigma$  TEQ 05) are given.

		Glass eels	Yellow eels	Silver eels
PCDD/Fs	n	2 pools	5	6
	$\Sigma$ PCDD/Fs	$1.42 \pm 0.11$ (1.35–1.50)	$2.94 \pm 1.77$ (1.54–5.99)	$3.61 \pm 1.78$ (2.25–6.80)
	$\Sigma$ PCDD/F TEQ 98	$0.12 \pm 0.01$ (0.11–0.13)	$0.68 \pm 0.39$ (0.40–1.37)	$1.00 \pm 0.59$ (0.47–2.00)
	$\Sigma$ PCDD/F TEQ 05	$0.09 \pm 0.01$ (0.09–0.10)	$0.56 \pm 0.32$ (0.33–1.11)	$0.82 \pm 0.50$ (0.42–1.70)
dl-PCBs	n	2 pools	49	13
	$\Sigma$ dl-PCBs	$780 \pm 480$ (440–1120)	$20283 \pm 13555$ (4753–89218)	$41517 \pm 26496$ (6939–115786)
	$\Sigma$ dl-PCB TEQ 98	$0.24 \pm 0.07$ (0.19–0.30)	$6.18 \pm 3.61$ (1.39–20.5)	$13.5 \pm 5.69$ (2.84–24.8)
	$\Sigma$ dl-PCB TEQ 05	$0.17 \pm 0.02$ (0.16–0.19)	$3.82 \pm 2.26$ (0.80–10.5)	$8.91 \pm 3.34$ (2.14–13.8)

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (minimum–maximum).

been noted in several European sites in the last decade: in pools of yellow eels (1.2 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Geeraerts et al., 2011) and in silver eels (2.92 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Byer et al., 2013) from Belgium, in the Baltic sea (0.4–5.9 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Karl et al., 2010), in Irish waters (0.2–4.4 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; McHugh et al., 2010), in southern Norway (5–23 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Knutzen et al., 2003) and in the Elbe river and its tributaries (0.5 to 12 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Stachel et al., 2007).

Mean TEQ concentrations for dl-PCBs ( $\Sigma$  dl-PCB TEQ 98) ranged from 0.24 for glass eels to 13.5 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww for silver ones. These values were about 2 times higher than  $\Sigma$  PCDD/F TEQ 98 for glass eels and from 12 to 16 times higher for yellow and silver individuals. As for PCDD/F TEQ concentrations, eels from the Loire estuary are less polluted with dl-PCBs than eels from Belgium (1–139 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Geeraerts et al., 2011) and from Germany (8.5–47 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Stachel et al., 2007). However, these levels were similar to those measured in eels from the Baltic sea (0.93–15.3 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Karl et al., 2010) and higher than those noted in eels from Irish waters (0.17–1.24 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; McHugh et al., 2010), the southern Norway (1.4–3.9 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Knutzen et al., 2003), Spain (0.09 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Bordajandi et al., 2003), Italian bodies of water (0.35–4.34 pg WHO<sub>2005</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Quadroni et al., 2013) and Poland (1.55–7.11 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww; Szlinder-Richert et al., 2010).

dl-PCBs accounted for the highest percentage (mean 91.6%, range 82.1–96.8%) to the total-TEQ value ( $\Sigma$  PCDD/F TEQ 98 +  $\Sigma$  dl-PCB TEQ 98) for yellow and silver eels. These results were in agreement with data on Belgium and German eels (Stachel et al., 2007; Geeraerts et al., 2011), but this percentage is high compared to other European areas which showed dl-PCB levels ranging from 17% to 70% of the total-TEQ value (Knutzen et al., 2003; Karl et al., 2010; McHugh et al., 2010). A lower percentage was calculated for glass eels (67.0 ± 4.2%) emphasizing a different bioaccumulation process.

The contribution of PCDDs, PCDFs, dl-PCBs to the PCDD/F TEQ and dl-PCB TEQ values were respectively shown in Fig. 4A and B. Whatever the life stage, the relative congener profiles of PCDD/Fs were dominated by 2,3,4,7,8-PeCDF which shared 44.1% to 50.2% on average of the PCDD/F TEQ. Similar results were denoted by Szlinder-Richert et al. (2010) and Geeraerts et al. (2011) in eels from Poland and Belgium respectively. For dioxins, the congener 1,2,3,7,8-PeCDD predominated, its shares in the PCDD/F TEQ was 20.5% for glass eels and on average 32.4% (range 23.1–43.2%) for yellow and silver eels. The congener 2,3,7,8-TeCDD, known as the most toxic dioxin, contributed on average 5.65% for glass eels and 8.55% for yellow and silver eels.

Among the dl-PCBs, the four non-ortho substituted PCBs (no-PCBs) and the eight mono-ortho substituted PCBs (mo-PCBs) contributed differently regarding the life stage to the dl-PCB TEQ values. The no-PCBs accounted for about 49.0% in yellow eels, 57.4% in silver eels and 62.7% in glass eels, so the mo-PCBs contributed 51.0%, 42.6% and 37.3%, respectively. Among the no-PCBs, PCB #126, the most toxic congener, predominated and contributed most to the no-PCB TEQ (mean of 98.0%), regardless of the life stage. Eel from Belgium also showed a dominant contribution of PCB #126 to the dl-PCB TEQ with 52% on average, but without information on the individual life stage (Geeraerts et al., 2011). An Italian study (Quadroni et al., 2013) showed a similar percentage (according to WHO<sub>1998</sub> TEFs, mean of 57.1%) for silver individuals living in the heavily urbanized zone (Tevere river). On the other hand, in the less anthropized areas (Caproce Lake and Lesina Lagoon), different shares were reported ranging from 83.5% to 98.0% (Quadroni et al., 2013). In Poland, Szlinder-Richert et al. (2010) reported the contribution of no-PCBs in the total TEQ as the highest with a predominance of PCB #126 (70 to 80% of the no-PCB TEQ). On the contrary, in eel from the Camargue (France), this congener was not detected (Oliveira Ribeiro et al., 2008).

As concerns the mo-PCBs, PCB #118 was the most dominant congener and its share in the dl-PCB TEQ was about 17.7% and consistent over

the life stage. Notable contributions of PCB #156 could also be noticed showing significant variations between glass eels (7.09%), yellow eels (19.4%) and silver eels (13.6%). Again these observations were in agreement with other results reported on Belgium eels (PCB #118: mean 16% and PCB #156: mean 18%) (Geeraerts et al., 2011).

PCDD/F, dl and ndl-PCB contaminants could lead to damages for the eel population by affecting their reproduction and by a transfer of pollutants to eggs. Palstra et al. (2006) observed disrupting effects of dl-PCBs on development and survival of eel embryos at levels below 4 pg WHO<sub>1998</sub> TEQ g<sup>-1</sup> in gonad. Negative consequences on reproduction should be expected for the most polluted silver eels of the Loire estuary, as dl-PCBs accumulated in muscle fats are metabolized together with the lipid metabolism occurring during migration and sexual maturation. On the other hand, acclimation of eels to seawater, silencing process and reproduction migration are under different endocrine controls and fuel consuming. This energetic cost has been reported to increase significantly when lipid files of swimming eels are charged with PCB mixture (after intraperitoneal injection of 5000 ng g<sup>-1</sup> of PCB #153, 7 ng g<sup>-1</sup> of PCB #126 and 50 ng g<sup>-1</sup> of PCB #77) (Thillart et al., 2009).

### 3.5. Public health

The maximum levels set for PCDD/Fs and dl-PCBs for eel filets are currently 3.5 pg WHO<sub>2005</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww for the PCDD/F TEQ and 10 pg WHO<sub>2005</sub> TEQ g<sup>-1</sup> ww for the PCDD/F TEQ + dl-PCB TEQ (European Union, 2011). These values were not reached regarding the yellow eels. However, in the case of the silver ones, biological variability was high and 4 out of 6 studied eels displayed PCDD/F TEQ + dl-PCB TEQ values higher than permissible limits (Table 2).

Regarding congeners #28, 52, 101, 138, 153 and 180 (ndl-PCBs), sampled eels did not present levels superior than the maximum level of 300 ng g<sup>-1</sup> ww (European Union, 2011). Silver and yellow eels from Nantes depicted the highest levels (mean of 205 ± 113 and 176 ± 91 ng g<sup>-1</sup> ww, respectively), but few individuals (3/29) presented concentrations higher than the maximum level (Table 1). Yellow individuals from Cordemais presented intermediate levels (mean of 118 ± 48 ng g<sup>-1</sup> ww) whereas those from Varades are the least contaminated (mean of 75.5 ± 25.2 ng g<sup>-1</sup> ww).

Our results indicate a potential exposure to PCBs through eel consumption in this estuary, and especially with silver eels. The French Food Safety Agency proposed a tolerable daily intake (TDI) of 10 ng/kg body weight/day (for the 6 ndl-PCB congeners), which represents 700 ng/day for a 70 kg person or 150 ng/day for a child of 15 kg (under 3 years) (French Food Safety Agency, 2010). It could then be recommended to limit the consumption of eel from the Loire estuary to one portion (150 g) per month for the general population, which represents an average dietary daily intake of 694 ng/day. This is more restrictive than the French Food Safety Agency recommendations which limit the consumption of PCB bioaccumulating fish to two portions per month for the general population. Specific recommendations (a portion of 60 g every two months) exist for the most sensitive populations (pregnant and breastfeeding women, young and adolescent girls, women of childbearing age, and children under 3) and are in agreement with our results, representing an average dietary daily intake of 139 ng/day.

A national study assessing the PCB impregnation of freshwater fish consumers performed on six investigation sites including the Loire revealed that only 13% of participants are strong PCB-bioaccumulator freshwater fish consumers, with a moderate consumption frequency of 1 time per month (French Food Safety Agency, 2011). Among the strong PCB-bioaccumulator freshwater fish species, eel is consumed with a mean annual frequency of 2.6 times per year. Considering these local practices and the results of this study, a dietary daily intake of ndl-PCBs varying from 22 to 504 ng/day with a mean of 150 ng/day could be estimated. According to the TDI value noted above, the risk seems to be moderate for an adult consumer but exists for the most sensitive populations.

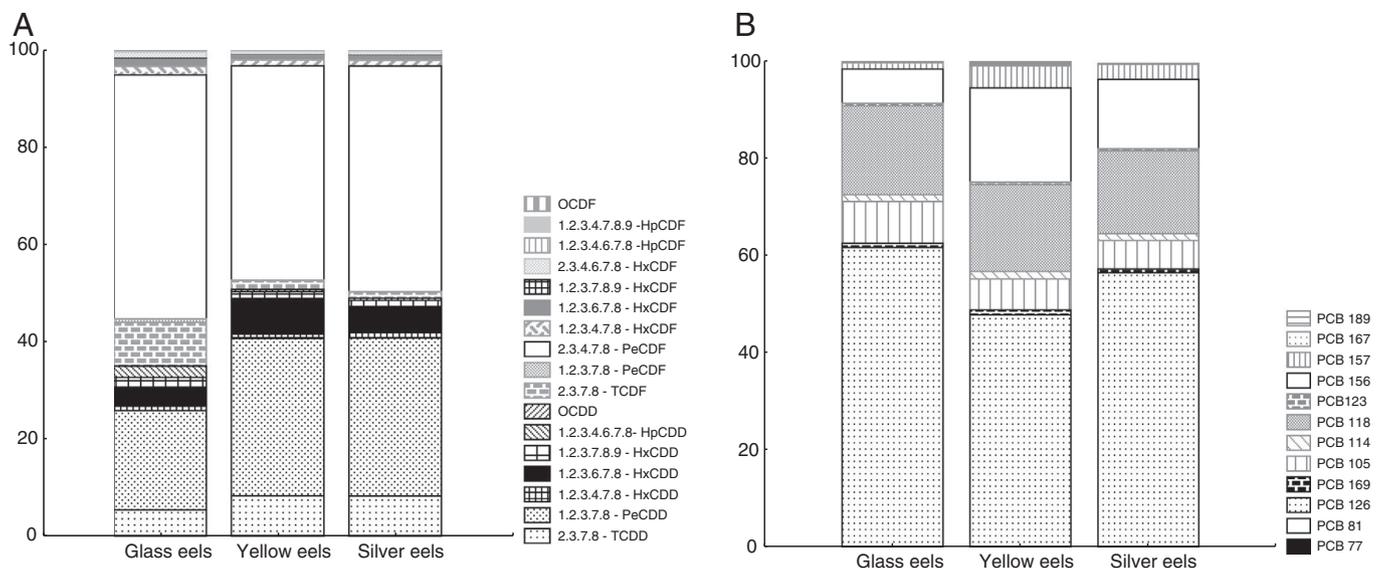


Fig. 4. Distributions of the PCDD/F (A) and dl-PCB congeners (B) ( $\text{pg WHO}_{1998} \text{TEQ g}^{-1} \text{ww}$ ), according to the life stage.

#### 4. Conclusion

This study gives a first assessment of the PCB and PCDD/F contamination of a European eel population fraction from the Loire estuary, along a hundred-km long portion of this ecosystem. The quantitative and qualitative contents of PCBs and PCDD/Fs in eel filets are different depending on their life stage and the sampling sites. The eels sampled in the site next to Nantes (the most important city of the estuary) appeared more contaminated than the two other sites, i.e. Varades (small city under agricultural pressure) and Cordemais (a town hosting a coal-fired power station). Regarding the PCB profiles, the sampled sites of Varades and Nantes could be associated to urban influences whereas the presence of PCB sources could be noticed around Cordemais site. Compared to other international or national areas, the contamination level of eels from the Loire estuary was low regarding PCDD/Fs but intermediate for dl and ndl-PCBs. A potential exposure to PCBs through eel consumption, and especially with silver eels, was noticed. According to the French TDI value (French Food Safety Agency, 2010), the consumption should be limited to once per month for the general population and once every two months for the most sensitive people.

The comparison of eel biomonitoring studies highlighted heterogeneity in sampled individuals. In order to better correlate all studies at the international level, it appears to be necessary to standardize parameters such as age, length, sex and sexual maturation stage. To preserve this endangered species and as recommended by scientists (Van Ginneken et al., 2009), the environmental quality of its habitats should be restored and protected. Considering our results, the European eels from the Loire estuary appeared moderately contaminated compared to eels from other major international estuaries, suggesting a moderate PCB and PCDD/F contamination of the Loire estuarine system. This state of moderate contamination of the Loire estuary should be maintained in order to preserve genitors of the eel's population.

#### Acknowledgments

The authors want to express their special thanks to the region Pays de la Loire and the AADPPMFEDLA (Association Agréée Départementale des Pêcheurs Professionnels Maritimes et Fluviaux en Eau Douce de Loire-Atlantique) for their technical and financial support and to Dr. Catherine Roullier from the University of Nantes for the English revision.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.037>.

#### References

- Adam G, Feunteun E, Prouzet P, Rigaud C. L'anguille européenne. Indicateurs d'abondance et de colonisation. Quae Savoir-Faire; 2010.
- AFSSA. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'établissement de teneurs maximales pertinentes en polychlorobiphényles qui ne sont pas de type dioxine (PCB «non dioxin-like», PCB-NDL) dans divers aliments. N°2006-SA-0305 S; 2006.
- Bargar TA, Scott GI, Cobb GP. Maternal transfer of contaminants: case study of the excretion of three polychlorinated biphenyl congeners and technical-grade endosulfan into eggs by white leghorn chickens (*Gallus domesticus*). Environ Toxicol Chem 2001;20:61–7.
- Belpaire C, Geeraerts C, Roosens L, Neels H, Covaci A. What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience. Environ Int 2011;37:354–64.
- Blanchet-Letrouvé I, Lafont A-G, Poirier L, Baloché S, Zalouk-Vergnoux A, Dufour S, et al. Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France). Ecotoxicol Environ Saf 2013;97:103–13.
- Bodiguel X, Loizeau V, Le Guellec A-M, Roupsard F, Philippon X, Mellon-Duval C. Influence of sex, maturity and reproduction on PCB and p, p'DDE concentrations and repartitions in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean). Sci Total Environ 2009;408:304–11.
- Bordajandi LR, Gomez G, Fernandez MA, Abad E, Rivera J, Gonzalez MJ. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). Chemosphere 2003;53:163–71.
- Boudet C. Evaluation de l'impact sur la santé des rejets atmosphériques des tranches charbon d'une grande installation de combustion. INERIS; 2003.
- Byer JD, Alaei M, Brown RS, Lebeuf M, Backus S, Keir M, et al. Spatial trends of dioxin-like compounds in Atlantic anguillid eels. Chemosphere 2013;91:1439–46.
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Souissi S, Lardy S, Augagneur S, Budzinski H. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: alkylphenol-polyethoxylates. Chemosphere 2007;70:281–7.
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Peluhet L, LeMenach K, Souissi S, Budzinski H. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. Environ Pollut 2009;157:64–71.
- Canapa A, Barucca M, Celeste A, Olmo E, Regoli F. Preliminary investigations on vitellogenin m-RNA induction in some bioindicator Mediterranean fish species. Mar Environ Res 2002;54:673–7.
- Cariou R, Marchand P, Vénisseau A, Brosseau A, Bertrand D, Qannari EM, et al. Prediction of the PCDD/F and dl-PCB 2005-WHO-TEQ content based on the contribution of six congeners: toward a new screening approach for fish samples? Environ Pollut 2010;158:941–7.
- Castonguay M, Hodson P, Moriarty C, Drinkwater K, Jessop B. Is there a role of ocean environment in American and European eel decline? Fish Oceanogr 1994;3:197–203.
- Corsi I, Mariottini M, Badesso A, Caruso T, Borghesi N, Bonacci S, et al. Contamination and sub-lethal toxicological effects of persistent organic pollutants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). Hydrobiologia 2005;550:237–49.

- Daouk T, Larcher T, Rounsard F, Lyphout L, Rigaud C, Ledevin M, et al. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquat Toxicol* 2011;105: 270–8.
- Dauvin J-C. The main characteristics, problems, and prospects for Western European coastal seas. *Mar Pollut Bull* 2008;57:22–40.
- Daverat F, Tapie N, Quiniou L, Maury Brachet R, Riso R, Eon M, et al. Otolith microchemistry interrogation of comparative contamination by Cd, Cu and PCBs of eel and flounder, in a large SW France catchment. *Estuar Coast Shelf Sci* 2011;92:332–8.
- De Boer J, Dao QT, Van Leeuwen SPJ, Kotterman MJJ, Schobben JHM. Thirty year monitoring of PCBs, organochlorine pesticides and tetrabromodiphenylether in eel from The Netherlands. *Environ Pollut* 2010;158:1228–36.
- Dekker W. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fish Manage Ecol* 2003;10:365–76.
- Després L. L'estuaire de la Loire: un territoire en développement durable? Presses Universitaires de Rennes; 2009.
- Durif C, Dufour S, Elie P. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J Fish Biol* 2005;66:1025–43.
- Eggleton J, Thomas KV. A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environ Int* 2004;30:973–80.
- Elie P, Lecomte-Finiger R, Cantrelle I, Charlon N. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*anguilla* sp. (poisson téléostéen anguilliforme). *Vie et Milieu* 1982;32:149–57.
- European Union. CR. no 1259/2011 of 2 December 2011 amending regulation (EC) no 1881/2006 as regards maximum levels for dioxins, dioxin-like PCBs and non dioxin-like PCBs in foodstuffs; 201118–23.
- Ferrante M, Clausi M-T, Meli R, Fusco G, Naccari C, Lucisano A. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Garigliano River (Campania region, Italy). *Chemosphere* 2010;78:709–16.
- Feunteun E. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecol Eng* 2002;18:575–91.
- French Food Safety Agency. Opinion of the French Food Safety Agency on interpreting the health impact of PCB concentration levels in the French population; 2010.
- French Food Safety Agency. Étude nationale d'imprégnation aux polychlorobiphényles des consommateurs de poissons d'eau douce; 2011.
- Fulton TW. The rate of growth of fishes. 22nd annual report of the Fishery Board of Scotland; 1904. p. 141–241.
- Geeraerts C, Belpaire C. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 2010;19:239–66.
- Geeraerts C, Focant JF, Eppe G, De Pauw E, Belpaire C. Reproduction of European eel jeopardised by high levels of dioxins and dioxin-like PCBs? *Sci Total Environ* 2011;409:4039–47.
- GIP. Dynamique du bouchon vaseux dans l'estuaire de la Loire. Nantes: Rencontre autour du bouchon vaseux - GIP Loire estuaire; 2010.
- Gravato C, Guimaraes L, Santos J, Faria M, Alves A, Guilhermino L. Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). *Ecotoxicol Environ Saf* 2010;73:524–33.
- Grosbois C, Meybeck M, Lestel L, Lefèvre I, Moatar F. Severe and contrasted polymetallic contamination patterns (1900–2009) in the Loire River sediments (France). *Sci Total Environ* 2012;435–436:290–305.
- Gutleb AC, Appelmann J, Bronkhorst MC, Van den Berg JHJ, Spenkelink A, Brouwer A, et al. Delayed effects of pre- and early-life time exposure to polychlorinated biphenyls on tadpoles of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Environ Toxicol Pharm* 1999;8:1–14.
- Gutleb AC, Mossink L, Schriks M, Van den Berg JHJ, Murk AJ. Delayed effects of environmentally relevant concentrations of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) and non-polar sediment extracts detected in the prolonged-FETAX. *Sci Total Environ* 2007;381:307–15.
- Haenen OLM, Lehmann J, Engelsma MY, Stürenberg FJ, Roozenburg I, Kerkhoff S, et al. The health status of European silver eels, *Anguilla anguilla*, in the Dutch River Rhine watershed and Lake IJsselmeer. *Aquaculture* 2010;309:15–24.
- Hubaux N, Perceval O. Pollution des milieux aquatiques par les PCBs en France. PCB dans les milieux aquatiques: enjeux de gestion et lacunes dans les connaissances. ONEMA; 2011. p. 52.
- ICES. Report of the 18th session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels (WGEEI); 2006 (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and International Council for the Exploration of the Sea (ICES), Rome/Italy), 23–27 January).
- Karl H, Bladt A, Rottler H, Ludwigs R, Mathar W. Temporal trends of PCDD, PCDF and PCB levels in muscle meat of herring from different fishing grounds of the Baltic Sea and actual data of different fish species from the Western Baltic Sea. *Chemosphere* 2010;78: 106–12.
- Knutzen J, Bjerkgeng B, Næs K, Schlabach M. Polychlorinated dibenzofurans/dibenzo-p-dioxins (PCDF/PCDDs) and other dioxin-like substances in marine organisms from the Grenland fjords, S. Norway, 1975–2001: present contamination levels, trends and species specific accumulation of PCDF/PCDD congeners. *Chemosphere* 2003;52: 745–60.
- Kodavanti PRS, Curras-Collazo MC. Neuroendocrine actions of organohalogenes: thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Front Neuroendocrinol* 2010;31:479–96.
- Maes J, Belpaire C, Goemans G. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environ Pollut* 2008;153: 223–37.
- Marchand J, Quiniou L, Riso R, Thebaut M-T, Laroche J. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat Toxicol* 2004;70:327–43.
- McHugh B, Poole R, Corcoran J, Anninon P, Boyle B, Joyce E, et al. The occurrence of persistent chlorinated and brominated organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Irish waters. *Chemosphere* 2010;79:305–13.
- Melià P, Bevacqua D, Crivelli AJ, Panfili J, De Leo GA, Gatto M. Sex differentiation of the European eel in brackish and freshwater environments: a comparative analysis. *J Fish Biol* 2006;69:1228–35.
- Mezzetta S, Cirilini M, Ceron P, Teclanu A, Caligiani A, Palla G, et al. Concentration of DL-PCBs in fish from market of Parma city (north Italy): estimated human intake. *Chemosphere* 2011;82:1293–300.
- Moriarty C, Dekker W. Management of the European eel. *Fish Bull* 1997;15:110.
- Motelay-Massei A, Ollivon D, Garban B, Teil MJ, Blanchard M, Chevreuil M. Distribution and spatial trends of PAHs and PCBs in soils in the Seine River basin, France. *Chemosphere* 2004;55:555–65.
- Nunes M, Marchand P, Vénisseau A, Bizet BL, Ramos F, Pardal MA. PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in sediment and biota from the Mondego estuary (Portugal). *Chemosphere* 2011;83:1345–52.
- Oliveira Ribeiro CA, Vollaie Y, Coulet E, Roche H. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve – France. *Environ Pollut* 2008;153:424–31.
- ONEMA. Les données du plan national d'action PCB. <http://www.pollutions.eaufrance.fr/pcb/resultats-xls.html>, 2012.
- Palstra AP, Van Ginneken VJT, Murk AJ, Van den Thillart GEEJM. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 2006;93:145–8.
- Palstra AP, Curiel D, Fekkes M, de Bakker M, Székely C, Van Ginneken V, et al. Swimming stimulates oocyte development in European eel. *Aquaculture* 2007a;270: 321–32.
- Palstra AP, Heppener DFM, Van Ginneken VJT, Svakely C, Van den Thillart GEEJM. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *J Exp Mar Biol Ecol* 2007b;352:244–56.
- Quadroni S, Galassi S, Capoccioni F, Cicotti E, Grandi G, De Leo G, et al. Contamination, parasitism and condition of *Anguilla anguilla* in three Italian stocks. *Ecotoxicology* 2013;22:94–108.
- Robinet TT, Feunteun EE. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* 2002;11:265–77.
- Roche H, Buet A, Jonot O, Ramade F. Organochlorine residues in European eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccarès lagoon (French National Nature Reserve of Camargue) – effects on some physiological parameters. *Aquat Toxicol* 2000;48:443–59.
- Roosens L, Geeraerts C, Belpaire C, Van Pelt I, Neels H, Covaci A. Spatial variations in the levels and isomeric patterns of PBDEs and HBCDs in the European eel in Flanders. *Environ Int* 2010;36:415–23.
- Santillo D, Johnston P, Labunska I, Brigden K. Swimming in chemicals widespread. Presence of brominated flame retardants and PCBs in eels (*Anguilla anguilla*) from rivers and lakes in 10 European countries. Technical note. Greenpeace International; 2005.
- Stachel B, Christoph EH, Götz R, Herrmann T, Krüger F, Kühn T, et al. Dioxins and dioxin-like PCBs in different fish from the river Elbe and its tributaries, Germany. *J Hazard Mater* 2007;148:199–209.
- Szlinger-Richert J, Usydus Z, Pelczarski W. Organochlorine pollutants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) from Poland. *Chemosphere* 2010;80:93–9.
- Tapie N, Le Menach K, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. *Chemosphere* 2011;83:175–85.
- Tesch FW, White RJ. The eel. Oxford: Blackwell Science; 2003.
- Thillart G, Dufour S, Rankin JC, Palstra A. Artificial maturation and reproduction of the European eel. Spawning migration of the European eel. Netherlands: Springer; 2009.
- Tulonen J, Vuorinen PJ. Concentrations of PCBs and other organochlorine compounds in eels (*Anguilla anguilla*, L.) of the Vanajavesi watercourse in southern Finland, 1990–1993. *Sci Total Environ* 1996;187:11–8.
- Turner A. Salting out of chemicals in estuaries: implications for contaminant partitioning and modelling. *Sci Total Environ* 2003;314–316:599–612.
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld AT, Brunström B, Cook P, Feeley M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* 1998;106:775–92.
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, et al. The 2005 World Health Organization re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci* 2006;93:223–41.
- Van der Oost R, Opperhuizen A, Satumalay K, Heida H, Vermeulen NPE. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat Toxicol* 1996;35:21–46.
- Van Ginneken V, Palstra A, Leonards P, Nieveen M, Van den Berg H, Flik G, et al. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquat Toxicol* 2009;92:213–20.
- Verreault J, Villa RA, Gabrielsen GW, Skaare JU, Letcher RJ. Maternal transfer of organohalogen contaminants and metabolites to eggs of arctic-breeding glaucous gulls. *Environ Pollut* 2006;144:1053–60.
- Voltura MB, French JB. Effects of dietary polychlorinated biphenyl exposure on energetics of white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*. *Environ Toxicol Chem* 2000;19: 2757–61.

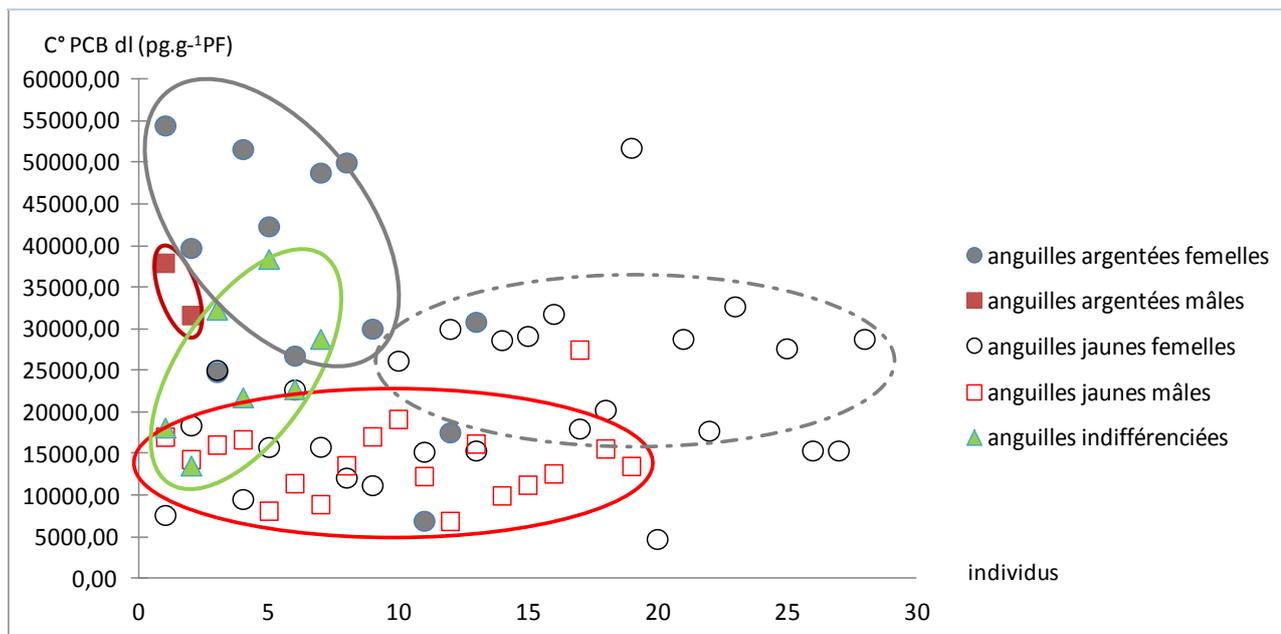
## En conclusion

A partir des analyses chimiques conduites sur les anguilles, le chapitre présent a permis de mettre en évidence une contamination significative des organismes en PCB, PCDD et PCDF, quelle que soit la classe de taille, avec des concentrations obtenues qui restent cependant globalement en dessous des teneurs maximales autorisées par la Commission Européenne et plus faibles que celles observées dans d'autres estuaires, comme celui de la Gironde (Tapie et al. 2011). Les organismes peuvent être exposés *via* différentes voies sans préjuger de l'une par rapport à l'autre; cependant, de par son mode de vie et son cycle reproductif très spécifique (l'anguille ne se reproduit qu'une seule fois en mer et meurt ensuite), l'anguille est particulièrement exposés *via* les sédiments, la quasi-totalité de sa vie (l'âge moyen évalué des génitrices sur la fraction de population étudiée étant de 19 ans, celui des géniteurs de 9 ans). Les civelles présentent en outre un profil de PCB différent de ceux obtenus pour les autres stades de développement, caractérisé par les PCB les plus légers et soulignant une différence dans les voies de bioaccumulation.

Une différence a été observée entre PCB dl et ndl, avec des niveaux de concentrations mille fois plus élevés pour les PCBs ndl, mais qui ne présument pas d'une toxicité plus accrue. Compte tenu de leur différence de mécanisme d'action au niveau des récepteurs nucléaires et membranaires, les PCB dl et ndl entraînent des réponses différentes quant à leur toxicité vis-à-vis des organismes étudiés (Tapie et al. 2011).

En complément aux résultats présentés dans l'article 1, les niveaux de contamination en PCB dl ( $\text{ng.g}^{-1}$  PF) de la totalité de la population échantillonnée est présentée en figure 44, en ciblant les sexes et les stades de développement sexuel. Des groupes apparaissent clairement en fonction de leur genre et de leur degré de maturité sexuelle. Globalement, les mâles jaunes apparaissent les moins contaminés, tandis que les femelles jaunes sont une à trois fois plus contaminées que les mâles jaunes. Le fait majeur est la contamination jusqu'à 10 fois supérieure des anguilles argentées bien qu'il existe une forte variabilité individuelle.





**Figure 43:** Niveaux de contamination des anguilles échantillonnées en PCB dl en  $\text{pg.g}^{-1}$  de poids frais (PF), en fonction du sexe et des stades de développement

Par comparaison avec les niveaux de contamination d'autres anguilles européennes provenant d'autres estuaires (Tapie et al. 2011; Daverat et al. 2011), il apparaît des caractéristiques propres à l'estuaire de la Loire en ce qui concerne la répartition des organismes par sexe et classe de taille, pouvant s'expliquer par l'hydrodynamisme de l'estuaire de la Loire, et en particulier la présence du bouchon vaseux, et à différentes sources de pollution (GIP Loire estuaire 2014). La qualité du réseau trophique et de ses variations selon les saisons, peut aussi entrer en ligne de compte.



Pour résumer,

### IMPREGNATION par les PCB

- La contamination en PCB augmente significativement de la civelle (3,71 et 15,2 ng.g<sup>-1</sup>PS) aux autres stades de vie (pour les anguilles jaunes: 62,8 et 382 ng.g<sup>-1</sup> PS; pour les anguilles argentées: 93,7 et 463 ng.g<sup>-1</sup> PS, respectivement pour les PCB dl et ndl).
- Comparaison inter-site: un effet « estuaire » probable, basé sur les niveaux de contamination et les profils de PCB.
- Une variabilité individuelle marquée
- Des civelles faiblement contaminées et présentant un profil caractérisé par les PCB faiblement chlorés
- Teneurs proches de la teneur maximale autorisée par l'OMS en OMS-TEQ PCDD/F + PCB dl /g de PF



# PARTIE 5

## *Des effets potentiels des contaminants sur la fonction de reproduction chez *Anguilla anguilla**



## I. INTRODUCTION

L'exposition à des molécules de type PE a été mise en évidence par le biais des sédiments échantillonnés en estuaire de Loire.

Parallèlement, la matrice musculaire des anguilles, analysée afin de détecter la présence ou non de PCB et PCDD/F, a révélé une imprégnation en fonction des classes de taille.

Qu'en est-il des effets potentiels sur la fonction de reproduction de l'anguille européenne, organisme "sentinelle" de notre étude?

Notre objectif étant d'évaluer une éventuelle perturbation ou dysfonctionnement de la fonction de reproduction, les gonades des anguilles ont été investiguées histologiquement, après avoir déterminé le sexe des organismes de façon microscopique. Les coupes histologiques des gonades ont permis de valider le genre des anguilles, et de préciser le niveau de maturation des gonades chez les femelles et les mâles (Beullens et al. 1997a). Des anomalies telles que des nécroses, la présence de cellules femelles chez des mâles différenciés, ou des tailles ovocytaires anormales ont été recherchées (Huertas et al. 2006).

L'anguille est un indicateur intéressant pour évaluer la contamination en PCB (de Boer et al. 2010) en raison de son statut de carnassière et de son comportement dans les sédiments où elle s'enfouit; elle accumule donc de nombreux résidus chimiques. Comme l'anguille est exposée en estuaire de la Loire à des sédiments contaminés par différents composés à activité oestrogénique ou androgénique, des effets de perturbations endocrines sont suspectés. De l'intersexe a d'ailleurs été signalé chez la Scrobiculaire (Fossi Tankoua et al. 2012) au sein de l'estuaire..

La vitellogénine étant un biomarqueur reconnu de perturbation endocrine (Multigner et Kadhel 2008; Hiramatsu et al. 2005), cette lipoprotéine a été recherchée dans nos échantillons d'anguilles. Cependant, en raison d'un niveau de stéroïdes circulant très faible, Peyon et al. (1993 et 1997) observent que les concentrations plasmatiques en Vg varient de valeurs indétectables à  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , en conditions *in vitro*.

Dans le milieu naturel, malgré une exposition conséquente à des contaminants, des études belges (Versonnen et al. 2004) n'ont observé aucune indication d'effets oestrogéniques sur les anguilles jaunes européennes, bien qu'elles soient apparues sensibles aux xéno-œstrogènes.

L'investigation de la Vg a donc été réalisée sur ces cellules hépatiques dans le but d'extraire, puis d'amplifier les gènes exprimant la Vg. Cette technique de polymérisation en chaîne d'ARN m de Vg (ou Quantitative real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction: RT PCR) est plus



sensible que les techniques immunologiques, et a été validée par d'autres auteurs en conditions expérimentales (Pierron et al. 2009; Weltzien et al. 2009; Aroua et al. 2007).

L'article 2 suivant, présente, d'une part, la validation de l'outil q RT PCR pour la mise en évidence de l'expression de la Vg chez l'anguille européenne, et d'autre part, la quantification de l'expression de la Vg sur les anguilles prélevées en estuaire de la Loire et exposées à des contaminants potentiellement PE.

L'article sera complété par des résultats relatifs à l'expression d'une enzyme clé de la synthèse des oestrogènes, l'aromatase (Arom), en utilisant la même méthode analytique.

Cette enzyme, généralement exprimée dans le cerveau et les gonades, a été investiguée dans les cellules hépatiques, afin de quantifier son expression dans des cellules relativement aisées à prélever et à cultiver.

D'autre part, le succès reproductif étant indissociable des échanges métaboliques entre muscles et gonades, l'imprégnation de ces deux matrices a été investiguée en fonction du stade de développement et de l'âge des individus prélevés, afin d'évaluer les transferts potentiels de contaminants lors de la maturation sexuelle et de la reproduction.

Les résultats de ce travail vous sont présentés dans l'Article 3 soumis au journal *Aquatic Toxicology*.



II. Article 2 "Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire Estuary (France)" paru dans *Ecotoxicological and Environmental Safety*

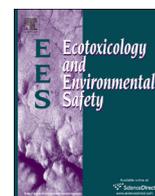




ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)

## Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France)



Isabelle Blanchet-Letrouvé<sup>a,\*</sup>, Anne-Gaëlle Lafont<sup>b</sup>, Laurence Poirier<sup>a</sup>,  
Sylvie Baloché<sup>b</sup>, Aurore Zalouk-Vergnoux<sup>a</sup>, Sylvie Dufour<sup>b</sup>, Catherine Mouneyrac<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Université de Nantes, MMS, EA 2160, 9 rue Bias, F-44035 Nantes, France

<sup>b</sup> Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR BOREA, UPMC, CNRS 7208, IRD 207, 7 rue Cuvier, CP 32, F-75231 Paris, France

<sup>c</sup> UCO, MMS, EA 2160, F-49000 Angers, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 December 2012

Received in revised form

25 June 2013

Accepted 13 July 2013

Available online 30 August 2013

#### Keywords:

European eel

Vitellogenin

Biomarkers

q RT PCR

### ABSTRACT

Estuarine zones are extremely fragile due to increasing stress from anthropogenic activities. Among those, the Loire estuary (France) is potentially exposed to various contaminants including Endocrine Disruptors Compounds (EDCs) able to impact the reproduction physiology of fish. The European eel (*Anguilla anguilla*), endangered fish species, is apparently not relevant, in its yellow stage, to monitor the effects of endocrine disruption. Despite this weakly responsiveness, this study aimed to investigate whether European eel from the Loire estuary may still be the subject of estrogenic disruption quantifying the hepatic Vg gene expression according to gender and sexual stage. Vitellogenin (Vg) appears as a valuable biomarker of EDCs, as well as for exposure and effects. Quantitative real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (q RT PCR) was used in this study to amplify responses of hepatic Vg transcripts. European eels were sampled in May 2009 ( $N=57$ ) and November 2010 (during the downstream migration,  $N=10$ ) in two sites of the Loire estuary with different ecological conditions and contamination pressures (upstream: Varades; downstream: Nantes). Reproductive (gender, sexual maturity stage) and biometric parameters of collected eels were determined. A laboratory exposure of silver male to steroid hormones (Testosterone (T), 11-KetoTestosterone (11-KT), Estradiol (E2)) was conducted in parallel to validate the q RT PCR approach on hepatic Vg mRNA. Results demonstrated the responsiveness of exposed silver male eels, since hepatic mRNA Vg induction was observed in E2 treated males compared to control specimens. In the field, results of female silver eels reflected large inter-individual differences in the activation of hepatic Vg at silvering. However, while only female silver eels should express hepatic Vg mRNA, quantifiable levels were also detected in a proportion of 38% of the other individuals sampled, normally not inclined to express it, those being undifferentiated eels, yellow females, yellow and silver males. According to each sexual stage, no difference of expression was observed between eels from the two sampling sites. Histological results as well as low Vg mRNA levels detected do not permit a conclusion as to a potential effect of endocrine disruption.

© 2013 Published by Elsevier Inc.

### 1. Introduction

Estuaries represent ecosystems of high productivity and are crucial in the life histories of many fish, invertebrates, birds, etc. (Mc Lusky, 1989). However, estuarine zones are extremely fragile due to increasing stress from anthropogenic activities. Thereby, complex mixtures of contaminants can enter the aquatic environment via effluents or surface runoff, and thus aquatic organisms such as fish are inevitably exposed. Among estuarine fish species, European eels (*Anguilla anguilla*) are in dramatic decline (Dekker, 2003; Robinet

and Feunteun, 2002). Overfishing, climate change, habitat reduction and numerous hydraulic barriers to the downstream and upstream migrations, diseases and parasitic infection can in part explain this decline (Dekker, 2003; Elie and Girard, 2009). In addition, this fatty species is characterized by a high bioaccumulation potential for organic pollutants such as Endocrine Disrupting Compounds (EDCs), which may impair eel reproduction and further threaten their population (Geeraerts and Belpaire, 2010) or heavy metals (Pierron et al., 2008a). In this context, there is a growing interest to study the influence of EDCs on biota physiology. Numerous natural and/or chemical compounds can exert endocrine disruptions and the European Community has established a list of more than 500 known or suspected EDCs (Santos et al., 2010). For example, Polychlorobiphenyls (PCBs), dioxin like

\* Corresponding author.

E-mail address: [isabelle.blanchet-letrouve@ac-nantes.fr](mailto:isabelle.blanchet-letrouve@ac-nantes.fr) (I. Blanchet-Letrouvé).

compounds (PCDDs, PCDFs), organochlorine pesticides, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), alkylphenols, and also plasticizers such as phthalates, are recognized as EDCs which could affect sexual maturation, reproduction and development of organisms living in impacted environments as reviewed by van der Oost et al. (2003). Even if the cause-effect relationship is difficult to establish due to the complexity of the endocrine system and the diversity of modes of action of EDCs, their negative influence has been reported in fish from different countries (Hinfray et al., 2010; Jobling et al., 2005).

So far, different techniques revealing exposure to EDCs, especially in aquatic organisms, have been developed. Among them, vitellogenin (Vg) which is a female-specific yolk protein precursor and energy reserve of eggs in oviparous vertebrates appears as an excellent and valuable biomarker, as well as for both exposure and effects (Matozzo et al., 2008). Vg is synthesized, lipidated, phosphorylated and glycosylated in the liver; then, it is released into the blood and taken up by the oocytes through specific receptors (Barucca et al., 2006). Mature females produce Vg in response to the hormone 17  $\beta$ -estradiol, while males and juveniles do not normally produce Vg. So, its presence in males, undifferentiated eels or juveniles is largely used as a specific biomarker for endocrine disruption in the aquatic environment in Teleost fish (van der Oost et al., 2003). Different methods such as Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) and Radio Immuno Assay (RIA) allow the Vg quantification in Teleosts but these assays are limited in their use due to the need for species-specific antibodies. Among the Teleosts, the European eel is characterized by weak plasma Vg levels often undetectable in individuals from the field. This is the result of its peculiar biological life cycle and its gonochoristic and semelparous status. Thus, at proteomic level, low responses to estrogenic exposure have been reported in yellow eels by several authors whichever exposure of organisms, in the field or in vivo, and whatever the technique used to measure Vg (ELISA, RIA) (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal, 1991a; Burzawa-Gerard et al., 1991b; Versonnen et al., 2004). Their low responsiveness led several authors to conclude that yellow eels are not suitable sentinels for estrogenic endocrine disruption (for review: Geeraerts and Belpaire, 2010). However, at the transcriptomic level, several studies underlying that the use of eels as bioindicator species of estrogenic exposure is progressively increasing (Barucca et al., 2006; Gorbi and Regoli, 2005). Indeed, Vg mRNA could be detected by PCR in subadult yellow *A. anguilla* injected with 17- $\beta$  estradiol, confirming their responsiveness to estrogenic EDCs (Barucca et al., 2006). This approach could be more promising than the proteomic level to evaluate EDCs exposure in yellow eels. Furthermore, hepatic Vg mRNA expression already appeared as a suitable approach, in other fish species, since levels of mRNA rise rapidly following Vg gene induction, revealing recent exposure to estrogenic contaminants (Bowman et al., 2000).

In this context, the aim of the present study was to quantify the hepatic Vg gene expression in European eels from the Loire estuary according to gender and sexual stage and to validate the method of the q RT PCR for this evaluation. The Loire estuary runs through important urban sites (Nantes, Saint-Nazaire) with shipping, industrial and agricultural activities. Moreover, the Loire basin (117,800 km<sup>2</sup>) represents more than 1/5 of the French territory and drains many tributaries. This estuary displays a diffusive pollution including a mixture of contaminants such as heavy metals, pesticides, PAHs and PCBs (Marchand et al., 2004; Robbe et al., 1985). Yellow and silver eels were sampled at two locations, downstream and upstream of the estuary. A set of biometrical measurements was applied to characterize the morphological and physiological stages of sampled eels according to Durif et al. (2005). The hepatic Vg gene expression was evaluated

in each individual using quantitative real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (q RT PCR) method to ensure a highly sensitive detection of these transcripts. Histological analyses of gonads were also performed to determine the sex and the maturation stage of all sampled fish and eventually to detect abnormalities. In addition, in vivo experimental exposure of male silver eels to various steroid hormones (Testosterone, T; 11-Ketotestosterone, 11-KT;  $\beta$ -Estradiol, E2) was performed to validate the estrogenic specificity of Vg mRNA induction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Field sampling

European eels were caught by local fishermen in the Loire estuary located on the French Atlantic coast. Two sampling sites were selected: Varades (399 155.06-6709048.78) corresponding to the upstream site at the salinity limit, and Nantes (299 429.87-6694726.54), the downstream site, located at 100 km and 50 km from the open sea, respectively (Fig. 1). The Nantes site corresponds mainly to an industrial harbor and urban zone including two incineration factories (Agence de l'eau Loire-Bretagne, 2012) whereas the Varades site is under agriculture pressure. Eels were randomly collected using fyke nets at both sampling sites (Varades,  $n=27$ ; Nantes,  $n=30$ ) in May 2009. In addition, during the downstream run in November 2010, migrant eels ( $n=10$ ) with apparent silver coloration skin were caught with stow nets.

After collection, eels were transported to the laboratory in aerated 200 L tanks containing water from the collection site. At the laboratory, they were maintained in a natural photoperiod (L15/D9) and temperature of  $12 \pm 2$  °C, within the range of the fishing site temperatures.

The purpose of the experimental design of the 2 sampling sites was to compare the two different ecological conditions and contamination pressures according to the Vg mRNA expression. Indeed, even though the European eels can travel long distances, it could suggest that they could settle in a favorable terms area as well. The sampling at 2 locations distant from 50 km and under different pressures permit to evaluate the site effect potentially linking to exposure differences. Indeed, higher levels of persistent organic pollutants such as non dioxin like PCB (congeners # 28, 52, 101, 138, 153 and 180) were observed in yellow eels from the Nantes site (mean of  $534 \pm 203$  ng g<sup>-1</sup> dw) compared to those of the Varades site (mean of  $240 \pm 60.6$  ng g<sup>-1</sup> dw) (Blanchet-Letrouvé et al., 2013). Furthermore, Couderc et al. (2013) showed higher polybrominated diphenyl ether (PBDE) and perfluorinated compound (PFC) levels in eels from Nantes ( $\Sigma$ PBDEs =  $12.9 \pm 6.15$  ng g<sup>-1</sup> dw and  $\Sigma$ PFCs =  $123 \pm 104$  ng g<sup>-1</sup> dw) than individuals from Varades ( $\Sigma$ PBDEs =  $2.18 \pm 2.28$  ng g<sup>-1</sup> dw and  $\Sigma$ PFCs =  $88.4 \pm 71.9$  ng g<sup>-1</sup> dw).

Animal manipulations were performed according to the guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. Eels were anaesthetized in a 10 L water bath to which was added 1.5 or 2 mL of clove oil solution dissolved in ethanol (70%), in function of water temperature and eel size (Palstra et al., 2007).

### 2.2. Morphometric and biometric parameters

Eel body length (mm) and weight (g) were measured. A sample (around 50 mg) of liver was quickly dissected with sterile scalpel on RNase free drainboard, stored in sterile Eppendorff containing 1 mL of RNA Later solution (Ambion Inc., Austin, TX, USA), and kept frozen at  $-20$  °C until extraction.

Gonads and digestive tract were removed delicately and three pieces from the anterior, medium and posterior sections of the gonads were fixed in Bouin solution for histological analysis. Pectoral fin length (PFL mm), horizontal (EDh mm) and vertical eye diameters (EDv mm) on both eyes, were measured using a digital calliper. The following indices were calculated according to Pankhurst and Lythgoe (1983):

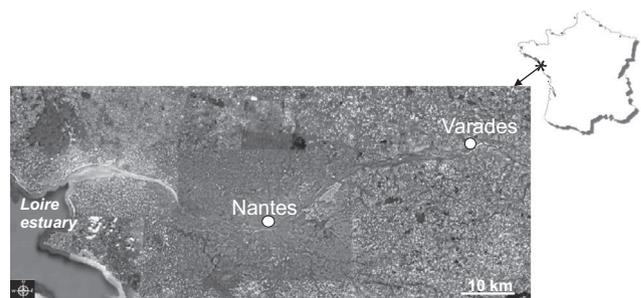


Fig. 1. Collection sites.

Ocular Index:  $OI = 100 \times (((EDh + EDv) \times 0.25)^2 \times (10 \times BL)^{-1})$   
 Gonado Somatic Index:  $GSI = 100 \times (\text{gonad weight} \times (\text{total BW})^{-1})$   
 Pectoral Fin Index:  $PFI = 100 \times (PFL \times (\text{total BL})^{-1})$   
 Digestive Tract Index:  $DTI = 100 \times (\text{digestive tract weight} \times (\text{total BW})^{-1})$

Using the biometric data of the studied organisms, a condition factor K (Fulton Index) was calculated according to Ricker (1975):

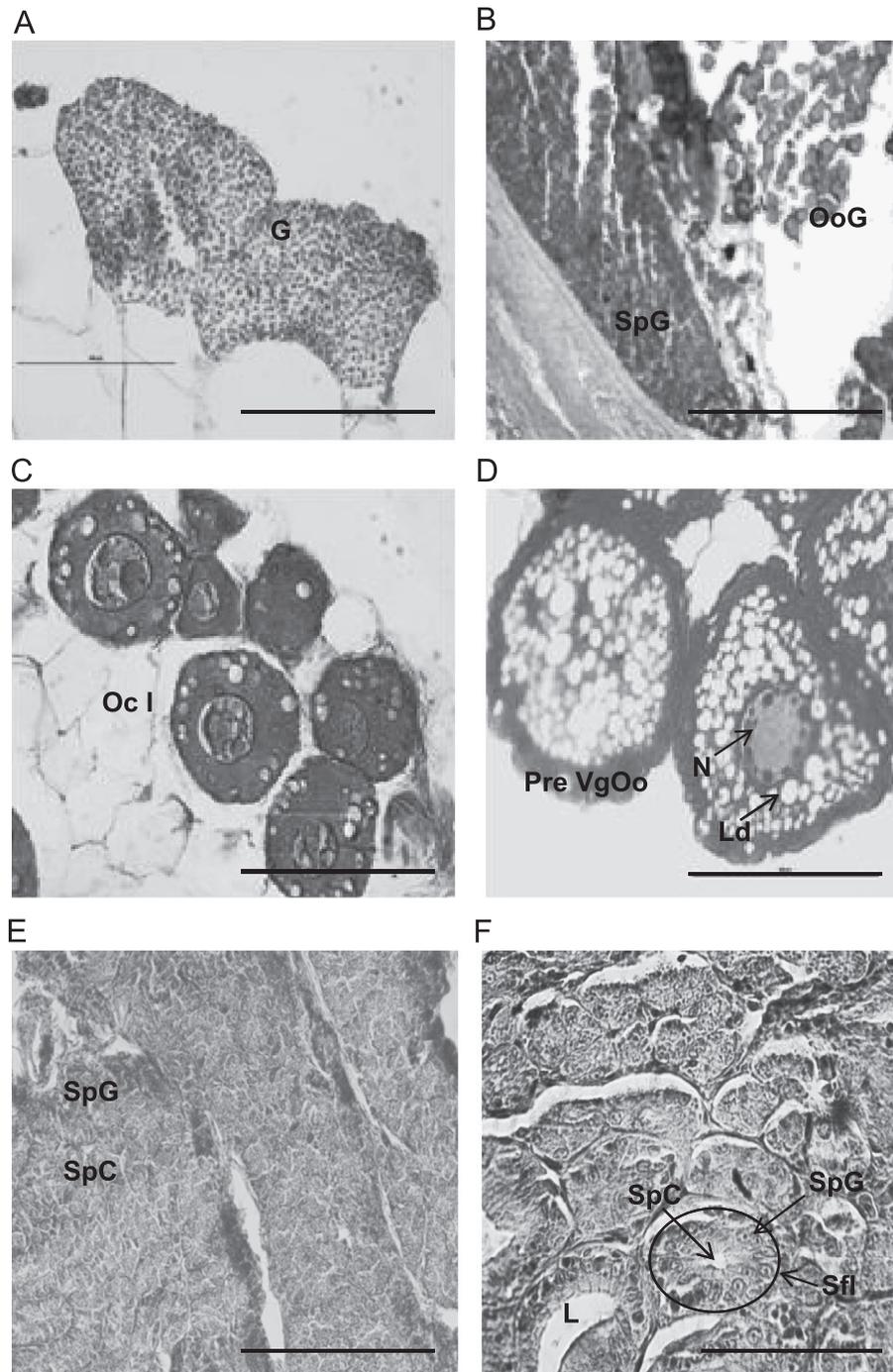
$$K = (BW \times 10^5) / BL^3$$

where BW and BL respectively expressed as g and mm. This index allows the evaluation of the health condition of eels.

The Silver Index (SI) has been calculated according to Durif et al. (2005). This index consisted of five stages for female eels, represented by stages FI and FII

(corresponding to the growth phase), stage FIII (a premigrant stage characterized by the beginning of gonad development), stage FIV (marked by the onset of the starvation and the gonadotropin production) and stage FV (corresponding to the digestive tract regression, pectoral fin elongation and higher gonadotropin levels, characteristic of migrating stages for female eels). Two stages were proposed for males, MI (a resident sexually undifferentiated stage) and MII (a migratory stage). This classification allows a more precise and ecological description of the stages "yellow" and "silver" and could be used for the quantification of potential spawners from a catchment basin (Durif et al., 2009).

The otoliths enabled a determination of the age (A) of the organisms according to Lecomte-Finiger (1985). The largest pair of otoliths named sagitta were removed from the eel's head. After extraction, otoliths were cleaned of all organic membranes using distilled water, dried with ethanol, and then stored in Eppendorf tubes. The otoliths were later embedded in synthetic resin (Synolithe), and then



**Fig. 2.** Photomicrographs of histological sections stained with hematoxylin and eosin of testis and ovaries from European eels of the Loire estuary. **A:** Syrski organ with gonia (G): undifferentiated eel. **B:** intersexual gonad with spermatogonia (SpG) and oogonia (OoG): undifferentiated yellow eel. **C:** Primary Oocytes (Oc I) of yellow female with few lipid droplets (Ld). **D:** growing previtellogenic oocytes (Pre VgOo): silver female. **E:** Testis at stage I with spermatogonia and spermatocytes (SpC): yellow male. **F:** Testis at stage II, silver male. N : nucleoli; L : Leydig cell; Sfl : seminiferous lobule. Scale bars: 100  $\mu$ m (A; B; C; D; F); 400  $\mu$ m (E).

polished to the nucleus with a polishing wheel (Streuers Rotopol-35) using two different grits sand paper (grade 1200 and 2400). Fine polishing was done by hand with alumina (1 µm grain) on a polishing cloth. Etching was done using 10% EDTA. A drop of this solution was applied on the mold during fifteen minutes. The otoliths were then rinsed with distilled water and stored in dry condition. Yearly increments were revealed by staining with a drop of 5% Toluidine blue on the otolith and letting it dry. Growth rings were then counted under binocular magnifier. The age of each eel was determined by the number of increments starting from the nucleus which was considered as year 1 of the eel's life. The age used in the statistical analysis was determined from three readings by three different researchers. The otolithometry was performed in partnership with the IRSTEA, Cestas, France.

### 2.3. Gonad histology

Fixed sections of gonads were dehydrated, paraffin-embedded and cut (5 µm) with a microtome. Thin sections were colored with haemalin-eosin before observation with a light microscope coupled to an image analyzer to determine gender, reproductive development stage (undifferentiated, yellow, silver) according to previous studies (Huertas et al., 2006).

Sexual gender determination and gonad stages were evaluated macroscopically and microscopically (Fig. 2). The absence of oocytes and the presence of clusters of spermatogonia were used as criterion to discriminate the male gonad from late intersexual gonads considered in this study to correspond to the undifferentiated stage.

### 2.4. In vivo steroid hormones exposure

For the steroid exposure experiment, thirty-six male European silver eels (body length (BL) 400.2 ± 3.7 mm, body weight (BW) 85.14 ± 2.40 g) were purchased from Rungis International Market, France, transferred to the laboratory (MNHN, Paris, France) and kept in running aerated freshwater tanks under natural photoperiod and temperature (15 ± 2 °C). They were not fed, as they are naturally fasting at the silver stage.

Testosterone (4-Androsten-17β-ol-3-one), 11-ketotestosterone (Teleost-specific non aromatizable androgen, 4-Androsten-17β-ol-3,11-dione) and β-Estradiol (1,3,5 [10]-Estratriene-3,17β-diol) were purchased from Sigma-Aldrich (Lyon, France).

The thirty-six male silver eels were divided into four different groups ( $n = 8-10$  per group; 4 or 5 eels per 100 L tank fitted with a water recirculation system) and acclimated during four weeks before treatment. Each eel received one perivisceral injection per week of T, 11-KT or E2 (2 µg/g BW, suspended in saline (0.9% NaCl) or of saline alone (controls) according to our previous protocol (Aroua et al., 2007). This protocol was previously used to investigate steroid feedback mechanisms on various brain and pituitary targets in eels (Aroua et al., 2007; Montero et al., 1995; Weltzien et al., 2006). This protocol and this level of injection give a stable and physiologically relevant plasma concentration (from 10 to 80 ng ml<sup>-1</sup>) of the injected steroids after 6–8 weeks. On the sixth week, eels were killed by decapitation. Liver samples were quickly removed and stored in RNA Later at -20 °C until extraction.

### 2.5. Tissue RNA extraction and cDNA synthesis

RNA extraction and cDNA synthesis were performed as previously described (Aroua et al., 2007). Total RNA from liver samples was extracted using Trizol reagent (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Samples were homogenized using the TissueLyser system (Quiagen, Hilden, Germany). Following extraction, samples were submitted to desoxyribonuclease I (Roche Ltd., Meylan, France) treatment. First strand cDNA was synthesized using 1 µg of total RNA and a Superscript III First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. cDNA was stored at -20 °C for use in q RT PCR studies.

### 2.6. Quantitative real-time PCR (q RT PCR)

Gene specific primers (Table 1) previously designed for European eel beta-actin and Vg (Pierron et al., 2009) were purchased from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany).

Quantitative assays of eel beta-actin and Vg gene expression were set up using the Light Cycler 2.0 Platform (Roche) with Light Cycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I sequence-unspecific detection kit (Roche). The PCRs were prepared with 4 µL of diluted cDNA template, 2 µL of PCR grade water, 2 µL of SYBR Green master mix and 1 µL of each forward and reverse primer (500 nM each at final concentration). q RT PCRs for both genes were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 10 min at 95 °C; then 41 cycles with 10 s at 95 °C for denaturation, 5 s at 60 °C for annealing, 10 s at 72 °C for primer extension. Directly after the amplification phase, a melting curve analysis was carried out to confirm the presence of a single PCR product. Serial dilutions of a pool of cDNAs from liver samples were used as a standard and individual samples were assayed in duplicate. Each PCR run contained a non-template control and a calibrator to adjust the assay variations. Relative expression levels were calculated as previously described (Weltzien et al., 2005). The efficiency of all primers was tested and the specificity of each reaction was assessed by melting curve analysis to ensure the presence of only one product, and by sequencing. The stability of the expression of beta-actin was checked and validated between the different groups for the in vivo experiment and according to each sexual stage for feral individuals (ANOVA,  $p$ -value ≥ 0.23). Therefore, Vg transcript levels were normalized to the reference gene (beta-actin) RNA levels. Vg/actin ratios were expressed as Arbitrary Units (AU).

### 2.7. Statistical analysis

Results from the steroid-treatment experiment are given as mean ± SD. Means were compared by Kruskal–Wallis non parametric ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test, using InStat (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Mean Vg mRNA expression of feral individuals were compared by sexual stage and sampling site using Kruskal–Wallis non parametric ANOVA. Correlations with biometric parameters were analyzed by principal component analysis. XLSTAT and STATISTICA softwares were used for these statistical analyses.

## 3. Results

### 3.1. Effect of steroid treatment on liver Vg mRNA levels in male silver eels

No mortality occurred during the five weeks of experiment. Vg transcripts were not detectable by q RT PCR in the liver of all control (saline injected) male silver eels. Low Vg mRNA levels could be detected in the liver of two T-treated males (0.5 and 1.4 AU) and one 11-KT treated male (16AU), while Vg transcripts remained undetectable in the other androgen-treated males. No significant changes in mean Vg mRNA levels were induced by T nor by 11-KT treatments (0.25 ± 0.52 and 2.08 ± 5.89 AU compared to controls 0.00 ± 0.00 AU,  $p > 0.265$  and  $p > 0.509$  respectively). In contrast, E2 treatment induced a large and significant increase in mean Vg mRNA levels (22534 ± 42142 AU;  $p < 0.0001$  compared to controls), but with striking individual variations (from undetectable levels (< 0.4 AU) to more than 120000 AU). A statistical analysis (PCA, not shown) was performed to analyze eventual relationships between Vg mRNA levels and morphometrics of the individuals, such as BL, BW, GSI, DTSI and OI but no correlation of variables could explain this variability.

### 3.2. Biometric indices, sex sexual stage and silver index of eels sampled in the Loire estuary

Sixty seven European eels were sampled in two locations of the Loire estuary (Varades and Nantes). Their BL ranged between 258

**Table 1**  
Sequences of the primers (actin and Vg) and accession number of the fragment amplified.

Gene	Primers	5'-3' Sequence	Tm (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
Actin-b	Actin-b F	AGTATTTCGCTCGGGTG	58.25	225	Aroua et al., 2007
	Actin-b R	CAGCCTTCCTCTGGGT	58.60		
Vg	Vg F	CCTACACCAGCTTACCTTATG	62.67	220	Pierron et al., 2008a, 2008b
	Vg R	CGCTGGGAGTGCGGAA	61.84		

and 1014 mm (Table 2). Among these, 30 yellow females, 4 silver females, 16 yellow males and 7 undifferentiated eels were caught in May 2009 while 8 silver females and 2 silver males were caught in November 2010 during the downstream migration. The body length of silver males was smaller than that of silver females in agreement with the strong sexual dimorphism of the species.

Sexual gender determination and gonad stages were evaluated macroscopically and microscopically (Fig. 2).

Concerning testis, the stage I corresponds to single or clusters of spermatogonia and the tubular structure appears not yet developed (Fig. 2E), whereas at stage II, clusters of spermatogonia are grouped into tubules with large luminae (Fig. 2F). In the present study, the stage I corresponds to the yellow male eels caught in May 2009, the stage II to the male silver eels running down the estuary and caught in November 2010.

At stage III, tubules have enlarged and begin to break down; lumen of some tubules are filled with spermatozoa, intertubular connective tissue is partly reduced and only spermatocytes, spermatids and spermatozoa are present. However, these maturation sexual silver stages are only known at date according to an artificial induction of gonad maturation by hormonal injections (Palstra and van den Thillart, 2009).

Concerning ovaries, several oocyte stages were observed. At stage I, the primary oocytes are present without lipid droplets whereas at the stage II, the first lipid vesicles become apparent. In the stage III, the ovary is dominated by growing oocytes with a nucleus in late perinucleolus stage of development and a first ring of lipid vesicles become apparent (Fig. 2C).

Growing oocytes become clearly previtellogenic oocytes, with lipids incorporated in vesicles; these lipid droplets cover less than 50% of the cytoplasm and form a complete ring around the circumference of the developing oocyte. This stage is more and less evolved and could be observed for yellow female individuals. Later, the oocyte diameter enlarges (100–200 µm) and the whole cytoplasm was recovered by lipid vesicles. These early vitellogenic oocytes have a nucleus with numerous nucleoli, a granulosa and a theca and could be observed for silver female eels (Fig. 2D). The stage IV corresponds to the Vg incorporation in oocytes, which cannot be observed in individuals collected in the framework of this study as it is supposed that it is gradually realized during the journey towards the spawning site. No abnormalities such as necrosis or unusual oocyte diameters were observed at optical microscopic level for the sampled individuals.

Biometric parameters and gonad histology allowed to further assessment of the classification of the sampled eels (Table 2).

GSI values were in agreement with histological observations and stage classification, GSI of yellow and silver female eels being respectively lower and higher than 1.2. Ocular Index was also in agreement with the stage classification, high OI values being exhibited only by silver female and male eels.

The SI calculation of individuals indicated 56.7% of FV, 3% of FIII, 34.3% of FI and 6% of MII in the sampled population fraction from the Loire estuary.

### 3.3. Liver Vg mRNA levels of eels sampled in the Loire estuary

The relationships between Vg expressed in hepatocytes and GSI of European eels collected in both sites of the Loire estuary are illustrated in Fig. 3.

Silver females ( $n=8$ ) captured during the downstream migration in November 2010 presented Vg mRNA levels ranging from 2.5 to 9034.5 AU (Fig. 3A). Low Vg mRNA levels (1 and 1.7 AU) were respectively detected in the liver of the 2 silver males (Fig. 3B).

Concerning non migrant individuals collected in May 2009, 3 out of 8 yellow females from Varades presented detectable Vg levels (ranging between 0.4 and 45.5 AU), whereas Vg transcripts were below or close to detection level ( $\leq 0.4$  AU) in the other yellow females and in the 2 collected silver females (Fig. 3C). Concerning yellow males, 6 out of 14 exhibited detectable Vg mRNA levels (between 0.4 and 26.24 AU) (Fig. 3D). One undifferentiated eel out of 3 depicted expressed Vg (0.6 AU). In the samples from Nantes, Vg was detectable in 7 out of 22 yellow females (0.5–21.4 AU) and in one of the 2 collected silver females (2.4 AU) (Fig. 3E). One yellow male out of 2 and one undifferentiated eel out of 4 also revealed Vg mRNA expression (1.6 and 1.2 AU respectively) (Fig. 3F).

The comparison of mean Vg mRNA levels according to each sexual stage do not show a difference between the two sampling sites. To conclude, 10 out of 25 yellow or undifferentiated eels collected at the upstream site and 9 out of 28 on the downstream site of the estuary, exhibited a quantifiable hepatic Vg mRNA expression.

The mean Vg mRNA level expressed by migrant silver females was significantly higher than mean levels calculated for yellow females, yellow males and undifferentiated eels (Kruskal–Wallis,  $p$ -value  $< 0.0206$ ). No statistical difference was observed on mean Vg mRNA levels between these last three groups of individuals.

Principal component analysis (PCA) was performed in order to evaluate correlation between Vg mRNA levels and biometric parameters (BL, K, A, OI, GSI, PFI, DTI) of all the sampled

**Table 2**

Sexual stage and biometric indices determined in sampled eels from both studied sites, upstream and downstream of the Loire estuary.

Sampling date		May 2009				November 2010	
		U <sup>a</sup>	f <sup>b</sup>	F <sup>c</sup>	m <sup>d</sup>	F	M <sup>e</sup>
n <sup>f</sup>	Up	3	8	2	14	8	2
	Down	4	22	2	2		
BL <sup>g</sup>	Up	291 ± 36	416 ± 94	815 ± 48	328 ± 46	615 ± 58	384 ± 11
	Down	430 ± 97	528 ± 139	732 ± 270	328 ± 20		
GSI <sup>h</sup>	Up	0.55 ± 0.11	0.42 ± 0.39	1.80 ± 0.16	0.35 ± 0.16	1.73 ± 0.24	0.74 ± 0.74
	Down	0.42 ± 0.15	0.54 ± 0.25	1.40 ± 0.09	0.30 ± 0.24		
OI <sup>i</sup>	Up	3.16 ± 1.07	4.09 ± 1.28	9.32 ± 0.68	3.39 ± 0.71	8.69 ± 1.24	9.40 ± 0.82
	Down	4.51 ± 1.25	5.42 ± 1.69	9.38 ± 1.49	3.09 ± 1.19		

<sup>a</sup> Undifferentiated.

<sup>b</sup> Yellow female.

<sup>c</sup> Silver female.

<sup>d</sup> Yellow male.

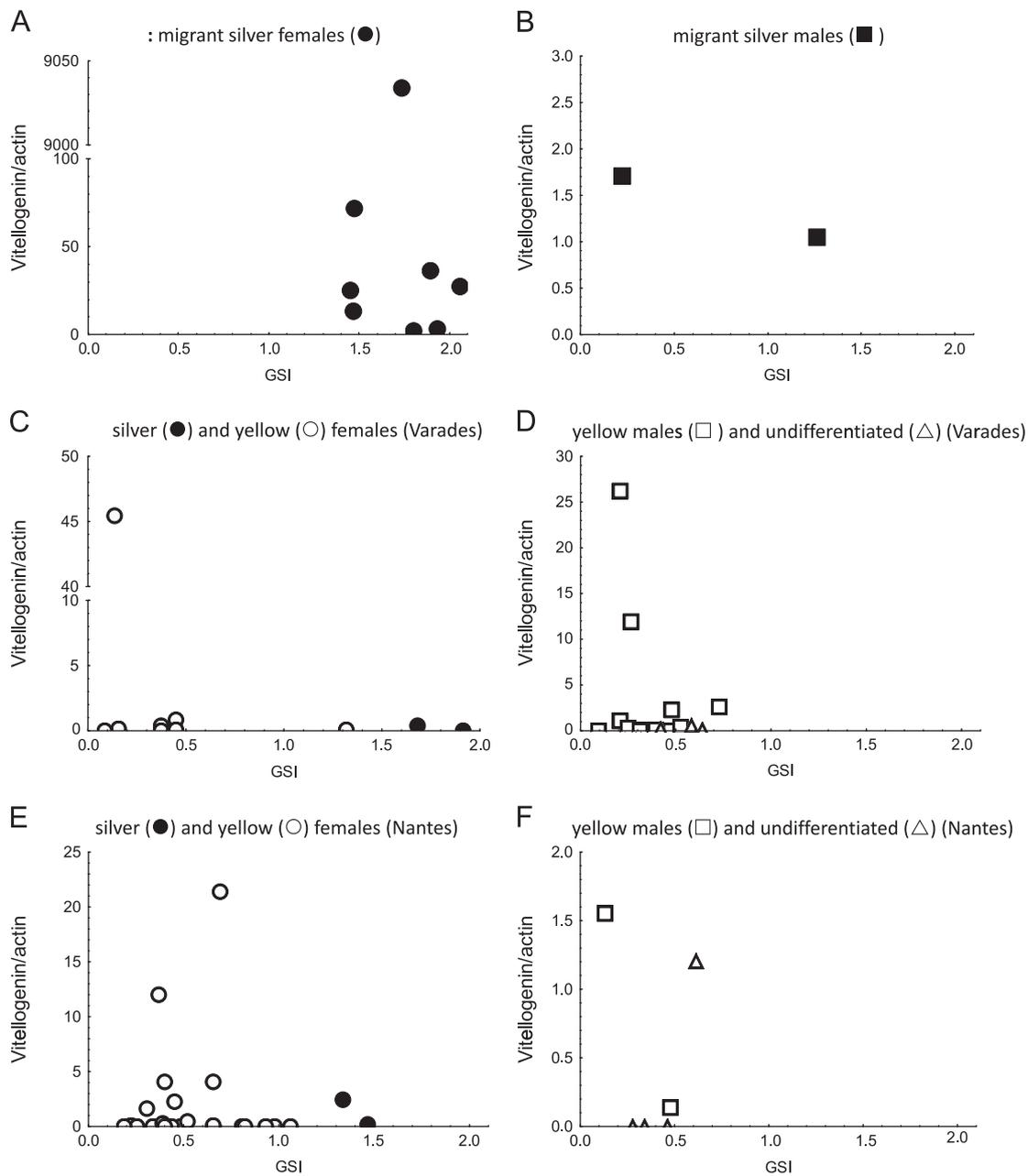
<sup>e</sup> Silver male.

<sup>f</sup> Number of samples.

<sup>g</sup> Body length.

<sup>h</sup> Gonado somatic index.

<sup>i</sup> Ocular index.

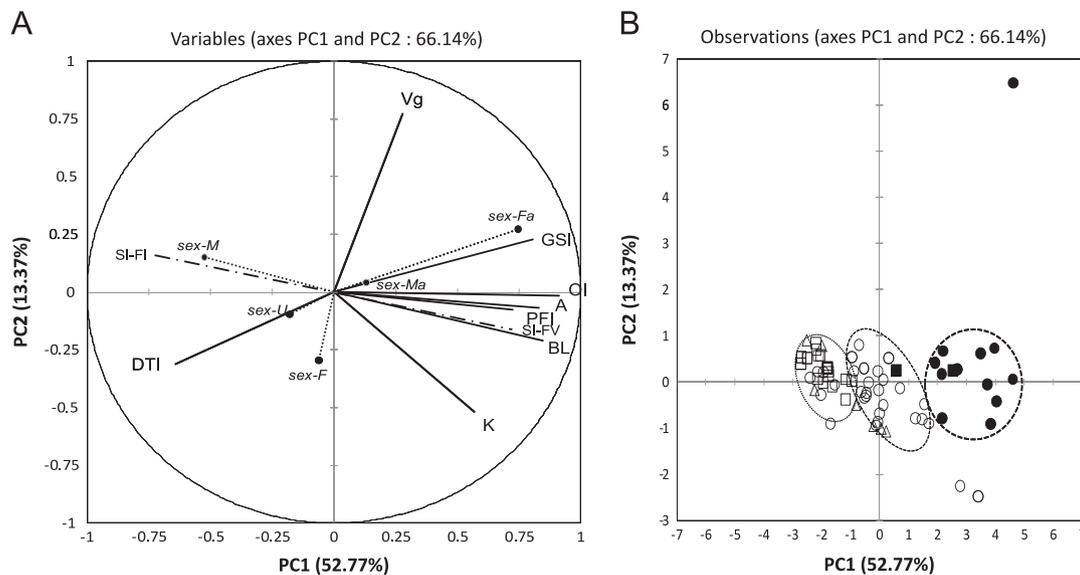


**Fig. 3.** Liver Vg mRNA levels of European eels *A. Anguilla* measured by q RT PCR on both sites of Loire estuary (downstream: Nantes; upstream: Varades) function of GSI.

individuals (Fig. 4). Two qualitative variables (gender and sexual maturity, and Silver Index) have been added as supplementary variables to plot the individuals.

The first two components of the analysis represented 52.8% and 13.4% respectively of the total inertia (Fig. 4A). Morphometric parameters such as BL, OI, A, PFI, and also GSI and K are highly and significantly correlated together on the first axis ( $r=0.759$ ,  $r=0.777$ ,  $r=0.464$ ,  $r=0.624$ ,  $r=0.517$  respectively,  $p < 0.05$ ), whereas the second axis is explained by Vg mRNA expression and the Fulton Index K. The first axis underlined also that the sexual maturation stage “silver female” is strongly and positively correlated to BL ( $r=0.576$ ), A ( $r=0.525$ ), OI ( $r=0.697$ ), PFI ( $r=0.387$ ) and GSI ( $r=0.872$ ) whereas it is negatively correlated to DTI ( $r=-0.636$ ). Thus, the first axis characterized the silvering process by the development of gonads (GSI) and the regression of the digestive tract (DTI), both in negative correlation ( $r=-0.620$ ,  $p < 0.05$ ), corresponding to the silver eel starvation. Relationships

between the SI FV and the silver prepubertal eels and the SI FI and immature eels can be underlined. The SI MII and FIII, which did not contribute to the components of the analysis, have been removed from the figure in order to clarify the representation. Vg mRNA levels were only correlated to the GSI and to the silver female stage. Contrarily, Vg expression was not significantly correlated to the stage migrant FV. This result could probably be explained by a misclassification for stage FV eels. The analysis clearly separated three groups corresponding to the sex and/or sexual maturation (Fig. 4B). The addition of SI as a qualitative variable permitted confirmation that apparent silver eels were migrants eels ( $r=0.408$ ,  $p < 0.05$ ). Concerning undifferentiated and yellow males, the PCA showed significant negative correlation with morphometric parameters. Indeed, males do not have the same growth and development as females in the European eel species, which present a strong sexual dimorphism. The silver males were correlated significantly to OI ( $r=0.297$ ,  $p < 0.05$ ) and PFI ( $r=0.259$ ,  $p < 0.05$ ) which is characteristic of the silvering process.



**Fig. 4.** Principal Component Analysis of biometric parameters, sexual maturation stage, silver index and vitellogenin mRNA expression of European eels from Loire estuary (both sampling sites,  $n=67$ ). A: correlation loadings (BL: body length; K: Fulton index; LW: lipid weight; DTI: Digestive tract Index; PFI: Pectoral fin Index; GSI: Gonado Somatic Index; A: Age; Vg: Vg mRNA expression; SI: Silver Index); B: sample representation ( $\Delta$ =undifferentiated individuals ;  $\square$ =yellow males;  $\blacksquare$ =silver males;  $\circ$ =yellow females;  $\bullet$ =silver females).

The second axis is characterized by a significant positive correlation between Vg and GSI ( $r=0.245$ ) but any other biometric parameter was correlated to Vg expression levels. This result was explained by silver female eels collected in May 2009 and November 2010.

## 4. Discussion

### 4.1. Hepatic Vg mRNA expression as an indicator of estrogenic exposure in the European eel *A. anguilla*

Vg is a precursor protein of yolk synthesis, representing energy reserves required for development of embryos in Teleosts as in other oviparous vertebrates. Transcription, translation and biosynthesis of this large phospholipoglycoprotein (200–700 kDa) take place in the liver under the regulation of ovarian estrogens (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal, 1991a; Burzawa-Gerard et al., 1991b). Vg is expressed specifically in female hepatocytes during vitellogenesis under the effects of endogenous estradiol. In males and juveniles of both sex, Vg gene is present but stays silent except in the presence of xeno-estrogen, so that its expression signs a potential endocrine disruption by xenobiotics (Kime et al., 1999). Differently from the majority of Teleosts, European yellow eels are in juvenile and immature stage during most of their continental life cycle. Just before the downstream stage of the only reproductive migration towards the spawning oceanic areas, they began a progressive and important metamorphosis usually known as silvering. At this time, silver eels are in a prepubertal stage and the females presented previtellogenic oocytes for which no inclusion of yolk was observed (Burzawa-Gerard et al., 1994). Thus, Vg expression could be detected in silver females but should not be observed in any other continental stages (undifferentiated eels, yellow females, yellow and silver males).

An increasing number of investigations and international programs are being performed around the world in various aquatic ecosystems (marine, fresh or brackish water) using Vg as biomarker of estrogenic disruption underlined by reviews (EELREP, 2005; Matthiessen, 2003). However, in eels, differently from other investigated Teleosts, low or undetectable levels of Vg have been reported by ELISA, RIA and PCR following an estrogenic exposure

(Barucca et al., 2006; Burzawa-Gerard et al., 1991b; Versonnen et al., 2004). For instance, field studies in Flanders showed no enhancement of yellow eel Vg plasma levels despite a very high internal pollution load with organochlorine and PCBs (Versonnen et al., 2004). From the river Thames, the hypothesis of an endocrine disruption has however been depicted in immature yellow eels, since abnormal elevated Vg plasma levels were recorded in individuals with body length less than 45 cm which can normally not correspond to female silver eels (Peters et al., 2001).

The proteomic level does not seem to be a valuable indicator of exposure to estrogen compounds. Indeed, the hepatic synthesis of Vg is controlled by nuclear receptors E2 dependent but the maximal capacities of E2 binding as Vg exocytose process are lower in *A. anguilla* compared to other fish species (Burzawa-Gerard et al., 1994). These authors showed, during a seven weeks experimental induction of sexual maturation that significant Vg plasmatic levels could be reached only after induction of the number and the binding capacities of hepatocytes E2 receptors. Furthermore, the specificity of the European eel sexual maturation (semelparous status, long oceanic migration without feeding) and particularly its dopaminergic inhibition of vitellogenesis, at hypothalamus and pituitary levels in earlier steps of gametogenesis, do not lead to significant Vg plasmatic levels in feral prepubertal individuals (Weltzien et al., 2009). Laboratory experiments showed thus that the induction of full sexual maturation requires 3 to 6 months of weekly injections with pituitary extracts (Palstra et al., 2005).

RT PCR method appeared as a promising approach to monitoring estrogenic exposure since Vg expression rises rapidly and indicates recent exposure to EDCs, as already shown in other various fish (Bowman et al., 2000). Moreover, according to Marohn et al. (2008), measuring mRNA concentrations excluded a variety of environmental influences and was more relevant than investigations based on protein contents or enzymes activities. In European eel, Barucca et al. (2006) underlined that treated juvenile individuals showed basal Vg gene expression during experimental induction by steroid hormones, using specific designed primers, and no amplification of Vg mRNA was observed in juvenile *A. anguilla* from the field.

The present paper based one's argument on these previous studies to measure the Vg induction only at the transcriptomic

level. The q RT PCR, higher sensitive than RT PCR, was used to amplify responses of hepatic Vg transcripts in eels. To firstly validate the approach, a laboratory exposure of silver males to various steroids was conducted and demonstrated the responsiveness of exposed silver males, since a significant hepatic mRNA Vg induction was observed for E2 treated males compared to controls or androgen-treated specimens.

The q RT PCR was then performed in eels sampled from the Loire estuary according to gender (undifferentiated, male or female) and sexual stage (yellow or silver) of each individual. In female silver eels sampled at the time of the downstream migration, hepatic Vg mRNA levels ranged from 2.5 to 9035 AU. This is within the range of the large individual variations previously observed in Vg plasma levels in silver females, ranging from undetectable (less than 100 ng/ml) to 10 µg/ml as measured by RIA (Burzawa-Gerard and Dumas-Vidal, 1991a; Burzawa-Gerard et al., 1991b) or ELISA (Sbaihi et al., 2001). These results reflected large inter-individual differences in the activation of hepatic Vg at silvering, as already highlighted by Sbaihi et al. (2001). Quantifiable Vg expression was also depicted in some individuals of the other sex and stages: in undifferentiated eels, in yellow previtellogenic females and in yellow and silver males. In these categories, Vg mRNA values ranged from undetectable (less than 0.4 AU) to 26 AU. Furthermore, this unusual expression of Vg was exhibited by a large proportion of the sampled eels (38% of the 55 individuals) and was found similarly at both sampling sites.

In our study, the highly sensitive q RT PCR method thus allowed the measurement of different levels of hepatic Vg mRNA transcripts in individuals from the field or experimentally exposed to estrogenic compounds. According to these results, detectable levels of hepatic Vg mRNA expression could suggest a potential estrogenic exposure of individuals for which no Vg is expressed under normal conditions. This work validates the suitability of q RT PCR and its value to monitoring endocrine exposure in this species.

#### 4.2. Statistical relationship between Vg levels and measured variables

The PCA demonstrated that Vg mRNA levels were only correlated to the GSI and to the silver female stage. Contrarily, Vg expression was not significantly correlated to the stage migrant FV. This result could probably be explained by a misclassification of stage FV eels. Indeed, according to Durif et al. (2009), these misclassifications can be influenced by the ecological conditions or individual specificities. In our study, there is an excellent correlation between SI and gonad histological results on the upstream site (Varades) whereas all the yellow specimens collected on the downstream site (Nantes) were classified as migrant eels (SI FV). This could suggest that these immature eels prepare their further silvering for the next autumn. Indeed, K and the biometric parameters BL, A and PFI are positively correlated to the stage SI FV, contrarily to the silver eels for which K is not correlated, indicating the starvation whereas yellow eels are already in the growth phase.

On the other hand, it could be also hypothesized that a reversal of silvering or an interruption of the silvering process for bigger and aged individuals which became sedentary because of favorable trophic conditions in this area. However, the addition of SI as a qualitative variable permitted confirmation that apparent silver eels were migrants eels.

The second axis could expressed the pubertal process with the expression of Vg mRNA, indicating a further incorporation of Vg in oocytes. Finally, the PCA cannot demonstrate a relationship between silver index and Vg mRNA expression neither correlation with biometric parameters other than GSI. Concerning

relationships with the sexual maturation stages, only silver eels collected in May 2009 and November 2010 were significantly correlated to the Vg levels, confirming a real status of migrants and potential genitors.

#### 4.3. Relation between hepatic mRNA Vg induction and gonad histology

In parallel to the quantification of Vg mRNA expression, gonad histology allows the investigation of links between induction of Vg and potential abnormalities as oocytes atresia (Pierron et al., 2008b) or early incorporation of yolk globuli. Indeed, European eel gonads contained oocytes representing stages I, II and III according to Palstra and van den Thillart (2009). Stage III was characterized by the presence of lipid droplets, where yolk globuli, characteristic of vitellogenesis, were not found. The enlargement of the oocyte size ( $\geq 250$  µm) associated to the decrease of lipid droplets number indicates the incorporation of vitellogenin into vesicles (Palstra, 2007). In the present study, no abnormality was observed on histological section examinations, despite a Vg gene induction observed in undifferentiated, male or yellow female eels from the Loire estuary. This result confirms the suitability of the quantification of Vg mRNA expression compared to histological studies of gonads which are time-consuming and particularly awkward in eels. Moreover, contrary to the intersexuality observed in various fish in the French rivers (Hinfray et al., 2010; Sanchez et al. 2008), gonad histology cannot indicate to potential intersex in eel because juvenile hermaphroditism or intersexual stage (Beullens et al., 1997). However, our histological observations allow determination of the sexual stage (size or number of oocytes, presence of lipid droplets, potential precocity of yolk vesicle apparition, testicular development stage) (Burzawa-Gerard, 1994). The absence of oocytes presenting a diameter superior to 250 µm validated the prepubertal stage of silver eels. No abnormalities such as necrosis or unusual oocyte diameters were observed at optical microscopic level for the sampled individuals. Our histological studies as well as low Vg mRNA levels detected do not permit a conclusion as to a potential effect of endocrine disruption.

As such, what are the potential sources of EDCs from the Loire estuary which could partly and potentially explain the hepatic mRNA Vg induction?

#### 4.4. Likely origins of eel contamination with EDCs in the studied area

The Loire estuary (largest French estuary draining 110,000 km<sup>2</sup>) receives several effluents streams (wastewater treatment plants, atmospheric, industrial and agricultural leaching products), and has suffered from a higher urban development and environmental constraints (Perraudeau and Després, 2009).

Literature data indicates that the Loire estuary is impacted by several types of contaminants such as organochlorine pesticides, polybromodiphenylethers, PCBs, PAHs, heavy metals both in physical compartments (waters and sediments) and in aquatic organisms (Bragigand et al., 2006; Marchand et al., 2004; Robbe et al., 1985). Eels from the river Loire exhibited moderate PCB, PBDE and PFC contaminations (Babut et al., 2009; Blanchet-Letrouvé et al., 2013; Couderc et al., 2013). The marker-PCB (congeners #28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) were notably analyzed in individuals sampled in the framework of this study. According to the development stage, marker PCB contamination significantly increased from glass eel stage ( $3.49 \pm 0.16$  ng g<sup>-1</sup> ww) to other life stages ( $193 \pm 101$  ng g<sup>-1</sup> ww for yellow eels from Nantes and  $82.3 \pm 27.4$  ng g<sup>-1</sup> ww for yellow eels from Varades;  $229 \pm 130$  ng g<sup>-1</sup> ww for silver eels). Concerning the 2 sampling sites, eels from Varades appeared less contaminated by

PCBs than those from Nantes. Overall, eels from the Loire estuary showed an intermediate contamination level compared to other international/national areas. Indeed, at the international scale, eels from the Loire estuary appear to be more contaminated than those from some other sites in Poland, Ireland, Spain, Italy and the UK (Bordajandi et al., 2003; Corsi et al., 2005; McHugh et al., 2010; Santillo et al., 2005). However, other sites are more contaminated than the Loire estuary (twice to 10 times higher), i.e. the River Elbe in Czech Republic and Germany, the Tevere and Gagliarino rivers in Italy, Flanders in Belgium and different lakes in Finland (Belpaire et al., 2011; Maes et al., 2008; Tulonen and Vuorinen, 1996; van der Oost et al., 1996). Throughout France, eels from the Loire estuary are slightly more contaminated than those from the Vacares lagoon and about three times more than those from the Thau pound (Oliveira Ribeiro et al., 2008; Santillo et al., 2005), whereas they are less contaminated than eels from the Rhone River (about ten times less) and the Gironde estuary (about two times less, whatever the life stage and the size class) (Tapie and Le Menach, 2011).

These PCBs are particularly suspected because of their potential of estrogenic and anti-estrogenic disruptors (Geeraerts et al., 2011) and their neuroendocrine effects (Kodavanti and Curras-Collazo, 2010), endangering several fish species and notably the eel population (van Ginneken et al., 2009). In the Loire estuary, endocrine disruption has recently been shown in the bivalve *Scrobicularia plana* (Fossi Tankoua et al., 2012) which is a prey for the flat fish (*Plathychtys flesus*) (Masson, 1987), itself a potential prey for the top predator *A. anguilla*, an opportunist species.

Finally, European eels can be contaminated by several possible ways such as sediments, water or/and trophic chain (Pierron et al., 2008b). Indeed, juvenile eels are in direct contact with the sediment during their continental life (from 5 to 22 years for the Loire eels, personal communication) and thus potentially exposed to contaminated sediments for a long time compared to other Teleosts (Tesch, 2003). So, depending to their maturation stage and gender, European eels can be contaminated by multiple pollutants through different biologic or metabolic ways.

What potential risk do pollutants for represent the European eel health, its reproductive function and eventually its reproductive success?

#### 4.5. Potentials impacts of Vg induction and estrogenic disruption on eel reproductive function

Concerning the possible adverse effects in male and immature organisms, the production of Vg probably interferes with other pathways diverting metabolic resources necessary for growth and spermatogenesis as described in other Teleosts (Ankley et al., 2010). In the case of eel, an induction of Vg could interfere with the lipid metabolic pathway. Lipids represent pivotal molecules for the success of reproduction, related to the vitellogenic yolk globuli, the lipid droplets, the steroid and hormone metabolism, the energetic reserves in muscles necessary to provide the energy required for physiological modifications in marine water and reproductive migration. This energetic cost has been well-documented by Van Ginneken et al. (2009), who showed that PCB exposure of migrant eels significantly reduced oxygen consumption during swimming. These authors suggested also that the current levels of PCBs and other dioxin-like compounds may seriously impair the reproduction of the European eel. The swimming animals lost about 75% more weight compared to resting animals and had about 50% lower plasma fat content.

Recent studies on muscles lipid contents of yellow eels, using time-trend monitoring in Belgian and Netherlands rivers showed that fat contents decreased from 21% to 13%, coinciding with the strong reduction of the European eel stock (Belpaire et al., 2009).

Furthermore, impairment of lipid storage by cadmium was shown in the European eel (Pierron et al., 2007). Lipid stores are also necessary to ensure the metabolic challenge of gonad growth and maturation, occurring during the ultimate oceanic phase. This unique reproduction migration of about 6000 km as well as the gonad maturation can be achieved because of the large amount of accumulated lipid stores, which attract lipophilic chemical substances such as EDCs (van Ginneken and Maes, 2005). Moreover, swimming appears to be a trigger which stimulates fat deposition in the oocytes but suppresses vitellogenesis. That suggested these events are separated in the field and occurred sequentially. This implies that wild eels undergo vitellogenesis and final maturation near or at the spawning grounds (Palstra and van den Thillart, 2011) and could explain the low responsiveness of the eel concerning Vg induction at the onset of the migration, when they leave the Loire estuary. This also validates the interest of our results relative to endocrine disruption.

In the eel, a specific threat could also result from the redistribution of contaminants bioaccumulated during the continental juvenile stages in the lipid stores. These contaminants are released in the blood and reallocated to other tissues during the lipid mobilization required for reproductive migration and sexual maturation, while the eels have ceased feeding. Pierron et al. (2008a) demonstrated that cadmium is redistributed from the fat tissue to various organs including liver, kidney, and ovaries, during experimental sexual maturation in the eel. Future studies should aim to further investigate potential links between the presence of EDCs and lipid store depletion in eels comparing two major fat tissues (muscle and gonad) and their own PCBs levels.

## 5. Conclusions

In conclusion, this study performed in the Loire estuary constitutes a preliminary report validating the use of q RT PCR as a highly sensitive approach to quantify Vg mRNA transcripts in European eel. While only female silver eels normally express hepatic Vg mRNA, Vg transcripts were also quantified by q RT PCR in a proportion of 38% of the other individuals sampled, normally not inclined to express it, those being undifferentiated, yellow females, yellow and silver males. However, our findings are not fully conclusive due to the very low Vg expression and the absence of impact on gonad histology. Today, no evidence for Vg endocrine disruption in European eels was reported so far by previous field studies even in heavily contaminated hydrosystems (for review, Geeraerts and Belpaire (2010)). As such, the present work consisted on a preliminary field study and need further investigations to evaluate the potential of hepatic Vg mRNA expression as biomarker of endocrine disruption in this species of great economical and ecological interest.

## Acknowledgments

This research was funded by the region Pays de la Loire and supported by the AADPPMFEDLA (Association Agréée Départementale des Pêcheurs Professionnels maritimes et fluviaux en Eau Douce de Loire-Atlantique). Thanks are also due to Odile Aumaille for her technical help and to Dr. Pierre Elie for his scientific advices on eel.

## References

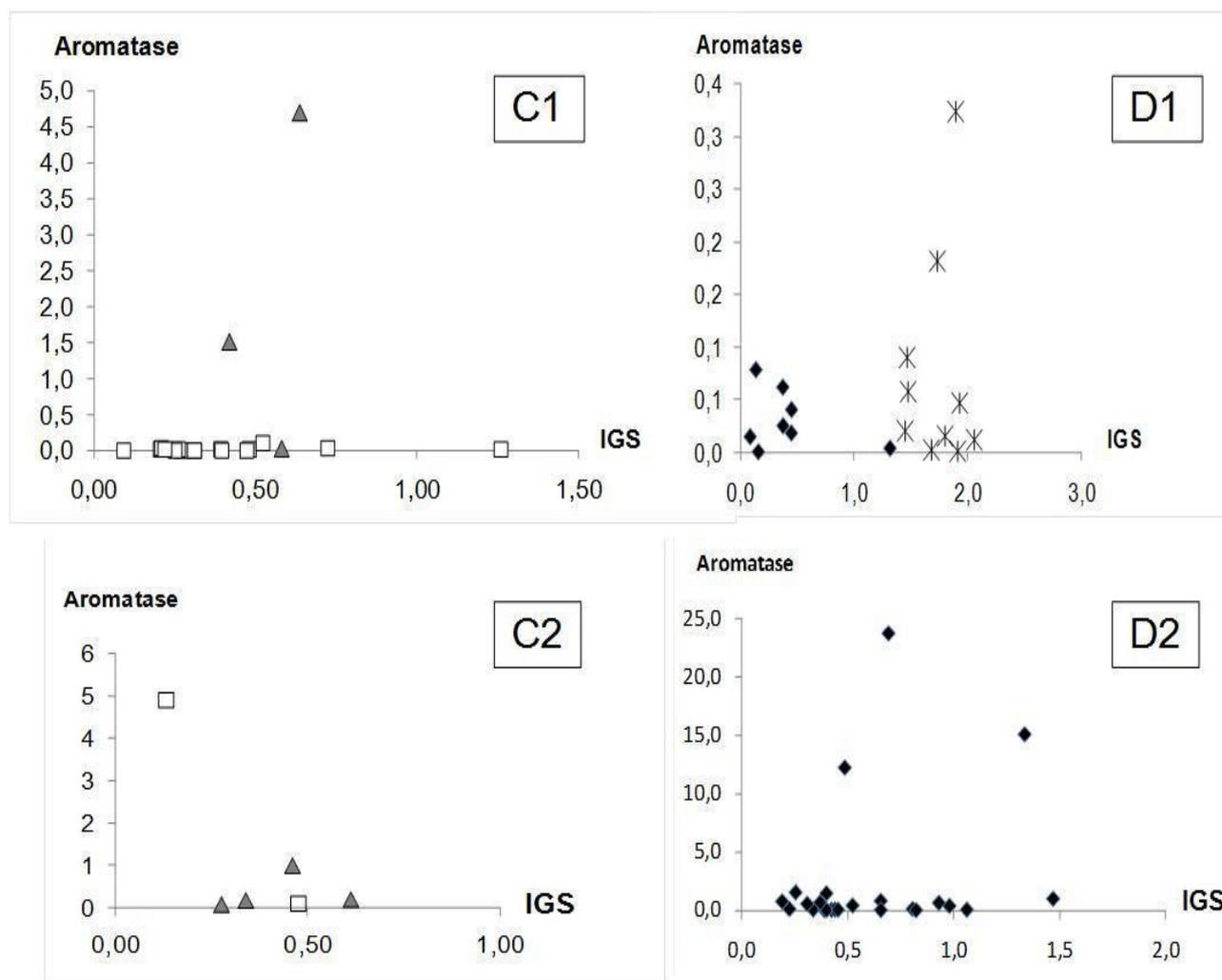
- Agence de l'eau Loire-Bretagne, 2012. Rapport d'activité de l'Agence de l'eau Loire Bretagne. 71.
- Ankley, G.T., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Cavallin, J.E., Martinovic, D., Wehmas, L.C., Mueller, N.D., Villeneuve, D.L., 2010. Use of

- chemical mixtures to differentiate mechanisms of endocrine action in a small fish model. *Aquat. Toxicol.* 99, 389–396.
- Aroua, S., Weltzien, F.-A., Belle, N.L., Dufour, S., 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids. *Gen. Comp. Endocrinol.* 153, 333–343.
- Babut, M., Miegue, C., Roy, A., Lopes, C., 2009. Contaminant Transfer from Sediment to Biota and Development of a Trophic Model in an Environmental Management Perspective. Cemagref, Bordeaux, France p. 47.
- Baruca, M., Canapa, A., Olmo, E., Regoli, F., 2006. Analysis of vitellogenin gene induction as a valuable biomarker of estrogenic exposure in various mediterranean fish species. *Environ. Res.* 101, 68–73.
- Belpaire, C.G.J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., 2009. Decreasing eel stocks: survival of the fittest? *Ecol. Freshw. Fish* 18 (2), 197–214.
- Belpaire, C., Geeraerts, C., Roosens, L., Neels, H., Covaci, A., 2011. What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience. *Environ. Int.* 37, 354–364.
- Beullens, K., Eding, E.H., Gilson, P., Ollevier, F., Komen, J., Richter, C.J.J., 1997. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153 (1–2), 135–150.
- Blanchet-Letrouvé, I., Zalouk-Vergnoux, A., Vénisseau, A., Couderc, M., Le Bizec, B., Elie, P., Herrenknecht, C., Mouneyrac, C., Poirier L., 2013. Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: spatial and biological variabilities. In: Proceedings of the 17th Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO). 5th–8th May 2013, Faro, Portugal.
- Bordajandi, L.R., Gomez, G., Fernandez, M.A., Abad, E., Rivera, J., Gonzalez, M.J., 2003. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere* 53, 163–171.
- Bowman, C.J., Kroll, K.J., Hemmer, M.J., Folmar, L.C., Denslow, N.D., 2000. Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 300–313.
- Bragigand, V., Amiard-Triquet, C., Parlier, E., Boury, P., Marchand, P., El Houch, M., 2006. Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries. *Sci. Total Environ.* 368, 615–626.
- Burzawa-Gerard, E., Dumas-Vidal, A., 1991a. Effects of 17[beta]-estradiol and carp gonadotropin on vitellogenesis in normal and hypophysectomized European silver female eel (*Anguilla anguilla* L.) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 84, 264–276.
- Burzawa-Gerard, E., Nath, P., Baloche, S., Peyon, P., 1991b. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for vitellogenin and vitellus in the eel (*Anguilla anguilla* L.) and in the Indian major carp (*Labeo rohita*). In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), Proceedings of the 4th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. pp. 319–320.
- Burzawa-Gerard, E., Baloche, S., Leloup-Hatey, J., Le Menn, F., Messaouri, H., Nunez-Rodriguez, J., Peyon, P., Roger, C., 1994. Ovogenèse chez l'anguille (*Anguilla anguilla* L.): ultrastructure de l'ovaire à différents stades de développement et implication des lipoprotéines au cours de la vitellogenèse Bull. Fr. Pêche Pisc. 335, 213–233.
- Corsi, Ilaria, Mariottini, Michela, Badesso, Annalisa, Caruso, Tancredi, Borghesi, Nicoletta, Bonacci, Stefano, Iacocca, Annalisa, Focardi, Silvano, 2005. Contamination and sub-lethal toxicological effects of persistent organic pollutants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). *Hydrobiologia* 550, 237–249.
- Couderc, M., Poirier, L., Zalouk-Vergnoux, A., Blanchet-Letrouvé, I., Kamari, A., Herrenknecht, C., Marchand, P., Mouneyrac, C., Le Bizec, B., 2013. Assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and perfluorinated compounds (PFCs) in two fish species, from the Loire estuary: correlation with size, sex, geographic locations and thyroid effects. In: Proceedings of the 17th Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO). 5th–8th May 2013, Faro, Portugal.
- Dekker, W., 2003. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Manag. Ecol.* 10, 365–376.
- Durif, C., Dufour, S., Elie, P., 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J. Fish Biol.* 66, 1025–1043.
- Durif, C., Guibert, A., Elie, P., 2009. Morphological discrimination of the silvering stages of the European eel. In: Casselman, J.M., Cairns, D.K. (Eds.), Eels at the edge: science, status, and conservation concerns, 58. American Fisheries Society Symposium, Bethesda, Maryland, pp. 103–111.
- EELREP, 2005. Quality of life and management of living resources: estimation of the reproduction capacity of European eel. ONEMA p. 272, www.fishbiology/silvereel.html.
- Elie, P., Girard, P., 2009. Effets des micropolluants et des organismes pathogènes chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L1758. ONEMA, CEMAGREF, Bordeaux, France p. 121.
- Fossi Tankoua, O., Amiard-Triquet, A., Denis, F., Minier, C., Mouneyrac, C., Berthet, B., 2012. Physiological status and intersex in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* from thirteen estuaries in northwest France. *Environ. Pollut.* 167, 70–77.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19, 239–266.
- Geeraerts, C., Focant, J.F., Epe, G., De Pauw, E., Belpaire, C., 2011. Reproduction of European eel jeopardised by high levels of dioxins and dioxin-like PCBs? *Sci. Total Environ.* 409, 4039–4047.
- Corbi, S., Regoli, F., 2005. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions. *Mar. Environ. Res.* 58, 511–515.
- Hinfray, N., Palluel, O., Piccini, B., Sanchez, W., Ait-Aïssa, S., Noury, P., Gomez, E., Geraudie, P., Minier, C., Brion, F., Porcher, J.M., 2010. Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Sci. Total Environ.* 408, 2146–2154.
- Huertas, M., Scott, A.P., Hubbard, P.C., Canário, A.V.M., Cerdà, J., 2006. Sexually mature European eels (*Anguilla anguilla* L.) stimulate gonadal development of neighbouring males: possible involvement of chemical communication. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 304–313.
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., 2005. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. Rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ. Health Perspect.*, 114.
- Kime, D.E., Nash, J.P., Scott, A.P., 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177, 345–352.
- Kodavanti, P.R.S., Curras-Collazo, M.C., 2010. Neuroendocrine actions of organohalogen: thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Front. Neuroendocrin.* 31, 479–496.
- Lecomte-Finiger, R., 1985. L'âge de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L., 1758): état actuel des connaissances et recherches nouvelles en Méditerranée. *J. Appl. Ichthyol.* 1, 178–192.
- Maes, J., Belpaire, C., Goemans, G., 2008. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. *Environ. Pollut.* 153, 223–237.
- McHugh, B., Poole, R., Corcoran, J., Anninou, P., Boyle, B., Joyce, E., Barry Foley, M., McGovern, E., 2010. The occurrence of persistent chlorinated and brominated organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Irish waters. *Chemosphere* 79, 305–313.
- Mc Lusky, D., 1989. The Estuarine Ecosystem, 2nd ed. Blackie and Son Ltd, Glasgow and London.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T., Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70, 327–343.
- Marohn, L., Rehbein, H., Kündiger, R., Hanel, R., 2008. The suitability of cytochrome-P4501A1 as a biomarker for PCB contamination in European eel (*Anguilla anguilla*). *J. Biotechnol.* 136, 135–139.
- Masson, G., 1987. Biologie et écologie d'un poisson plat amphihaline, le Flet (*Platyichthys flesus flesus*, Linné, 1758) dans l'environnement ligérien: distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques. Université de Bretagne Occidentale, Brest p. 344.
- Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: a review. *Environ. Int.* 34, 531–545.
- Matthiessen, P., 2003. Endocrine disruption in marine fish. *Pure Appl. Chem.* 75, 2249–2261.
- Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., Dufour, S., 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cGnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61, 525–535.
- Oliveira Ribeiro, C.A., Vollaie, Y., Coulet, E., Roche, H., 2008. Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in the eel (*Anguilla anguilla*) at the camargue nature reserve—France. *Environ. Pollut.* 153, 424–431.
- Palstra, A., Curiel, D., Fekkes, M., de Bakker, M., Székely, C., van Ginneken, V., van den Thillart, G., 2007. Swimming stimulates oocyte development in European eel. *Aquaculture* 270, 321–332.
- Palstra, A., van den Thillart, G., 2009. Artificial maturation and reproduction of the European eel. In: Palstra, A., van den Thillart, G., Dufour, S., Rankin, J.C. (Eds.), Spawning Migration of the European eel. Springer, Netherlands, pp. 309–331.
- Palstra, A., van den Thillart, G., 2011. Swimming physiology of European silver eels (*Anguilla anguilla* L.): energetic costs and effects on sexual maturation and reproduction. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 297–322.
- Pankhurst, N.W., Lythgoe, J.N., 1983. Changes in vision and olfaction during sexual maturation in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *J. Fish Biol.* 23, 229–240.
- Perraudeau, Y., Després, L., 2009. L'estuaire de la Loire: un territoire en développement durable? Presses Universitaires de Rennes, Rennes.
- Peters, L.D., Doyotte, A., Mitchelmore, C.L., McEvoy, J., Livingstone, D.R., 2001. Seasonal variation and estradiol-dependent elevation of Thames estuary eel *Anguilla anguilla* plasma vitellogenin levels and comparisons with other United Kingdom estuaries. *Sci. Total Environ.* 279, 137–150.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.-P., Brêthes, D., Elie, P., Massabuau, J.-C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* 81, 304–311.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Baloche, S., Mesmer-Dudons, J.P.G., Bourdineaud, J.-P., Massabuau, J.-C., 2008a. How cadmium could compromise the completion of the European eel's reproductive migration. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4607–4612.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Lucia, M., Durrieu, G., Massabuau, J.-C., Elie, P., 2008b. Cadmium uptake by the European eel: trophic transfer in field and experimental investigations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70, 10–19.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Lucia, M., Massabuau, J.-C., 2009. Ovarian gene transcription and effect of cadmium pre-exposure during artificial sexual maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*). *BioMetals* 22, 985–994.

- Robbe, D., Marchandise, P., Gouleau, D., 1985. Metaux lourds dans les sédiments de l'estuaire de la Loire. *Water Res.* 19, 1555–1563.
- Robinet, T.T., Feunteun, E.E., 2002. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a case for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* 11, 265–277.
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditché, J.-M., Porcher, J.-M., 2008. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environ. Int.* 34 (4), 490–498.
- Santos, T., Romano, D., Gadea, R., 2010. Trade Union Priority List for REACH Authorisation. European Trade Union Confederation, Belgium p. 117.
- Santillo, D., Johnston, P., Labunska, I., Brigden, K., 2005. Swimming in chemicals widespread, Presence of Brominated Flame Retardants and PCBs in eels (*Anguilla anguilla*) from Rivers and Lakes in 10 European Countries. Greenpeace International, Exeter, UK p. 56.
- Sbaihi, M., Fouchereau-Peron, M., Meunier, F., Elie, P., Mayer, I., Burzawa-Gerard, E., Vidal, B., Dufour, S., 2001. Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the Europe European eel. *J. Fish Biol.* 59, 302–318.
- Tapie, N., Le Menach, K., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83 (2), 175–185.
- Tesch, F.W., 2003. The Eel. Blackwell Science, Oxford.
- Tulonen, J., Vuorinen, P.J., 1996. Concentrations of PCBs and other organochlorine compounds in eels (*Anguilla anguilla* L.) of the Vanajavesi watercourse in southern Finland, 1990–1993. *Sci. Total Environ.* 187, 11–18.
- van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.* 13, 57–149.
- van der Oost, R., Opperhuizen, A., Satumalay, K., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquat. Toxicol.* 35, 21–46.
- van Ginneken, V., Maes, G.E., 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 15, 367–398.
- van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., van den Thillart, G., Murk, A., 2009. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquat. Toxicol.* 92, 213–220.
- Versonnen, B.J., Goemans, G., Belpaire, C., Janssen, C.R., 2004. Vitellogenin content in European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium. *Environ. Pollut.* 128, 363–371.
- Weltzien, F.-A., Pasqualini, C., Vernier, P., Dufour, S., 2005. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *Gen. Comp. Endocrinol.* 142, 134–142.
- Weltzien, F.-A., Pasqualini, C., Sébert, M.E., Vidal, B., Le Belle, N., Kah, O., Vernier, P., Dufour, S., 2006. Androgen-specific stimulation of brain dopaminergic systems in the female eel. *Endocrinology* 147, 2964–2973.
- Weltzien, F.-A., Sébert, M.-E., Vidal, B., Pasqualini, C., 2009. Dopamine inhibition of eel reproduction spawning migration of the European eel. In: van den Thillart, G., Dufour, S., Rankin, C. (Eds.), *Spawning Migration of the European Eel*. Springer, Netherlands, pp. 279–307.

## II. Résultats complémentaires: l'expression de l'aromatase hépatique (ARNm)

La réalisation d'une gamme de concentrations a permis d'établir la droite de régression nécessaire à la quantification de l'expression du gène de l'aromatase dans nos échantillons, sur les deux sites concernés (Nantes et Varades).



**Figure 44.** Evolution de l'expression de l'aromatase hépatique en fonction du rapport gonado-somatique (IGS), en U.A.

**C1:** site de Varades; expression de l'aromatase en UA par rapport au rapport gonado somatique pour anguilles mâles (carrés) et indifférenciées sexuellement (triangles).

**C2:** site de Nantes; expression de l'aromatase en UA par rapport au rapport gonado somatique, pour anguilles mâles (carrés) et indifférenciées sexuellement (triangles).

**D1:** site de Varades; expression de l'aromatase en UA par rapport au rapport gonado somatique pour les anguilles femelles jaunes (ronds pleins) et femelles argentées (étoiles).

**D2:** site de Nantes; expression de l'aromatase en UA par rapport au rapport gonado somatique pour les anguilles femelles jaunes (ronds pleins) et femelles argentées (étoiles).



Sur le site de Nantes, 6 organismes expriment de l'aromatase hépatique pour un ratio aromatase sur actine  $>1$ , et 4 organismes l'expriment avec des valeurs entre 0.66 et 0.97 (figure 45).

Parmi ceux-ci, 4 ont exprimés conjointement de la Vg et l'aromatase à des concentrations variables.

Sur le site amont, deux organismes jaunes expriment de l'aromatase, mais aucune argentées.

Malgré une variabilité individuelle importante, les gènes de l'aromatase s'expriment dans le foie d'anguilles sauvages et sont quantifiables par q RT PCR.

L'analyse en composante principale réalisée sur l'ensemble des échantillons avec l'ensemble des paramètres biométriques (non présentée) permet d'observer une corrélation entre l'expression de l'aromatase et le poids de la vessie nataoire, lui-même en relation avec le début de la maturité sexuelle (augmentation de l'irrigation sanguine et durcissement de la paroi). Il n'existe pas de lien entre expression hépatique de la Vg et expression de l'aromatase.

L'aromatase semble correspondre plutôt à un indicateur de différenciation sexuelle ou de tout début de maturation des gonades (Fenske and Segner 2004; Kobayashi et al. ; Kotula-Balak et al. 2008; Sunobe et al. 2005; von Schalburg et al.) qu'à un biomarqueur cependant, nos résultats n'ont pas été validés par des tests réalisés en conditions expérimentales.

- En amont: 2 anguilles indifférenciées sexuellement expriment de l'aromatase
- En aval: 1 anguille indifférenciée et 1 mâle expriment de l'aromatase
- Absence de validation in vivo sur mâles argentés comme biomarqueur d'effet de PE
- Un lien probable avec la différenciation sexuelle vers un déterminisme femelle et la maturation sexuelle (phase prépubertaire de l'argentine)



III- Article 3 " Fate of PCBs during development and sexual maturation of European eel. correlations between contaminant levels and reproduction parameters. (*Anguilla anguilla*), soumis à AQUATIC TOXICOLOGY



# Fate of PCBs during developmental and sexual maturation of European eel (*Anguilla anguilla*): correlations between contaminant levels and reproduction parameters.

Authors and co-authors:

\* I. Blanchet-Letrouvé<sup>1</sup>, M. Couderc<sup>1,2,4</sup>, A. Zalouk-Vergnoux<sup>1</sup>, P. Elie<sup>5</sup>,

C. Herrenknecht<sup>1</sup>, S. Dufour<sup>3</sup>, B. Le Bizec<sup>2</sup>, Catherine Mouneyrac<sup>4</sup>, Laurence Poirier<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Université de Nantes, LUNAM université, MMS, EA 2160, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, Nantes F-44322, France

<sup>2</sup>ONIRIS, LABERCA, Atlanpole – La Chantrerie, BP 40706, Nantes F-44307, France

<sup>3</sup>Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR BOREA CNRS 7208,IRD 207, UPMC, 7, rue Cuvier, CP 32, 75231 Paris Cedex 05, France.

<sup>4</sup> LUNAM université Université Catholique de l'Ouest, IBEA, CEREAs, 44 rue Rabelais, Angers F-49008, France

<sup>5</sup>IRSTEA, 50 avenue de Verdun – Gazinet, Cestas F- 33612, France

\*Corresponding author: +33685329898, isabelle.blanchet-letrouve@ac-nantes.fr

---

**KEY WORDS:** European eel, PCB, gonad, muscle, vitellogenin, Loire estuary

## ABSTRACT

DI and ndl-PCB contamination levels of both gonads and muscles of yellow and silver eels from the Loire estuary have been compared in function of age class (6-10; 10-13; >13 years). The immature yellow gonads appeared two fold higher contaminated than the muscles for dl and ndl PCBs (expressed in ww and dw) in yellow eels belonging to the age class 6-10. This result could be explained by the lipid wealth of the gonads. For silver eels belonging to the 6-10 and 10-13 age classes, ndl PCB levels of gonads were significantly higher than those of muscles whatever the unit expression, underlining a greater contamination of gonads. Moreover, strong correlations between PCB levels of gonads and muscles in silver eels expressed in lw were found for each congener analyzed (except for the PCB 81), whereas no correlation was found in yellow eels. These results highlighted significant correlations between the contaminated lipids present in the gonad of silver eels and the fat stored in the muscles during the growing phase. A contamination level of 18.5 ng TEQ<sub>WHO 1998</sub>.kg<sup>-1</sup> of gonad expressed in ww was calculated revealing a potential risk of abnormalities during the embryogenesis. The PCB patterns highly varied among the different developmental stage and matrices. The non metabolizable congeners 126 and 169 could notably be considered as markers of the silvering process. Their constancy in glass eels could also sign a real exchange of these contaminants during the hatching, from oocyte yolk to embryos, suggesting a materno foetal transfer. Finally, mRNA Vg expression was shown to be not correlated to a sexual maturation stage, neither to the levels of PCBs but presented a significant correlation with the parasite index. The mRNA Arom expression was correlated to the dl and ndl-PCB levels (lw) in muscles, which could indicate an induction of aromatase gene by PCBs.

## 1. INTRODUCTION

Synaptic areas between continental and oceanic environments, estuarine zones are extremely precarious due to increasing complex mixtures of contaminants coming from anthropogenic activities. Among these, the Loire estuary concentrates both various socio-economic activities and a remarkable biodiversity with a strong productivity (Perraudeau and Després, 2009). However, this ecosystem undergoes, directly or indirectly, modifications bound to chronic or accidental contaminant exposure to which aquatic organisms such as fish are inevitably exposed.

Among estuarine fish species, European eel (*Anguilla anguilla*) is emblematic of great economical and ecological interest. Furthermore, it is recognized as an endangered species, listed in Annex II of the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) since all of their life cycle stages (glass, yellow and silver eel) have declined strictly in fisheries throughout most of their distribution area (Dekker, 2003). In this way, its population is considered to be outside safe biological limits (ICES, 2012) on account of overfishing, climate change, habitat reduction, hydraulic barriers, diseases and parasitic infection, (Dekker, 2003; Elie and Girard, 2009) and pollutant mixture. This fatty species is characterized by a high bioaccumulation potential for organic pollutants such as Endocrine Disrupting Compounds (EDCs), which may impair eel reproduction and further threaten their population (Geeraerts and Belpaire, 2010). On this basis, eels have been proposed as a bio-monitor model (Belpaire and Goemans, 2007; Belpaire et al., 2008) for evaluating the chemical quality of priority hazardous substances in biota and for monitoring the chemical status of European water bodies in accordance with the Water Framework Directive (European Commission, 2006b).

In this context, there is a major interest to study the influence of EDCs on eel parameters linked to the reproduction physiology such as the silvering. The European Community has established a list of more than 550 known or suspected EDCs (Santos et al., 2010). Polychlorobiphenyls (PCBs), dioxin like compounds (PCDDs, PCDFs), organochlorine pesticides, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), alkylphenols, and also plasticizers such as phthalates, are recognized as EDCs and could affect sexual maturation, development and reproduction of organisms living in impacted environments (van der Oost et al., 2003; van der Oost et al., 1996). Previous studies (Palstra et al., 2006) mentioned that polychlorinated biphenyls (PCBs) contamination and other dioxin-like compounds may seriously impair fertility and induce some diseases in eels and involve major problems for reproductive migration (van Ginneken et al., 2009).

In the Loire estuary, the contamination in POPs such as PCB has recently been assessed and European eels from this environment appeared moderately contaminated compared to eels from other major international estuaries, suggesting a moderate PCB and PCDD/F contamination of the Loire estuarine system (Blanchet-Letrouvé et al., 2014).

In order to assess a potential exposure to EDCs in fish, various bioindicators have been developed. Among them, vitellogenin (Vg) corresponding to a female-specific yolk protein precursor and energy reserve of eggs in oviparous vertebrates, appears as an excellent and valuable biomarker, both for exposure and effects (Matozzo et al., 2008; van der Oost et al., 2003). But among the Teleosts, the European eel is characterized by weak plasma Vg levels often undetectable in individuals in the natural environment, resulting in its peculiar biological life cycle and its gonochoristic and semelparous status. However, a recent study performed on eels from the Loire estuary has used q RT PCR as a highly sensitive and suitable

approach to quantify Vg mRNA transcripts in European eels. Vg transcripts were quantified in a proportion of 38 % among the individuals sampled, such as undifferentiated, yellow females, yellow and silver males (Blanchet-Letrouvé et al., 2014). However no clear impact on gonad histology may validate a potential ED. To date, no evidence for Vg endocrine disruption in European eels was reported even in heavily contaminated hydrosystems (for review see Geeraerts and Belpaire (2010).

In order to follow the investigation, this study is focused on the narrow windows available during the complex life cycle of the European eel (*A.a*). This endangered species for which the reproduction physiology is unknown in the field, presents a long growth continental phase (yellow eel stage), and performs, at the beginning of the sexual maturation, a fantastic metamorphosis to become prepubertal (silver eel stage). This progressive step which transforms yellow eels in silver eels, well known as silvering, seems to be the key of a better understanding contaminant impact (such as EDCs) on European eels successful reproduction.

Comparison of contamination levels of two major tissues (gonads and muscles) between yellow eels and silver eels at the onset of their downstream reproductive migration is the first narrow window of research investigating potential correlation between contaminants and silvering parameters. The second narrow window for experimentation is the upstream migration of the glass eels, coming from unknown spawning areas and not able to eat by themselves. These marine organisms entering in the estuary allow a comparison between their respective PCB contamination levels and those of migratory adults, despite their different ecology and metabolism. As Working Group (WG) on Eels (ICES, 2012) recommended the collection of data on the pollution and disease status of eels in order to identify areas producing high quality spawners (low contaminant levels and parasite burdens) and due to the knowledge gaps on eels studies relative to Endocrine disruption, the objectives of the present study are, 1- to compare the dl and ndl-PCB contamination levels between juvenile and prepubertal stages (yellow and silver) to investigate potential metabolic correlations between the two organs (gonads, muscle) during the silvering process; 2- to study dl and ndl-PCB contamination patterns between immature organisms such as glass eels and yellow eels, and potential genitors such as downstream silver eels, in order to estimate likely contaminant transfer between genitors dying after the hatching and glass eels coming back in estuarine waters; 3- to identify prospective correlations between Vg and aromatase mRNA induction, and PCB contamination levels in each matrix, which could mark abnormal reproductive function such as Endocrine disruption. Are there perceptible correlations between PCB contamination levels of both muscles and gonads, biometric indicators of the reproduction (IGS, silvering characteristics,...), and biomarkers (induction mRNA Vg, aromatase, parasitism,...) of European eels sampled in the Loire estuary, which could evidence potential endocrine disruption in this endangered species?

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Study area**

The Loire estuary is a macrotidal system located in the North Atlantic coast of France , characterized by a largest basin versant (117000 km<sup>2</sup>), which the dynamic tidal and the salinity limit remove from a hundred kilometer of the estuary (Figure 1). The different

sampling sites are detailed in (Blanchet-Letrouvé et al., 2014) and we focused in this study, only on the comparison between the eel maturation stages during its estuarine life (growth phase and silvering process step). Concerning the PCB contamination of the yellow European eels, a previous study has revealed a "site effect" along the Loire estuary, which remains moderately contaminated regarding others international estuaries (Blanchet-Letrouvé et al., 2014).

## **2.2. Sampled animals**

European eels (*Anguilla anguilla*) were caught by local fishermen in the Loire estuary located on the French Atlantic coast, according to the fishing authorizations. The species was chosen because of its collapsing, its place in the trophic chain (top-predator) and its economic value on this area (Perraudeau and Després, 2009). Furthermore, eels have been recommended as a bio-monitor model (Belpaire and Goemans, 2007; Belpaire et al., 2008) for evaluating the chemical quality of priority hazardous substances in biota and monitoring the chemical status of European water bodies in accordance with the Water Framework Directive (ICES, 2012). About 97 organisms were randomly captured along the Loire estuary during two seasons (May 2009 (yellow ones) and November 2010 (silver ones)). Among this population fraction, twenty three animals were analyzed in order to represent age class, from yellow eels to silver eels. Two pools of glass eels were added to the sampling (January 2011).

The glass eels were without pigmentation and corresponded to a stage before the onset of the feeding (Elie et al., 1982). After collection, eels were transported to the laboratory in aerated 200 L tanks with water from the sampling site. Then, they were maintained at laboratory under a natural photoperiod (L15/D9) and at a temperature around  $12^{\circ}\text{C} \pm 2$ , equivalent to the fishing site conditions until dissection. The glass eels were directly frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  in aluminum paper after fishing.

For the steroid exposure experiment, male European silver eels (*A. anguilla*) (body length (BL)  $400.2 \pm 3.7$  mm, body weight (BW)  $85.14 \pm 2.40$  g) were purchased from Rungis International Market (France), transferred to the laboratory (MNHN, Paris, France) and kept in running aerated freshwater tanks under natural photoperiod and temperature ( $15 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). They were not fed, as they are naturally fasting at the silver stage (Blanchet-Letrouvé et al., 2013). Animal manipulations were performed according to the guidelines of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators.

## **2.3. Sample collection**

### **2.3.1. Biometry**

Eels were anesthetized in a water bath of 10 L added with 1.5 to 2 mL of clove oil solution dissolved in ethanol (70%), in function of the weight of eels (Beullens et al., 1997; Palstra et al., 2007a). Once anesthetized, the body length (BL in mm) and the body weight (BW in g) of each European eel were measured. The animals were then sacrificed and dissected at  $4^{\circ}\text{C}$  in order to collect liver, gonads, muscles, gall bladder, digestive tract, swim-bladder and otoliths were also extracted. Pectoral fin length (PFL mm), horizontal (EDh mm) and vertical

eye diameters (EDv mm) on both eyes, were measured using a digital calliper. The following indices were calculated according to (Pankhurst and Lythgoe, 1983):

Ocular Index:  $OI = 100 \times (((EDh + EDv) \times 0.25)^2 \times (10 \times BL)^{-1})$

Gonado Somatic Index:  $GSI = 100 \times (\text{gonad weight} \times (\text{total BW})^{-1})$

Pectoral fin Index:  $PFI = 100 \times (PFL \times (\text{total BL})^{-1})$

Digestive tract Index:  $DTI = 100 \times (\text{digestive tract weight} \times (\text{total BW})^{-1})$

With the biometric data of the studied organisms, a condition factor K (Fulton Index) was calculated according to Ricker (1980):

$K = (BW \times 10^5) / BL^3$  where BW and BL respectively expressed as g and mm.

This index allows the evaluation of the health condition of eels.

The silvering is characterized by morphological and physiological changes: an increase of the gonad weight (GSI > to 1.2%), an enlargement of the ocular diameter (eyes are the most modified sensory organs), a lengthening of the pectoral fine, a skin coloration (back is greenish-brown, ventral surface is yellow during the sedentary growth phase, while back is blackish-brown and ventral surface silvery-white at the beginning of the oceanic migration of reproduction) and the regression of their digestive tract (eels cease to feed ).

### **2.3.2. Gonad histology**

Fixed sections of gonads were dehydrated, paraffin-embedded and cut (5 µm) with a microtome. Thin sections were colored with haemalin-eosin before observation with a light microscope coupled to an image analyzer to determine gender, reproductive development stage (undifferentiated, yellow, silver) according to previous studies (Beullens et al., 1997; Colombo et al., 1984; Huertas et al., 2006)

### **2.3.2. Otolithometry**

The otoliths permitted to determine the age of the organisms according to Vøllestad, (1988). The pair of otoliths named sagitta were removed of the eel's head. After extraction, otoliths were cleaned of all organic membranes in distilled water, dried with ethanol, and then stored in Eppendorf tubes. The age of each eel was determined by the number of increments starting from the nucleus which was considered as year 1 of the eel's life. The otolithometry was realized in partnership with the IRSTEA, Cestas, France, as previously described and more detailed in (Blanchet-Letrouvé et al., 2013).

### **2.3.3. *Anguillicola crassus* infection**

The swim-bladder was extracted, weighted, and next dissected to observe its infection status. The parasite *Anguillicola crassus* were identified according to Moravec et al. (1994) and each nematode counted was conserved into alcohol (70°C). In order to compare with other studies, a Parasite Index (PI) was calculated:  $PI = \text{Total parasite weight (PW)} / \text{Total BW}$  in g. The histopathological status of the swim-bladder was not investigated.

## **2.4. Polymerisation chain reaction: q RT PCR**

Tissue RNA extraction and cDNA synthesis were described in Blanchet-Letrouvé et al., (2013) and in vivo steroid hormones exposure performed according to Aroua et al. (2007) and Montero et al. (1995).

Gene specific primers previously designed for European eel beta-actin and Vg (Aroua et al., 2007; Pierron et al., 2009) were purchased from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Quantitative assays of eel beta-actin Vg and Aromatase (Arom) gene expression were set up using the Light Cycler 2.0 Platform (Roche) with Light Cycler FastStart DNA MasterPlus SYBR Green I sequence-unspecific detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. The PCRs were prepared with 4 µL of diluted cDNA template, 2 µL of PCR grade water, 2 µL of SYBR Green master mix and 1 µL of each forward and reverse primer (500 nM each at final concentration). q RT-PCRs for the three genes were performed as follows: an initial step of polymerase activation for 10 mn at 95°C; then 41 cycles with 10 s at 95°C for denaturation, 5 s at 60°C for annealing, 10 s at 72°C for primer extension. Directly after the amplification phase, a melting curve analysis was carried out to confirm the presence of a single PCR product. Serial dilutions of a pool of cDNAs from liver samples was used as standard and individual samples were assayed in duplicate. Each PCR run contained a non-template control and a calibrator to adjust the assay variations. Relative expression levels were calculated as previously described by (Weltzien et al., 2005). Vg and Arom transcript levels were normalized to the reference gene (beta-actin) RNA levels. Vg/actin and Arom/actin ratios were expressed as Arbitrary Units (AU).

## **2.5. PCB dioxin and non dioxin like analysis**

Eel muscles and gonads were analyzed for 18 PCBs (n= 23 and 2 pools of glass eels). The analytical procedures used in this study follow the instruction detailed by (Costera et al., 2006) et al, (2006). Among them, 4 are coplanar dioxin-like PCBs (77; 81; 126; 169), 8 are non coplanar dioxin-like PCBs (105; 114; 118; 123; 156; 157; 167; 189) and 6 are non dioxin-like PCBs (28; 52; 101; 138; 153; 180).

### **2.5.1 Reagents and Chemicals**

All organic solvents (Promochem) were Picograde® quality. Silica (Fluka), sodium sulfate (Merck), sulfuric acid (SDS) were of superior analytical quality. Native and <sup>13</sup>C-labeled standards were purchased from Cambridge Isotope Laboratories (CIL) and Wellington Laboratory. Standard solutions were prepared in iso-octane. All reference solutions were stored in darkness at a temperature < 6 °C.

### **2.5.2 Sample preparation procedure**

For each sample, eel tissues were collected, homogenated, weighed and freeze-dried. Five grams of tissues were cut, dehydrated, and milled using a turbo-mixer with glass bowl. Each experiment was realized with disposable material. Then, samples were powdered and transferred into cells in order to be extracted by Accelerated Solvent Extraction (ASE) using

a Dionex ASE 300. Before extraction, 18 <sup>13</sup>C-labelled PCB congeners were added to the samples for internal standard calibration and quantification by the isotope dilution method. Pressure and temperature were set to 100 bars and 120°C respectively. The extraction solvent was a mixture of toluene/acetone 70:30 (v/v), and three successive extraction cycles (5 min each) were performed. The extract was evaporated to dryness by rotary evaporation (40°C), permitting the gravimetric determination of the fat content in order to assess the muscle lipid weight (LW in % of wet weight). The extracts were dissolved in 25 mL hexane for sample clean-up. Three purification steps were then performed, using successively acid silica, Florisil and celite/carbon columns. After removal of fat on the first silica gel column activated with sulfuric acid, PCBs were separated from PCDDs/PCDFs on the second Florisil column. The separation of coplanar (non-ortho) PCBs from non coplanar PCBs was achieved on an activated mixture of Florisil/ Carboxpack C/Celite 545 (overnight at 130°C). After addition of external standards for the recovery calculation (<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCB #111 for PCBs), final sample extracts were evaporated under a nitrogen stream to dryness and reconstituted in 20 and 50 µL of toluene for coplanar PCBs and non coplanar PCBs, respectively.

### **2.5.3 GC-HRMS measurement**

PCB measurements were performed by Gas Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (GC-HRMS) using an 7890A gas chromatograph (Agilent) coupled to a JMS 700D or a JMS 800D double electromagnetic sector high resolution mass spectrometers (Jeol, Tokyo, Japan). A DB5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) capillary column (J&W) was used in splitless mode. The GC program for PCBs was 120°C (3 min), 20°C/min to 170°C (0 min), 3°C/min to 245 °C (0 min) and finally 20°C/min to 275°C (7 min). Ionization was achieved in the electron impact mode (42 eV electron energy). The spectrometric resolution was set at 10,000, and the signal acquisition was performed in the Single Ion Monitoring (SIM) mode focusing on the two most abundant signals from each target molecular ion (<sup>35</sup>Cl and <sup>37</sup>Cl isotopic contributions). Signals were integrated by JEOL Diok software (v.4).

### **2.5.5. Toxic equivalency calculation**

Toxic Equivalent Quotient values (TEQ) were calculated according to the 2005 World Health Organization Toxic Equivalency Factors (WHO., 2010) and basically expressed on a fresh weight basis.

### **2.5.4. Quality assurance and control**

All profile determinations were undertaken at LABERCA, (the French National Reference Laboratory in charge of PCDD/Fs and PCBs in food and feed). The procedure integrated the quality assurance parameters as required by European legislation (European Commission, 2006).

All these procedures integrated quality control parameters to fulfill the requirements of the Commission Directive 2002/69/EC and 2002/70/EC of July 2002 laying down the sampling

methods and the methods of analysis for the official control of dioxins and the determination of dl-PCBs in foodstuffs and feeding stuffs respectively. Moreover, all analyses were performed upon a double quality management system associating an accreditation according to the ISO 17025 standard and a certification according to the ISO 9001:2000 standard.

## 2.6. Statistical analysis

Kruskal-Wallis test followed by Multiple comparisons post-hoc test and Mann Whitney test were used to compare PCB levels between the different eel age classes and the different sexual maturation stages, respectively, for each matrix. Wilcoxon matched pair test was used to compare PCB levels between both matrices and the correlation were examined using Pearson correlation coefficient. Concerning PCB patterns, Kruskal-Wallis test followed by multiple comparisons post-hoc test was used to evaluate the differences between the different developmental stages. A Principal Component Analysis (PCA type Pearson (n-1)) was performed to compare PCB levels in eels muscles and gonads from different maturation stage organisms including biometric parameters and Vg/Arom mRNA expressions. Statistica and XLstat softwares were used to perform these statistical analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Health status of European eels from the Loire estuary

The eels (n= 23) measured  $623.2 \pm 158.6$  mm (range 487-1014 mm) for yellow eels and  $645.5 \pm 144.8$  mm (range 376-849 mm) for silver; eels (Table 1). They weighed  $527.6 \pm 625.5$  g (range 148-2233 g) for yellow and  $505.5 \pm 356.8$  g (range 278-1380 g) for silver. They had also a K condition factor of 0.16. The ocular index (OI) for yellow eels was  $5.84 \pm 2.1$ . and  $8.8 \pm 1.1$  for silver eels. These values were in accordance with (Pankhurst and Lythgoe, 1983). The pectoral fin index (PFI) showed little variation between yellow and silver eels and was  $4.1 \pm 0.6$  and  $4.4 \pm 0.7$  respectively. Furthermore, eels can accumulate high concentrations of pollutants due to their high lipid content ( $11.7 \pm 6.4$  % for yellow;  $25.6 \pm 3.5$  for silver) and longevity. Morphometric parameters, condition indices and biomarkers have been widely used to assess the health status of fish, including eels (Guimarães et al., 2010; Roche et al., 2000). In our study, eels presented apparently a safe health status. However some organisms presented a higher size and weight despite their immature characteristic and gonadal histology, which could result of individual variability or could highlight interrogations about their sexual maturation level.

Concerning the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus* (PI), 65.2 % of the fraction population sampling in the Loire estuary (n= 95) were parasited. These results are in accordance with (Acou et al., 2011). Among the twenty three PCB-analysed eels in this study, 43.5 % of the silvers individual and 21.7 % of the yellow eels were infested by this parasite.

The influence of the swim-bladder parasite *A. crassus* on the swim capacity and efficiency of silver eels was investigated in the (EELREP, 2005). New indices were developed to quantify parasite infection pressure and damage and it was observe that severe infestation reduced swimming speed as well as endurance. In addition, infection with this parasite increased the

cost of transport. As the infection did not decrease during 6 months under salt water conditions, the impact on swimming capacity is a factor of importance for genitors.

European eel was able to swim 5,500 km showing that energy reserves were, in principle, sufficient for migration to the Sargasso Sea. A value of 20% fat is also the average for migrating silver eels implying that only half of the silver eels is capable of successful migration and reproduction. In our study, all the silver individuals presented a sufficient fat stores. Surprisingly and interestingly, some biggest yellow eels exhibited higher percentage of lw (range from 2.4 to 20.2 %). This could suggest individuals beginning the silver process, eels in silvering reversal or eels presented metabolic abnormalities.

Our results exhibited strong sexual dimorphism in eels although the random sampling did not presented many males (yellow females:  $416 \pm 94$ cm; yellow males:  $328 \pm 46$ cm) (silver females:  $615 \pm 58$ cm; silver males:  $384 \pm 11$ cm), according to (Robinet and Feunteun, 2002).

### **3.2. PCB levels in both gonads and muscles in function of the development stage and the age class**

The comparisons of dl and ndl-PCB levels between the two matrices (muscles and gonads) according to the sexual maturation stage (yellow and silver eels), have been performed in function of age class (6-10; 10-13; >13 years) (Figure 2).

Regarding the continental long-life of the European eel and its bottom-dwelling conditions, age seemed to be a more relevant parameter than size to evaluate contaminant exposure. Indeed, size was slightly correlated to age as demonstrated in a previous study (Blanchet-Letrouvé et al., 2014), which could be explained by the strong sexual dimorphism and the sexual maturation of the eels. Moreover, size also varied according to sampling sites (Blanchet-Letrouvé et al., 2014), the diet and the individual variability (Adam et al., 2008). On the other hand, the use of age to examine PCB levels could be more relevant, because this species did not release yearly contaminants such as other organisms which spawn each reproductive season. Thus, contaminants could accumulate during all the continental life of, for which the age ranged from 6.5 to 16 for yellow individuals and from 7.5 to 21.5 for silver ones.

#### **- Comparison of levels in both matrices according to the age and considering each development stage**

Within the immature development stage, yellow eels belonging to age class >13 years exhibited significant higher ndl-PCB levels in muscles ( $280.9 \pm 156.8$  and  $819.2 \pm 324.1$  ndl-PCB  $\text{ng.g}^{-1}$  ww and dw respectively) than eels belonging to age class 6-10 ( $126.2 \pm 27.9$  and  $413.6 \pm 94.8$  ndl-PCB  $\text{ng.g}^{-1}$  ww and dw respectively) ( $0.05 \leq p < 0.1$ ). Considering the gonads of yellow eels, no significant difference was found between the different age classes. (Figures 2A, 2B).

Within the prepubertal development stage, no significant difference appeared whatever the matrix or the age class. The older silver eels are thus contaminated as much as the younger ones, although thirteen years of supplementary potential exposure. One possible explanation

might be that they have been less exposed during their continental life. It can be also suggested that PCB congeners have begun to be remethylated or released to another matrix such as liver, gills or gonads. On the other hand, it must be noticed the high individual variability of the age when the silvering began (from 7.5 to 21.5 years).

Thus, age appeared as an important factor for the yellow eels relatively to the muscles contamination and confirmed its relevant use for ecotoxicology of this species spending a long time into muds and sediments all its continental life.

#### **- Comparison of levels in muscles between yellow and silver eels**

Considering the muscles, the marked test between silver and yellow eels was significant at  $p < 0.05$  for the age class  $>13$ . Indeed, the muscles of the older silver eels ( $17.2 \pm 3.8$  years) were significantly less contaminated in ndl-PCBs expressed in  $\text{ng g}^{-1}$  lw ( $723.39 \pm 619.81$ ) than the yellow eel muscles ( $2258.30 \pm 643.71$ ) for which the mean age of individuals is  $14.2 \pm 1.6$  years.

This finding could also result of the long-time sedentary period of yellow eels collected in downstream as already described in previous work (Blanchet-Letrouvé et al., 2014). On the contrary, the migrant silver eels could come from less contaminated upstream areas, very far away of the mouth of the estuary. Indeed, eels colonized their aquatic environment in function of the population density, and also according to the diet and the environmental conditions. The biggest and older animals are usually alone and upstream whereas smaller ones are downstream (Adam et al., 2008) In the case of the Loire estuary, the fishing underlined a specific ecological area corresponding to a deep and rich trophic zone, where older eels seemed to be sedentarized. This zone was also greatly urbanized and under agricultural pressure which could partially explain the fact that these older and biggest yellow eels were more contaminated than the silver eels belonging the same age class. Furthermore, the biggest and older yellow individuals exhibited both immature (%lw:  $12.9 \pm 6.90$ ; high K:  $0.19 \pm 0.039$ ; DTI  $3.52 \pm 0.47$ ; GSI:  $0.62 \pm 0.21$ ) and prepubertal parameters closed to the silver ones (OI:  $8.08 \pm 1.18$ ; PFI:  $4.43 \pm 0.76$ ) according to the silvering parameters defined by Durif et al.(2009) (see Table 1). Interestingly, these older yellow eels belonging to the age class  $>13$ , and exhibited the higher PCB contamination muscle levels. It could be suggested that these older specimen were still resident yellow eels, because of their PCB levels which could eventually modify the metabolic pathway of lipidogenesis such as demonstrated by (Geay et al., 2011) for the European sea bass.

On the contrary, they could have begun a prepubertal metamorphosis and performed a "silvering reversal" because of their poor health status (Durif et al., 2005). However, further considerations may be necessary for the assessment of this hazard according to the great individual variability of this species.

#### **- Comparison of levels in gonads between yellow and silver eels**

Concerning the gonads, our results did not permit to observe significant differences between yellow and silver eels. This could be in part the result of the high variability of the lipid weight into the gonads whose the mean for yellow eels is  $18.1 \pm 16.0$  % whereas the mean for silver eels is  $34.4 \pm 13.5$  %. However, when we considered each age class, the yellow individuals belonging to the age class 6-10 exhibited  $38.19 \pm 11.24$  % of lw whereas the eels from both other age classes were at least two fold less fatty (10-13:  $11.03 \pm 9.53\%$ ;  $>13$ :  $15.16 \pm 9.87\%$ ). The percentage of fat in yellow individuals belonging to the age class 6-10 was close

to those of silver eels belonging to the same age class (6-10) ( $42.29 \pm 24.10\%$ ) while the gonads of these organisms were in immature status.

### **- Comparison of levels between muscles and gonads within one development stage**

As such, the comparison between both matrices could allow to understand how the contamination levels vary from a biological compartment (muscle) to another (gonad) according to the changes occurring between the growing phase (immature yellow eels) and the prepubertal phase (silver eels).

In order to evaluate if a significant "sexual maturity effect" was observable, the statistic tests were performed between the two biological matrices according to the development stage (yellow immature and prepubertal silver eels).

Among the yellow eels, the comparison of the dl and ndl-PCB levels in muscles and gonads in function of the age class, exhibited significant difference only in fish belonging to the age class 6-10 ( $p < 0.1$ ). Indeed, in this class, gonads showed ndl-PCB levels ( $292 \pm 39.8$ ,  $613 \pm 95.3$  ng.g<sup>-1</sup> ww, dw respectively) higher than those of muscles ( $126 \pm 27.9$ ,  $413 \pm 94.8$  ng.g<sup>-1</sup> ww, dw respectively). The same trend was observed for dl-PCBs (gonads:  $53.1 \pm 13.0$ ,  $114 \pm 40.9$  ng.g<sup>-1</sup> ww, dw respectively; muscles:  $23.1 \pm 7.6$ ,  $76.6 \pm 27.2$  ng.g<sup>-1</sup> ww and dw respectively). According to lw, the muscles were more contaminated than gonads (ndl-PCB:  $819 \pm 276$  ng.g<sup>-1</sup> lw in gonads,  $2047 \pm 1573$  ng.g<sup>-1</sup> lw in muscles; dl-PCB:  $150 \pm 57.4$  ng.g<sup>-1</sup> lw in gonads,  $383 \pm 290$  ng.g<sup>-1</sup> lw in muscles).

Among the silver eels, a significant difference appeared for dl and ndl-PCBs contamination levels between muscles and gonads, for both age classes of 6-10 ( $p < 0.1$ ) and 10-13 years ( $p < 0.05$ ). Indeed, gonad ndl-PCB levels (expressed in lw and dw) were significantly higher contaminated than those of muscles in the age class of 6-10 years (gonads:  $763 \pm 330$ ,  $542 \pm 243$ , muscles:  $587 \pm 154$ ,  $343 \pm 70.9$ , in lw and dw respectively). The same trend was observed in silver eels belonging to the age class 10-13 years for ndl-PCBs (gonads:  $329 \pm 177$ ,  $1019 \pm 506$ ,  $677 \pm 341$ ; muscles:  $258 \pm 135$ ,  $958 \pm 449$ ,  $569 \pm 278$ , in ng.g<sup>-1</sup> ww, lw and dw respectively) and dl-PCBs (gonads:  $65.2 \pm 38.9$ ; muscles:  $52.0 \pm 34.2$  in ng.g<sup>-1</sup> ww).

Migrant silver eels begun to starve at the onset of the silvering and lipid muscles are mobilized because any energy could come from the diet. At this moment, some PCBs could be released in the blood due to the energetic metabolism necessary for the swimming. At the same time, the gonad weight begun to increase on account of lipid incorporation into droplets (corresponding to the beginning of the sexual maturation and the onset of the oogenesis), and could intake these circulating PCBs. It could also suggest that the older silver eels have lost some PCBs, particularly those having the lower half-life time (de Boer and Hagel, 1994). These results underlined the physiologic and metabolic transformations linked to the silvering process which could modify the organotropism of PCBs. The accumulation mechanisms, uptake and elimination pathways have been evaluated in the sea bass, through bioaccumulation factors and bioaccumulation models by Antunes et al. (2007) and Ferreira et al. (2008) who showed a higher elimination of PCBs by mature females at the end of the spawning period. But, in the case of the eels, and according to their semelparity, no elimination could be performed by the spawning process.

What happened when the lipid weight of each matrix is observed more precisely according to each PCB congeners?

### **3.3. PCB congeners concentrations expressed in lw in both matrices according to each development stage (immature yellow and prepubertal silver)**

Correlations between PCB levels of each congeners (expressed in lw) in both matrices, muscles and gonads, were examined according to the development stage (glass eels, immature yellow and prepubertal silver) (Table 2).

Regarding the yellow organisms, no correlation was observed, although the congener 81 was close to the correlation.

For the silver individuals, stronger correlations between levels in both matrices were found. The results were highly significant ( $p < 0.00001$ ) for congeners # 153, 138, 180, 126, 157, 105, 156. Ten other PCBs, # 167, 189, 118, 169, 123, were stronger correlated ( $0.0002 \leq p \leq 0.005$ ) and congeners # 114, 77, 52, 28, 101 were moderately correlated ( $0.0107 \leq p \leq 0.03$ ), whereas the congener 81 exhibited no correlation ( $p > 0.5$ ).

These results demonstrated a link between the PCB contamination levels of muscles and gonads, according to the lipidic fraction of these organs, exclusively for silver eels. It underlined a dependence between the contaminated lipids present in the silver eels gonad and the fat stored in the muscles during the growing phase, which was remobilized at the onset of the silvering for the beginning of the ovogenesis. The ovogenesis is regulated by steroidogenesis through the cortisol way and under control of the hypothalamus axis (Dufour et al., 2003; Sbailhi et al., 2001; Vidal et al., 2004). Contaminants linked to these muscle lipids could thus interact with biochemical processes of the reproduction function during the complex and sensitive window represented by the silvering metamorphosis (van Ginneken et al., 2009). This prepubertal step constituted the major difference between yellow and silver eels and the key to the success reproduction.

By contrast, the lack of correlation concerning the yellow eels highlighted the presence of another lipid metabolism for animals in growing continental phase, without observable exchange between muscles and gonads, underlying a "maturation effect" of the behaviour of the PCBs, briefly identifying previously with the correlation gonad/muscles.

These results characterized the lipid metabolism modifications during the silvering process, occurring progressively between immature and prepubertal eels. During the continental life, the yellow eels accumulated fat in their store tissues including PCBs (gonads:  $1075 \pm 539$ ;  $198 \pm 103$  < muscles:  $2054 \pm 1066$ ;  $359 \pm 189$ , ndl and dl respectively, expressed in  $\text{ng.g}^{-1}$  lw). At the onset of the sexual maturation, the silver eels prepared their organism to a long journey towards the spawning area and begun to use these fat stores, discharging at the same time lipids link to PCBs into the blood, towards liver, gills, muscles and gonads (Geay, 2011). The more and less strong correlations between PCB levels of muscles and gonads expressed in lw could underlined a specific behavior of each PCB to the different fatty acids composing each organ. Indeed, the fish lipids included until 40% of fatty acids with long chain (14 to 22 carbon atoms) highly unsaturated (Opstvedt, 1985)). Among those, the muscle represented the major storage tissue in the eel, with more than 20% of lw (Tocher, 2003). Comparatively, gonads will increased about 40 to 60% during the maturing phase (van Ginneken et al., 2009).

Moreover, the number and position of chlorine atoms on both phenyl rings determined the spatial structure of congeners and their toxicity according to their mechanism of action. Among the PCB studied the most correlated, the ndl congeners 153, 138, 180 had a mechanistic action different from those of dioxins/furans whereas the co-planar dl congeners 126,, highly chlorinated, presented the same toxicity mechanism than dioxins and furans binding the same receptor (AhR) (van Ginneken et al., 2009). Many experimental and *in vitro* studies had been performed to observe the effects of PCBs on the reproduction via the activation of these receptors (van Ginneken et al., 2009). According to Yadeti et al.; (2014), the non-coplanar PCBs such as PCB 153 may act via the steroid and xenobiotic receptor (SXR), also called pregnane X receptor (PXR), and the constitutive androstane receptor (CAR). PCB 153 is among the most persistent congener, with residence time in the environment exceeding 100 years in toxicological investigations (Jonsson et al., 2003). Toxic effects of PCB 153 included possible endocrine disruption and may also act as metabolic disruptors contributing to growing incidence of metabolic diseases (Casals-Casas and Desvergne, 2011). Studies using zebrafish (*Danio rerio*) suggested that fish can be useful models in exploring effects of environmental chemicals that may act as metabolic disruptors (Jonsson et al., 2003; Tocher, 2003)

Finally, according to our results, a migrant silver eel of average 500 g ww which leaved the Loire estuary for its reproduction migration of 6000 km, carried 26 µg of dl and 110 µg ndl PCBs in its muscles to which added 0.9 µg of dl and 4 µg ndl PCBs in its gonads. According to Palstra et al. (2006), PCB have deleterious effects on the embryonic development and the disrupting effects occurred at levels below 4 ng TEQ.kg<sup>-1</sup> gonad, based on dioxin and dl compounds. In comparison, our results highlighted a contaminant level of 18.5 ng TEQ<sub>(WHO 1998)</sub>.kg<sup>-1</sup> de gonad expressed in ww. Although the silver eels were at the onset of their reproductive migration, it could suggest that these contamination levels within the gonads could likely involve heavy disrupting effects in the future eggs.

### **3.4. PCB patterns in both matrices (muscles and gonads) according to each development stage**

PCB patterns allowed to underline the importance of some congeners in comparison to others. They also permitted to follow the proportion evolution of PCB congeners from glass to silver eels, including yellow stage.

Two types of pattern comparison were performed: the first one compared both matrices for each development stage, the second compared the different development stages according to each matrix (Figure 3).

Concerning the glass eel life stage, seven PCB out of eighteen represented 93.1% of the PCBs with a representativeness superior to 5%: congeners # 153 (22.55 ± 1.84%), 138 (16.03 ± 5.91%), 101 (15.70 ± 1.70%), 52 (13.20 ± 11.04%) 118 (12.20 ± 6.80%), 28 (7.56 ± 7.42%) and 105 (5.83 ± 4.08%) (Figure 3).

Differently to glass eels, yellow organisms showed five majority PCBs in their muscles: congeners #153 (39.81 ± 2.92%), 138 (23.07 ± 1.18%), 180 (14.33 ± 3.13%), 118 (8.34 ± 1.2 %) and 101 (5.66 ± 1.62%) corresponding to a total of 91.2%, whereas gonad patterns presented similar percentages for these congeners: #153 (38.48 ± 1.9%), 138 (24.09 ± 1.90%), 180 (14.62 ± 3.48%), 118 (9.00 ± 1.45%) and 101 (5.23 ± 1.87%), corresponding to 91.4% of the total.

The silver eels exhibited five major PCBs superior to 5%: # 153 ( $36.43 \pm 3.38\%$ ), 138 ( $23.48 \pm 1.54\%$ ), 180 ( $13.47 \pm 4.81\%$ ), 118 ( $9.96 \pm 2.24\%$ ) and 101 ( $5.94 \pm 2.56\%$ ) corresponding to a total of 89.3% of PCBs found in muscles. A same pattern was observed for their gonads: # 153 ( $37.1 \pm 2.56\%$ ), 138 ( $23.22 \pm 2.05\%$ ), 180 ( $12.19 \pm 3.52\%$ ), 118 ( $10.72 \pm 2.24\%$ ) and 101 ( $6.54 \pm 2.44\%$ ).

Interestingly, since the proportions of PCB # 28, 77, 81, 126, 157, 167 and 169 represented less than 5% of the total contaminants, they varied significantly between organisms belonging to the three different development stages considered. Furthermore, these congeners belonged to the most toxic PCBs and represented a potential risk for the eel health considering the high contamination levels of gonads.

These great variations of percentage and the rebalancing between congeners might be explained by ecological, biological and biochemical characteristics of glass eels compared to yellow and silver eels.

In order to give signification to these percentages, statistical analysis were performed and PCB congener proportions in eel muscles were compared to those in gonads at different development stages of the eel life cycle (glass eels, immature yellow eels and silver prepubertal eels).

#### **- Intermatrical comparison among yellow eels**

Among the yellow eels, no significant difference between muscle and gonad PCB patterns appeared for 14 congeners: # 105, 114, 123, 126, 156, 157, 167, 189, 28, 52, 101, 138, 153 and 180. PCB 77, 81, 118 and 169 ( $p < 0.1$ ) were more highly represented in gonads ( $0.4 \cdot 10^{-2} \pm 0.4 \cdot 10^{-3}\%$ ;  $0.7 \cdot 10^{-3} \pm 0.7 \cdot 10^{-3}\%$ ;  $9.00 \pm 1.45\%$ ;  $0.4 \cdot 10^{-2} \pm 0.2 \cdot 10^{-2}\%$ , respectively) than in muscles ( $0.2 \cdot 10^{-2} \pm 0.1 \cdot 10^{-2}\%$ ;  $0.3 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3}\%$ ;  $8.34 \pm 1.2\%$ ;  $0.3 \cdot 10^{-2} \pm 0.5 \cdot 10^{-3}\%$ , respectively).

#### **- Intermatrical comparison among silver eels**

PCB proportions in silver muscles presented percentages significantly higher ( $p < 0.1$ ) than silver gonads for congeners: # 126 ( $0.034 \pm 0.011\%$ ;  $0.032 \pm 0.012\%$ ), 169 ( $0.005 \pm 0.003\%$ ;  $0.004 \cdot 10^{-2} \pm 0.002 \cdot 10^{-2}\%$ ), 156 ( $1.64 \pm 0.26\%$ ;  $1.59 \pm 0.24\%$ ) and 28 ( $1.15 \pm 0.59\%$ ;  $0.64 \pm 0.24\%$ ), respectively. The PCB 81 did not exhibit significant difference which was in conformity with the results above, showing the absence of correlation between silver muscles and gonads for this non-ortho dioxin-like PCB congener.

These proportion variations in the eels within each development stage seemed interesting to bring information on the relative importance of the different accumulation pathways of PCBs during the growing phase on one hand, and during the onset of the silvering on the other hand. Indeed, the PCB redistribution between the muscle and the gonad of the yellow eels was based on three non ortho-substituted dl-PCB (77, 81, 169). Among those, the hexachlorinated, # 169, was non-metabolized (Kannan et al., 2000). In silver eels, this congener exhibited higher percentages in muscles than in gonads, highlighting its bioaccumulation in silver muscles and its lesser remobilization to the gonad during the maturation. Similarly to this congener, the congener 118 was a dl-PCB mono-ortho substituted, high chlorinated which is able to bind the Ah Receptors, such as the dioxins. Highly persistent, these dl-PCB appeared as interesting markers to follow the lipophilic contamination between the development stages especially during the onset of the gonadic maturation.

Among these principal PCBs characterizing the significant differences between muscle and gonad within both immature and prepubertal stage, the congeners 77, 126 and 169 were coplanar PCBs, recognized as the most toxic congeners (with 3, 5 and 6 chlorine atoms respectively) (Tanabe et al., 1987; Tapie et al., 2011). At the same time, some estrogenic effects were highlighted concerning the capacities of the congeners 77 and 126 to induce ER expression genes.

#### **- Comparison of each PCB congener within the muscles between the different developmental stages**

Concerning the muscles, the comparison of the percentage of PCBs between yellow, silver and glass eels exhibited no significant differences ( $p < 0.1$ ) for congeners # 105, 114, 123, 156 and 118.

Significant differences were observed between glass eels and yellow eels only for PCB congeners # 77, 153, 81, 126, 169, 28, 52 and 101 ( $0.0005 < p \leq 0.05$ ). Among these PCBs, glass eels presented a higher percentage of PCB 77 ( $0.09 \pm 0.07$  vs.  $0.2 \cdot 10^{-2} \pm 0.1 \cdot 10^{-2}$ ), 81 ( $0.5 \cdot 10^{-2} \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$  vs.  $0.3 \cdot 10^{-3} \pm 0.1 \cdot 10^{-3}$ ), 126 ( $0.04 \pm 1 \cdot 10^{-4}$  vs.  $0.018 \pm 4 \cdot 10^{-3}$ ), 169 ( $0.6 \cdot 10^{-2} \pm 0.1 \cdot 10^{-2}$  vs.  $0.3 \cdot 10^{-2} \pm 0.5 \cdot 10^{-3}$ ), 28 ( $7.56 \pm 7.42$  vs.  $0.29 \pm 0.08$ ), 52 ( $13.20 \pm 1.68$  vs.  $2.07 \pm 0.53$ ) and 101 ( $15.7 \pm 1.68$  vs.  $5.66 \pm 1.62$ ) and lower for PCB 153 ( $22.55 \pm 1.84$  vs.  $39.81 \pm 2.92$ ) and 180 ( $4.38 \pm 0.29$  vs.  $14.33 \pm 3.13$ ), whereas any significant difference appeared for congeners # 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189, 138.

Moreover, glass eels and silver muscles presented percentages significantly different for PCB 157 ( $0.18 \pm 0.19$  vs.  $0.37 \pm 0.07$ ;  $p < 0.05$ ), 167 ( $0.67 \pm 0.18$  vs.  $1.08 \pm 0.12$ ), 189 ( $0.09 \pm 0.03$  vs.  $0.20 \pm 0.1$ ), 138 ( $16.03 \pm 5.91$  vs.  $23.48 \pm 1.54$ ), 52 ( $13.20 \pm 11.04$  vs.  $2.33 \pm 0.94$ ) and 101 ( $15.70 \pm 1.68$  vs.  $5.94 \pm 2.56$ ) with  $p < 0.1$ .

The pattern comparison between yellow muscles and silver muscles, showed that the congeners 126 ( $0.18 \cdot 10^{-2} \pm 0.4 \cdot 10^{-2}$  vs.  $0.034 \pm 0.01$ ), 169 ( $2.9 \cdot 10^{-3} \pm 0.5 \cdot 10^{-3}$  vs.  $4.7 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-2}$ ), and 28 ( $0.29 \pm 0.08$  vs.  $1.15 \pm 0.60$ ) presented significant different proportions ( $0.0005 < p < 0.01$ ) whereas congeners 77, 180, 153, 81, 157, 167, 189, 138 showed no difference.

Furthermore, no significant difference was observed for five congeners # 105, 114, 118, 123 and 156, whatever the development or maturation stage stage which underlined a stability throughout the life cycle of eels. These PCBs seemed to be not or few redistributed.

#### **- Comparison of each PCB congener within the gonads between the different developmental stages**

Concerning the gonads, the comparison of the PCB percentages between yellow, silver and glass eels exhibited no significant differences for congeners # 105, 118, 123, 156, 169, 157, 189. However, the congeners # 153 ( $38.5 \pm 1.9$  vs.  $22.55 \pm 1.84$ ), 180 ( $14.6 \pm 3.5$  vs.  $4.38 \pm 0.29$ ) and in a less extent the PCB 167 ( $1.1 \pm 0.14$  vs.  $0.67 \pm 0.18$ ) and 138 ( $24.1 \pm 1.9$  vs.  $16.03 \pm 5.9$ ), were significantly more represented in yellow gonads than in glass eels ( $p < 0.1$ ). The congeners 126 ( $0.04 \pm 0.9 \cdot 10^{-4}$  vs.  $0.02 \pm 0.4 \cdot 10^{-2}$ ), 28 ( $7.56 \pm 7.42$  vs.  $0.3 \pm 0.1$ ), 52

( $13.2 \pm 11.04$  vs.  $1.8 \pm 0.8$ ), and 101 ( $15.7 \pm 1.68$  vs.  $5.23 \pm 1.9$ ) were greater represented in glass eels than in yellow eels. Significant differences have been shown between silver eels and glass eels concerning PCBs 77 ( $2 \cdot 10^{-3} \pm 1 \cdot 10^{-3}$  vs.  $4 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-3}$ ), and 81 ( $4 \cdot 10^{-3} \pm 2.6 \cdot 10^{-3}$  vs.  $0.4 \cdot 10^{-3} \pm 0.6 \cdot 10^{-3}$ ), highly represented in glass eels and 167 ( $1.12 \pm 0.17$  vs.  $4 \cdot 10^{-3} \pm 4 \cdot 10^{-3}$ ), highly represented in silver gonads.

The pattern comparison between yellow gonads and silver gonads showed that the congeners 126 ( $0.02 \pm 0.4 \cdot 10^{-2}$  vs.  $0.03 \pm 0.01$ ), 28 ( $0.30 \pm 0.10$  vs.  $0.64 \pm 0.24$ ) and 114 ( $0.14 \pm 0.03$  vs.  $0.17 \pm 0.03$ ) were in higher proportion in silver gonads. No significant difference was noticed for congeners 105, 118, 123, 156, 157, 169 and 189.

Our findings allowed to follow the congeners during the life cycle of the eel, although there were some gaps in its knowledge. The more and less important of PCB distribution congeners in organisms reposed on several possibilities of contamination: a direct exposure through the water column, sediments, food pathway, or a materno-foetal relation. Their presence varied also according to the physico-chemical properties (structure and resistance to metabolic degradation of each congener), the capacities of detoxification or bioaccumulation of the eel and the exposure levels (Robertson and Hansen, 2001).

These variations could be also explained by the lipid composition of each organ, muscles being essentially constituted by triglycerids (TG) and gonads by polyunsaturated fatty acids (AGPI) (Ghazali et al., 2013; Mazzeo et al., 2010). Furthermore, the majority of PCBs are ubiquitous in the environment, and their distribution in environmental compartments (water, air, sediment, biota,...) varied according to their chlorination levels and their solubility. These properties could help the understanding of the respective contamination of each development stage of the eel.

### **3.5. Conceptualization of potential transfer of PCBs**

These different information were synthesized on a diagram which conceptualized the significant differences of PCB proportions through the available eel life cycle part to the experimental investigation (Figure 4).

Finally, this study demonstrated a maturation stage effect, since the presence and proportion of PCBs varied according to both analyzed organs and according to the sexual stage yellow and silver.

This might be in relation with the lipid composition of each matrix, and their modifications during each metabolic transformations occurring along the life cycle of the eel, such as lipodogenesis and lipolysis (Sutharshiny et al., 2013).

Our findings exhibited that some PCB congeners appeared very interesting to follow between the three development stages observed. Concerning the glass stage compared to the yellow one (muscles), half of the PCB congeners were redistributed; this could be explained by the great differences of ecological conditions of these two stages and by the onset of the feeding of the young eels. The glass eel stage evolution is an essential step towards the yellow stage, characterized by a great increase of the size and the weight, especially for the female.

This stage was performed for 8 to 10 years in males and 10 to 20 in females, increasing the exposure to potential contaminants by trophic, cutaneous and branchiae pathways.

Between silver gonads and glass eels, fifteen PCBs among the eighteen tested presented no significant differences, suggesting a contaminant background which could be transfer along the life cycle from silver eels to glass eels including oocytes, eggs, larvae.

Finally, no significant variation of the proportions was found for four congeners # 105, 123, 156, and 118, whatever both the development stage and the matrix exposed: They can be considered as good markers of the PCBs contamination over the life cycle of the European eel. This great homogeneity between the development stages underlined a high stability of these congeners compared to others. We could suggest that this stability in the PCB proportions corresponded to the internalization of some PCBs which finally protected the eel against their toxicity. Their consistency could also translate no difference within exposure during their life cycle or similar metabolic processes.

On the opposite, the proportion variability could underline metabolization processes and exhibited some congener PCB as marker of a development stage. Among these PCBs, the non-metabolizable dl-congeners, persistent and weakly volatile, could be considered as markers (de Boer et al., 2010; Tapie et al., 2011) such as congeners 126 and 169. Indeed, as their proportions significantly increased compared to yellow muscles, these PCBs and PCB 28 could be considered as markers of the silvering process corresponding to the prebupertal metamorphosis. Their constancy in glass eels could also sign a real exchange of these contaminants during the hatching, from oocyte yolk to embryos, suggesting a materno foetal transfer.

Finally, the congeners 77, 81 and 167 could sign the glass eel phase. Indeed, although very volatil and few chlorinated, these two first dl ortho congeners were average forty times and respectively more higher in glass eel tissue than in silver gonads to which they come from whereas the third dl non-ortho congener was average two fold higher in gonads at the onset of the downstream reproduction's migration. These glass eels, having a higher proportion in congeners 77 and 81, could be followed through the step of the eel maturation, from the growing to the silvering. Indeed, the glass eels resulted of the metamorphosis of larvae called leptocephali when they arrived closed to the continental shelf, average twelve or eighteen months later (Bardonnet and Riera, 2005a)The migration being in direct relation with great oceanic currents, the larvae were in contact with contaminants during their pelagic journey and exposed by the water pathway. In our study, when the glass eels entered in the Loire estuary, they presented roughly fifty times more of congener 77 than the yellow eel muscle, whereas the yellow gonad exhibited approximately twice as these muscles. However, as the glass eels did not feed (Bardonnet and Riera, 2005b; Bureau Du Colombier et al., 2007), this congener proportion was not linked to the food pathway and the growing phase, but could sign a water exposure of the larvae occurring before resumption of feeding. Anyway, the glass eels exhibited particularly congener percentages for dl PCB 77, 81 and ndl PCB 28, low chlorinated and volatile, characteristic of a water exposure or a recent high contamination.

Although this congener 77 is a metabolizable dl PCB, it was one of the most toxic (Tapie, 2006). It could be suspected that this tetrachlorobiphenyl, demonstrated as antioestrogenic in

juvenile fish (Arukwe et al., 2001), could disrupt the glass eels which represent a critical development window towards the sexual differentiation.

The glass eels became yellow eels after a long growing period, exposed essentially to sediment, water and food during an average of seven to twenty years. PCB congener 81 (3,4,4',5-tetrachlorobiphenyl) has been detected in fish tissues from various sites in North America. The embryotoxicity of this compound to medaka (*Oryzias latipes*) and the induction of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were determined to assess the toxic potency of this compound relative to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and two other non-ortho-substituted PCB compounds, congener 77 (3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl) and congener 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) (Harris 2009).

On the opposite, the most important variation of congener percentages could correspond to the departure of congeners towards the maturing gonads, indicating the influence of the silvering. In fact, when the prepubertal female had ceased to feed, the fat reserve of the silver muscle began to be used and the proportion of congeners could consequently increase or decrease. Between silver muscles and glass eels, the congeners 157, 167, 189 and 138 expressed an increase of their percentage whereas 52 and 101 were more represented in glass eels.

### **3.6. Correlation between contaminant levels, biometric parameters and biomarkers**

In order to evaluate the correlation between biometric parameters, indices linked to the sexual maturation (GSI, OI, PFI, DTI), biomarkers (mRNA Vg and Aromatase expression) and PCB contamination levels in muscles and gonads (expressed in  $\text{ng.g}^{-1}$  ww and lw), a principal component analysis (PCA) was performed.

This PCA included yellow and silver eels ( $n=22$ ). One individual which presented very high level of Vg mRNA expression was excluded for the consistency of the values. The correlation loading and sample representation were shown on Figure 5. This analysis allowed to observe significant correlations between active and supplementary variables.

The two principal components (respectively PC1 and PC2) together explained 49.94% of the total variability among the eels. The first axis was explained mainly by the ndl and dl- PCB levels in muscles expressed in lw and the biological parameters GSI, DTI and the percentage of lw in the muscles. The second axis corresponded to ndl and dl-PCB levels in the gonads, expressed in ww and lw according to the sexual maturation stage (silver and yellow female eels).

Interestingly, the third axis was explained by the ndl-PCB levels in muscles expressed in ww and also by the induction of mRNA Aromatase, the parasite index, the age and the percentage of fat in the gonads.

The eels were clustered according to both sexual maturation stage (immature yellow and prepubertal silver eels) in one side and contamination levels, in the other side. Surprisingly, the contamination levels of gonads were not correlated to a development stage.

The silver females exhibited positive correlations with the percentage of lw in muscles, OI, GSI, and negative correlations with DTI and ndl, dl-PCB contamination of the muscles (expressed in lw).

On the other hand, the yellow females were positively correlated to ndl and dl-PCB levels in muscles expressed in lw and to the DTI, but negatively correlated to OI, GSI and the

percentage of fat in muscles. These observations validated both the histological determination of the sex and the gonad maturation level between yellow and silver individuals. This confirmed also the starvation entering of the silver eels and, on the contrary, the active growing phase of the yellow eels which maintained their feeding. According to the correlations observed with the PCB levels in muscles, these results underlined a contamination by the trophic way during the continental growing phase for yellow eels, whereas the negative correlations could correspond to the onset of the contaminant remobilization at the beginning of the silvering from the muscle fat. Indeed, the silver eels ceased to feed and started to perform the endogen lipidogenesis from the fatty acids internalized (stored) into the muscles during the immature yellow stage.

Interestingly, the GSI was strongly correlated ( $p=0.05$ ) to the muscle lipid proportion but also to the PI, whereas the DTI was negatively correlated to the lipid percentage in muscles and in gonads. GSI also showed negative correlations with dl and ndl-PCB in muscles expressed in lw, which was in agreement with the results obtain by Palstra et al. (2006). Indeed, these authors underlined negative correlation between dioxin and dioxin-like contaminants and embryo survival and development, with concentrations of contaminants inferior to 4 ng TEQ/kg gonad. These information proved once again that the silver eels have begun their starvation, which involved a decrease of the PCB levels in muscles on account of the stored fat use. In fact, the silver eels began their downstream migration and need energy to swim since they did not feed any more. The lipids were oxidized and released into the blood, but at the same time, PCBs were removed. They could be excreted by gills or feces or internalized into another organ such as the gonads. In our study, strong correlations were found between the contaminant levels of both muscle and gonad for each PCB congener expressed in lw. In addition, a significant link was highlighted between the increase of the GSI and the decrease of the muscle contaminant levels expressed in lw. This observation confirmed the PCB transfer between muscles and gonads occurring during the silvering, *via* the lipid way. However, no correlation was observed between GSI and dl, ndl-PCB in the gonads during this prepubertal metamorphosis. The silvering involved the detoxification of the muscles, where lipophilic contaminants were stored and stabilized. Indeed, the fastest way to get rid of PCBs is to store them in lipid tissue, a metabolic relatively inactive compartment (Bruijs et al., 2002). The correlation between GSI and the lipid percentage in the muscles was in agreement with Van Ginneken who underlined (2008) the relation between the percentage of lipid needed to both swimming during 6000 km and preformed the gonadogenesis for the reproduction success.

Concerning biomarkers, mRNA Vg expression was not correlated to a sexual maturation stage, neither to the levels of PCBs. This was in agreement with a Belgium field study, where no correlation was found between plasma Vg content, body weight, length, condition index, fat content and contaminants, despite a very high internal load of endocrine disruptors (PCBs, organochlorine pesticides, metals) (Versonnen et al., 2004). Indeed, under natural conditions, Vg is only produced by mature female fish as a yolk precursor and has therefore been widely used to detect exposure to compounds with estrogenic properties (Blanchet-Letrouvé et al., 2014; Versonnen et al., 2004; Gillemot, 2003). It is possible that endocrine disrupting effects of pollutants become really measurable later, perhaps just at the spawning time. But, even if the eel did not reveal estrogenic effects at proteomic levels, the transcriptomic level seemed to be affected.

On the other hand, mRNA Vg induction presented a significant correlation with the parasite index. This result was in accordance with a recent study which found that parasites could induce endocrine disruption in fish (Trubiroha et al., 2010). According to Fazio et al. (2008), eels naturally infected by macroparasites expressed differential genes, which could partially explain the induction of the mRNA Vg expression. Moreover, the infestation by the parasite *Anguillicola crassus* could also impaired the reproduction success as reported by Palstra et al. (2007a). Our results could suggest a modification of Vg gene induction, either indirectly by the parasite according to an unknown action mechanism, or more directly by the host itself which could response to the infection by this estrogenic effect.

In the present study, 43.5 % of the silver individuals and 21.7 % of the yellow eels are infested by this parasite. Although the silver eels were two fold more infected than yellow ones, this infection was no correlated to a sexual maturation stage, contrarily to the study of Palstra et al., (2007b), who demonstrated a link between this infestation and the migrant prepubertal eels. Indeed, swimming performance of silver eels was severally impaired by this parasite also well-known to influence the metabolism of pollutants such as PCBs in infested eels (Palstra et al., 2007b). On the other hand, Sures and Knopf (2004) had experimentally shown that PCB 126 suppressed the humoral response immune and increased the incidence of infection by *Anguillicola crassus* in European eels. However, our results underlined the absence of correlation between PCB contamination and parasite index on eels sampled in the field.

The mRNA Arom expression was correlated to the dl and ndl-PCB of the muscles expressed in lw, which could indicate an induction of aromatase gene by PCB levels. This cytochrome P450 aromatase, encoded by the cyp19 gene, converted androgens into estrogens at the final step of estrogen biosynthesis. According to Cheshenko et al. (2008), the modulation of Arom expression and its function could dramatically alter the rate of estrogen production, disturbing the local and systemic levels of estrogens. Another study showed that both aromatase isoforms and both ER subtypes are associated with sexual differentiation in Roach (*Rutilus rutilus*) and alterations in their expression could sign disruptions in sexual development (Anke et al., 2008). On this account, the increase of mRNA Arom expression correlated to PCB levels could inform about biochemical reproductive disturbance at genetic level. In the case of the European eels, the Arom gene induction by PCB could indicate an abnormal expression independent of the sexual differentiation, but inducing a dysfunction within the enzymatic chain linked to the reproduction function.

Finally, the PCA underlined that the contamination levels, in particularly the sum of dl and ndl-PCBs in gonads expressed in lw, were significantly correlated to K. PCB levels in gonads expressed in ww, were correlated to the lipid percentage of gonads, underlining the lipophilicity of these compounds. It could be suggested that these lipophilic pollutants induced perturbations in the lipid metabolism pathway which lead to a greater index condition.

## Conclusion

This study had allowed to compare the dl and ndl-PCB contamination levels between juvenile and prepubertal stages (yellow and silver) and highlighted lipidic metabolic correlations between both matrices (muscles and gonads) during the silvering process. According to the lipidic fraction of these organs and exclusively for silver eels, a significant and strong correlation was underlined for each PCB congener, between the contaminated lipids present in the gonad of silver eels and the fat stored in the muscles during the growing phase, which was remobilized at the onset of the silvering for the beginning of the ovogenesis. This demonstrated a link between the PCB contamination levels of muscles and those of gonads during this pubertal metamorphosis, fantastic step and major window on physiological, endocrine and genetic transformations of European eels. This silvering need at the same time, a reorganization of the energetic allocation and a subtle regulation of the lipid pathway, which might provide energy for both reproduction swimming and gonadogenesis (lipoglycoproteic stores of oocytes). The monitoring of the lipophilic contaminants within the couple muscles-gonads highly implicated in this metamorphosis and the reproduction, could inform on the detoxification or metabolization process during the sexual maturation. Moreover, this could clarify the potential risk for this endangered species.

Indeed, our calculations highlighted a contamination level of  $18.5 \text{ ng TEQ}_{\text{WHO 1998}} \cdot \text{kg}^{-1}$  of gonad expressed in ww, revealing a potential risk of abnormalities during the embryogenesis. Moreover, the dl and ndl-PCB contamination patterns between immature organisms such as glass eels and yellow eels, and potential genitors such as downstream silver eels had permit to observe contaminant transfer between genitors dying after the hatching and glass eels coming back in estuarine waters. These PCB congeners which proportions varied could be considered as markers specific of a development stage or a matrix. On the contrary, the stability of other non metabolizable congeners highlighted a background contamination.

Finally, the Principal Component Analysis has evidenced correlations between mRNA Vg expression and PI, mRNA Arom expression and PCB contamination levels in muscle matrix whereas it has underlined a lack of correlation between mRNA Vg expression and PCB levels. All these information highlighted biochemical reproductive disturbances at the transcriptomic level which could potentially impaired the eel reproduction success.

Further studies were necessary to understand the link between each PCB congener and lipid of each matrix. The composition in fatty acids of each matrix appeared as the key of the understanding of the behavior of the PCB congener, since the composition seemed to fluctuate during each progressive step of the eel life cycle.

Finally, our findings underlined that in the Loire estuary, moderately contaminated, eels were relatively in good health, but their PCB levels could likely impaired the reproduction process. According to the European management plans for the recovery of the stock, the main objective was to increase the escapement of the potential spawners (silver eels) in each basin to allow 40% of the pristine biomass to escape (Amilhat et al., 2009). Moreover, the EIFAC/ICES Working Groups on Eel have advised increasing management and research on the silver eel stage (ICES, 2012). In that case, the quality of Loire estuary water might to be preserved in order to allow the favorable entrance to glass eels, new generation of further genitors.

## Bibliography

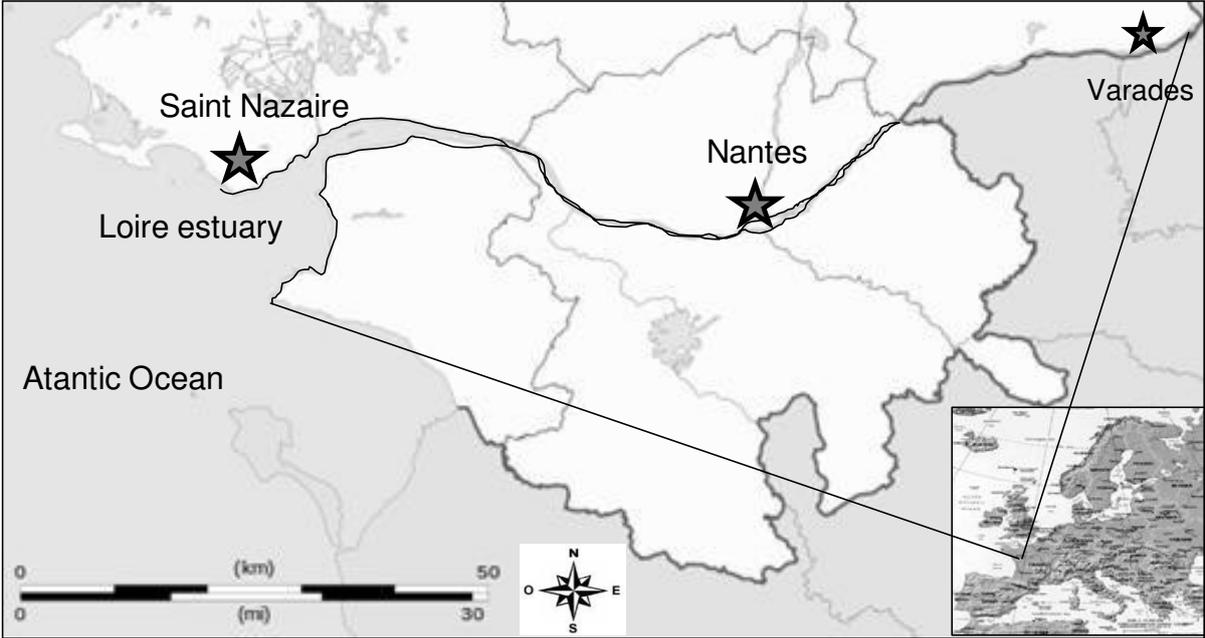
1. Acou, A., Rivot, E., Van Gils, J., Legault, A., Ysnel, F., Feunteun, E., 2011. Habitat carrying capacity is reached for the European eel in a small coastal catchment: evidence and implications for managing eel stocks. *Freshwater Biology* 56, 952-968.
2. Adam, G., Feunteun, E., Prouzet, P., Rigaud, C., 2008. L'anguille européenne: indicateurs d'abondance et de colonisation. Ed. Quae. projet indicang, pp.385.
3. Amilhat, E., Farrugio, H., Lecomte-Finiger, R., Simon, G., Sasal, P., 2009. Silver eel population size and escapement in a Mediterranean lagoon: Bages- Sigean, France. *Knowledge and Manag. of Aquat. Eco.* 05, 390-391.
4. Anke, L., Katsu, Y., Ichikawa, R., Paull, G.C., Chidgey, L.L., Coe, T.S., Iguchi, T., Tyler\*, C.R., 2008. Altered Sexual Development in Roach (*Rutilus rutilus*) Exposed to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and Associated Expression Dynamics of Aromatases and Estrogen Receptors. *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 106(1), 113-123.
5. Antunes, P., Gil, O., Ferreira, M., Vale, C., Reis-Henriques, M.A., 2007. Depuration of PCBs and DDTs in mullet under captivity clean conditions. *Chemosphere* 67, S58-S64.
6. Aroua, S., Weltzien, F.-A., Belle, N.L., Dufour, S., 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of in vivo and in vitro effects of sex steroids. *General and Comparative Endocrinology* 153, 333-343.
7. Arukwe, A., Yadetie, F., R., M., A, G., 2001. In vivo modulation of nonylphenol-induced zonagenesis and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 5-15.
8. Bardonnnet, A., Riera, P., 2005a. Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: new insights from stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 63 201-209.
9. Bardonnnet, A., Riera, P., 2005b. Feeding of glass eels (*Anguilla anguilla*) in the course of their estuarine migration: new insights from stable isotope analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 63, 201-209.
10. Belpaire, C., Goemans, G., 2007. Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 64, 1423-1436.
11. Belpaire, C., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., 2008. Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 65, 1483-1491.
12. Beullens, K., Eding, E.H., Gilson, P., Ollevier, F., Komen, J., Richter, C.J.J., 1997. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153, 135-150.
13. Blanchet-Letrouvé, I., Lafont, A.-G., Poirier, L., Baloché, S., Zalouk-Vergnoux, A., Dufour, S., Mouneyrac, C., 2013. Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97, 103-113.
14. Blanchet-Letrouvé, I., Zalouk-Vergnoux, A., Vénisseau, A., Couderc, M., Le Bizec, B., Elie, P., Herrenknecht, C., Mouneyrac, C., Poirier, L., 2014. Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: Spatial and biological variabilities. *Science of The Total Environment* 472, 562-571.
15. Bureau Du Colombier, S., Bolliet, V., Lambert, P., Bardonnnet, A., 2007. Energy and migratory behavior in glass eels (*Anguilla anguilla*). *Physiology & Behavior* 92, 684-690.
16. Casals-Casas, C., Desvergne, B., 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual Rev Physiol* 73, 135-162.
17. Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L., 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155, 31-62.
18. Colombo, G., Grandi, G., Rossi, R., 1984. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *Journal of Fish Biology* 24, 215-228.
19. Costera, A.n., Feidt, C., Marchand, P., Bizec, B.L., Rychen, G., 2006. PCDD/F and PCB transfer to milk in goats exposed to a long-term intake of contaminated hay. *Chemosphere* 64, 650-657.

20. de Boer, J., Dao, Q.T., van Leeuwen, S.P.J., Kotterman, M.J.J., Schobben, J.H.M., 2010. Thirty year monitoring of PCBs, organochlorine pesticides and tetrabromodiphenylether in eel from The Netherlands. *Environmental Pollution* 158, 1228-1236.
21. de Boer, J., Hagel, P., 1994. Spatial differences and temporal trends of chlorobiphenyls in yellow eel (*Anguilla anguilla*) from inland waters of the Netherlands. *Science of The Total Environment* 141, 155-174.
22. Dekker, W., 2003. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* 10, 365-376.
23. Dufour, S., Burzawa-Gérard, E., Le Belle, N., Sbaihi, M., Vidal, B., 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*, in: Aida, K., Tsukamoto, K., Yamauchi, K. (Eds.), *Eel Biology*. Springer, Tokyo, pp. 107-117.
24. Durif, C., Dufour, S., Elie, P., 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology* 66, 1025-1043.
25. Durif, C., Guibert, A., Elie, P., 2009. Morphological discrimination of the silvering stages of the European eel. In: Casselman, J. M., Cairns, D. K. (Eds) *Eels at the Edge: Science, Status, and Conservation Concerns*. American Fisheries, 103-111.
26. EELREP, 2005. Quality of life and management of living resources: "estimation of the reproduction capacity of European eel". ONEMA, p. 272.
27. Elie, P., Girard, P., 2009. Effets des micropolluants et des organismes pathogènes chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L.1758. *Collection Etude CEMAGREF* 128, 121.
28. Elie, P., Lecomte, R., Cantrelle, I., Charlon, N., 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (Poisson, Téléostéen, Anguilliforme). *Vie et Milieu*. 32:, pp. 149-157.
29. Fazio, G., Monée, H., Da Silva, C., Simon-Levert, G., Allienne, J., Lecomte-Finiger, R., et al. 2009. Changes in gene expression in European eels (*Anguilla anguilla*) induced by infection with swim bladder nematodes (*Anguillicola crassus*). *J Parasitol* 95(4), 808-816.
30. Ferreira, M., Antunes, P., Costa, J., Amado, J., Gil, O., Pousão-Ferreira, P., Vale, C., Reis-Henriques, M.A., 2008. Organochlorine bioaccumulation and biomarkers levels in culture and wild white seabream (*Diplodus sargus*). *Chemosphere* 73, 1669-1674.
31. Geay, F., Ferrareso, S., Zambonino-Infante, J.-L., Bargelloni, L., Quentel, C., Vandeputte, M., S., K., Cahu, C.L., Mazurais, D., 2011. Effects of the total replacement of fish-based diet with plant-based diet on the hepatic transcriptome of two European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) half-sib families showing different growth rates with the plant-based diet. *BMC Genomics* 2014, 15:481 12, 522.
32. Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19, 239-266.
33. Ghazali, N., Boussoufa, D., Navarro, J.C., El Cafsi, M., 2013. Lipid and fatty acid variations in muscle tissues of the 'yellow' stage of the European eel (*Anguilla anguilla*) during short-term adaptation to freshwater and seawater under food deprivation. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 45, 385-395.
34. Guimarães, L., Gravato, C., Santos, J., Faria, M., Alves, A., Guilhermino, L., 2010. Impact of pollution on the development of glass eels (*Anguilla anguilla*) entering three NW Portuguese estuaries. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 157, S25-S25.
35. Huertas, M., Scott, A.P., Hubbard, P.C., Canário, A.V.M., Cerdà, J., 2006. Sexually mature European eels (*Anguilla anguilla* L.) stimulate gonadal development of neighbouring males: Possible involvement of chemical communication. *General and Comparative Endocrinology* 147, 304-313.
36. Hurst, C., Waxman, D., 2005. Interactions of Endocrine-active environmental chemicals with the nuclear receptor PXR. *Toxicol Environ Chem* 87(1-4), 299-311.
37. ICES, 2012. Report of the Joint EIFAAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL), in: 2012/ACOM, I.C. (Ed.), Copenhagen, Denmark, p. 824224 pp.
38. Jonsson, A., Gustafsson, O., Axelman, J., Sundberg, H., 2003. Global accounting of PCBs in the continental shelf sediments. *Environ Sci Technol* 37(2), 245-255.
39. Kannan, K., Blankenship, A., Jones, P., Giesy, J.. 2000. Toxicity reference values for the toxic effects of polychlorinated biphenyls to aquatic mammals. *Human Ecol Risk Assess* 6: 181-201.

40. Matozzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise, C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates: A review. *Environment International* 34, 531-545.
41. Mazzeo, I., Gallego, V., Pérez, L., Peñaranda, D.S., Jover, M., Asturiano, J.F., 2010. Variations in fatty acids composition in different tissues of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) males during induced sexual maturation. *Journal of Applied Ichthyology* 26, 763-774.
42. Montero, M., Le Belle, N., King, J.A., Millar, R.P., Dufour, S., 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cRnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61, 525-535.
43. Opstvedt, J., 1985. Fish lipids in animal nutrition. *Technical Bulletin*, 27.
44. Palstra, A., Curiel, D., Fekkes, M., de Bakker, M., Székely, C., van Ginneken, V., van den Thillart, G., 2007a. Swimming stimulates oocyte development in European eel. *Aquaculture* 270, 321-332.
45. Palstra, A.P., Heppener, D.F.M., van Ginneken, V.J.T., Svakely, C., van den Thillart, G.E.E.J.M., 2007b. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352, 244-256.
46. Palstra, A.P., van Ginneken, V.J.T., Murk, A.J., Van den Thillart, G.E.E.J.M., 2006. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93, 145-148.
47. Pankhurst, N.W., Lythgoe, J.N., 1983. Changes in vision and olfaction during sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* 23, 229-240.
48. Perraudeau, Y., Després, L., 2009. L'estuaire de la Loire: un territoire en développement durable? *Presses Universitaires de Rennes*, Rennes.
49. Pierron, F., Baudrimont, M., Dufour, S., Elie, P., Bossy, A., Lucia, M., Massabuau, J.-C., 2009. Ovarian gene transcription and effect of cadmium pre-exposure during artificial sexual maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*). *BioMetals* 22, 985-994.
50. Robertson, L.W., Hansen, L.G., 2001. PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects. *The University of the Kentucky*.
51. Robinet, T., Feunteun, E., 2002. Sublethal Effects of Exposure to Chemical Compounds: A Cause for the Decline in Atlantic Eels? *Ecotoxicology* 11, 265-277.
52. Roche, H., Buet, A., Jonot, O., Ramade, F., 2000. Organochlorine residues in European eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccarès lagoon (French National Nature Reserve of Camargue) - effects on some physiological parameters. *Aquatic Tox.* 48, 443-459.
53. Santos, T., Romano, D., Gadea, R., 2010. Trade Union Priority List for REACH Authorisation. *European Trade Union Confederation*, p. 117.
54. Sbaihi, M., Fouchereau-Peron, M., Meunier, F., Elie, P., Mayer, I., Burzawa-Gerard, E., Vidal, B., Dufour, S., 2001. Reproductive biology of the conger eel from the south coast of Brittany, France and comparison with the European eel. *Journal of Fish Biology* 59, 302-318.
55. Sures, B., Knopf, K., 2004. Individual and combined effects of cadmium and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the humoral immune response in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally infected with larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Parasitology* 128, 445-454.
56. Sutharshiny, S., Sivashanthini, K., Thulasitha, W.S., 2013. Lipid Changes in Relation to Maturation and Spawning of Tropical Double Spotted Queenfish, *Scomberoides lysan* (Forsskal, 1775). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 8, 555-570.
57. Tanabe, S., Kannan, N., Subramanian, A., Watanabe, S., Tatsukawa, R., 1987. Highly toxic coplanar PCBs: Occurrence, source, persistency and toxic implications to wildlife and humans. *Environmental Pollution* 47, 147-163.
58. Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83, 175-185.
59. Tocher, D.R., 2003. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science* 11, 107-184.
60. Trubiroha, A., Kroupova, H., Würtz, S., Frank, S.N., Sures, B., Kloas, W. 2010. Naturally-induced endocrine disruption by the parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda) in roach (*Rutilus rutilus*). *General and Comparative Endocrinology* 166, 234-240.

61. van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
62. van der Oost, R., Goksøyr, A., Celandier, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Tox.* 36, 189-222.
63. van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., van den Thillart, G., Murk, A., 2009. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquatic Tox.* 92, 213-220.
64. Vidal, B., Pasqualini, C., Le Belle, N., Holland, M., Sbaihi, M., Vernier, P., Zohar, Y., Dufour, S., 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol. Reprod.* 71, 1491-1500.
65. Weltzien, F.-A., Pasqualini, C., Vernier, P., Dufour, S., 2005. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *General and Comparative Endocrinology* 142, 134-142.
66. WHO, 2010. Project for the re-evaluation of human and mammalian toxic equivalency factors (TEFs) of dioxins and dioxin-like compounds. World Health Organization, Geneva, Switzerland. WHO/PCS/ 12.

**Figure 1:** Study area from Loire estuary (France)



**Figure 2:** Ndl (A,B,C) and dl-PCB (D,E,F) contamination levels (expressed in  $\text{ng g}^{-1}$  ww, lw, dw, respectively) considering two matrices (muscles and gonads) and two sexual maturation stage (yellow and silver eels) in function of age class (6-10; 10-13; >13 years).

**Statistical tests:** the star indicated the significant differences in levels between the two matrices within one development stage and considering each age class: \* for  $p < 0.1$ ; \*\* for  $p < 0.05$ ; the letters indicated the significant differences in levels in one matrix between the age classes and considering each development stage: a,b were used to indicate significant differences with  $p$ -value  $< 0.05$ , c,d indicated significant differences with  $p$ -value  $< 0.1$ ; the triangle corresponded to the significant difference in levels between yellow and silver eels considering each matrix and each age class:  $\Delta$  for  $p < 0.05$ .

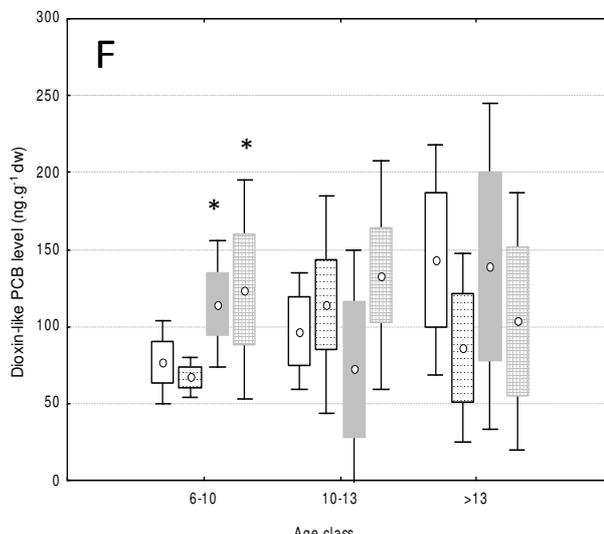
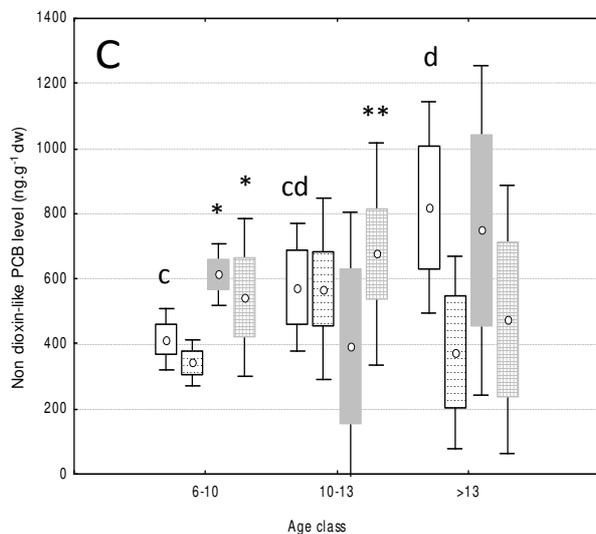
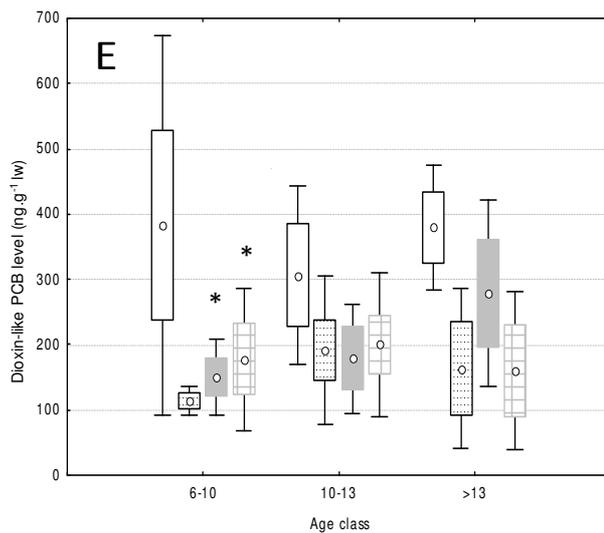
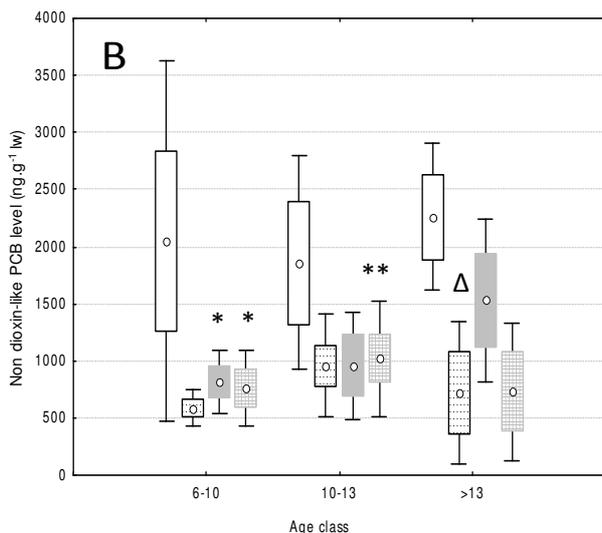
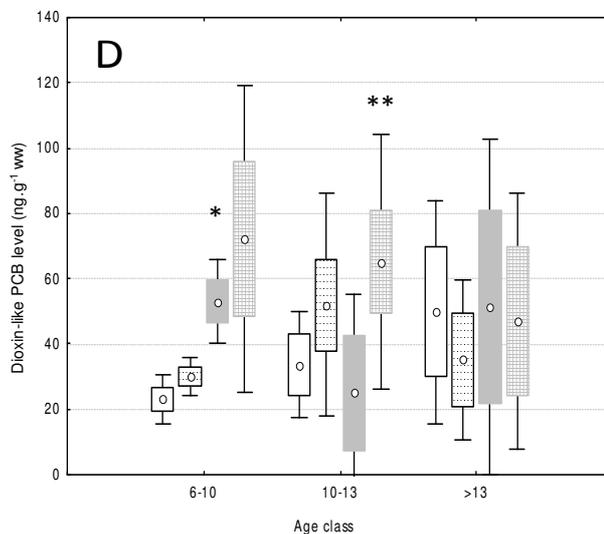
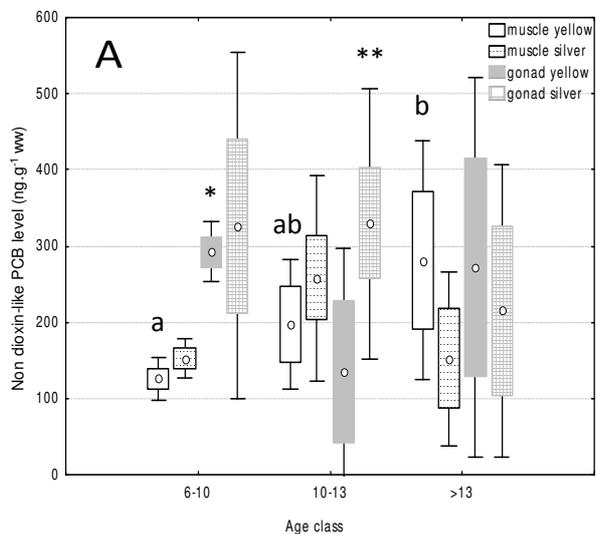
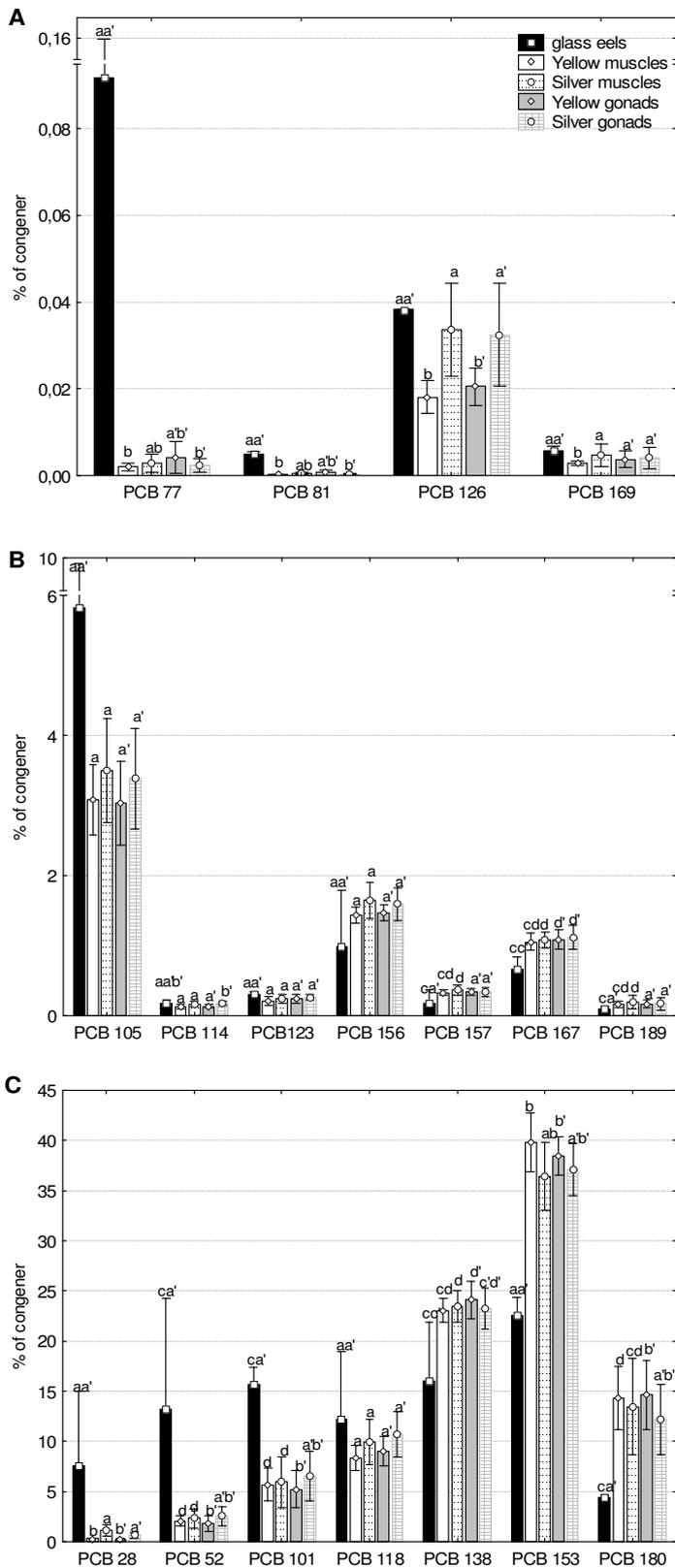
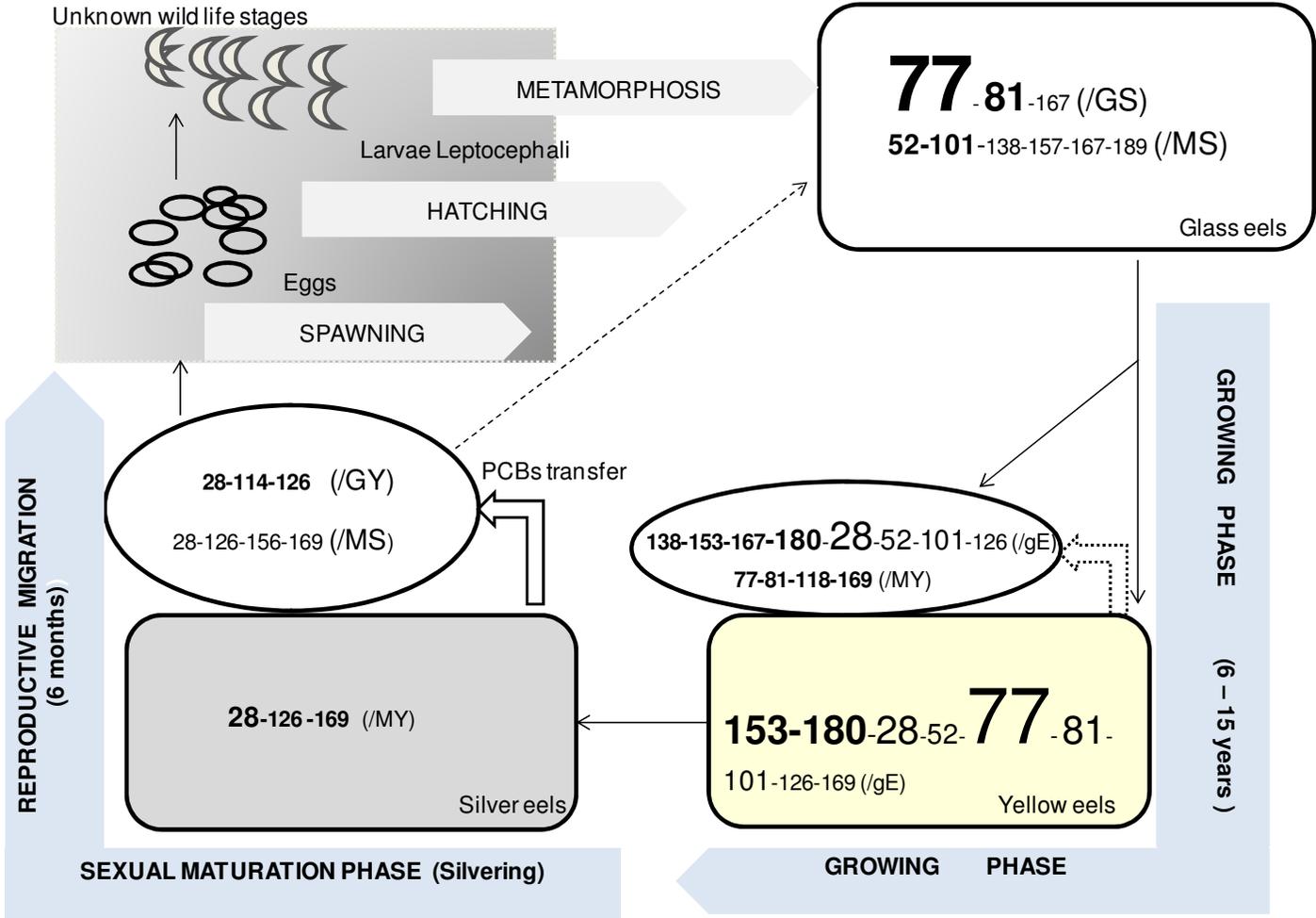


Figure 3 : Relative proportion of each congener regarding to the life stage and the matrices. Characters (a,b, c,d) indicated significant differences between proportions in glass eels, yellow and silver muscles ; a,b were used to indicate significant differences with p-value < 0.05, c,d indicated significant differences with p-value < 0.1. The same symbols accented were used to compare glass eels, yellow and silver gonads.



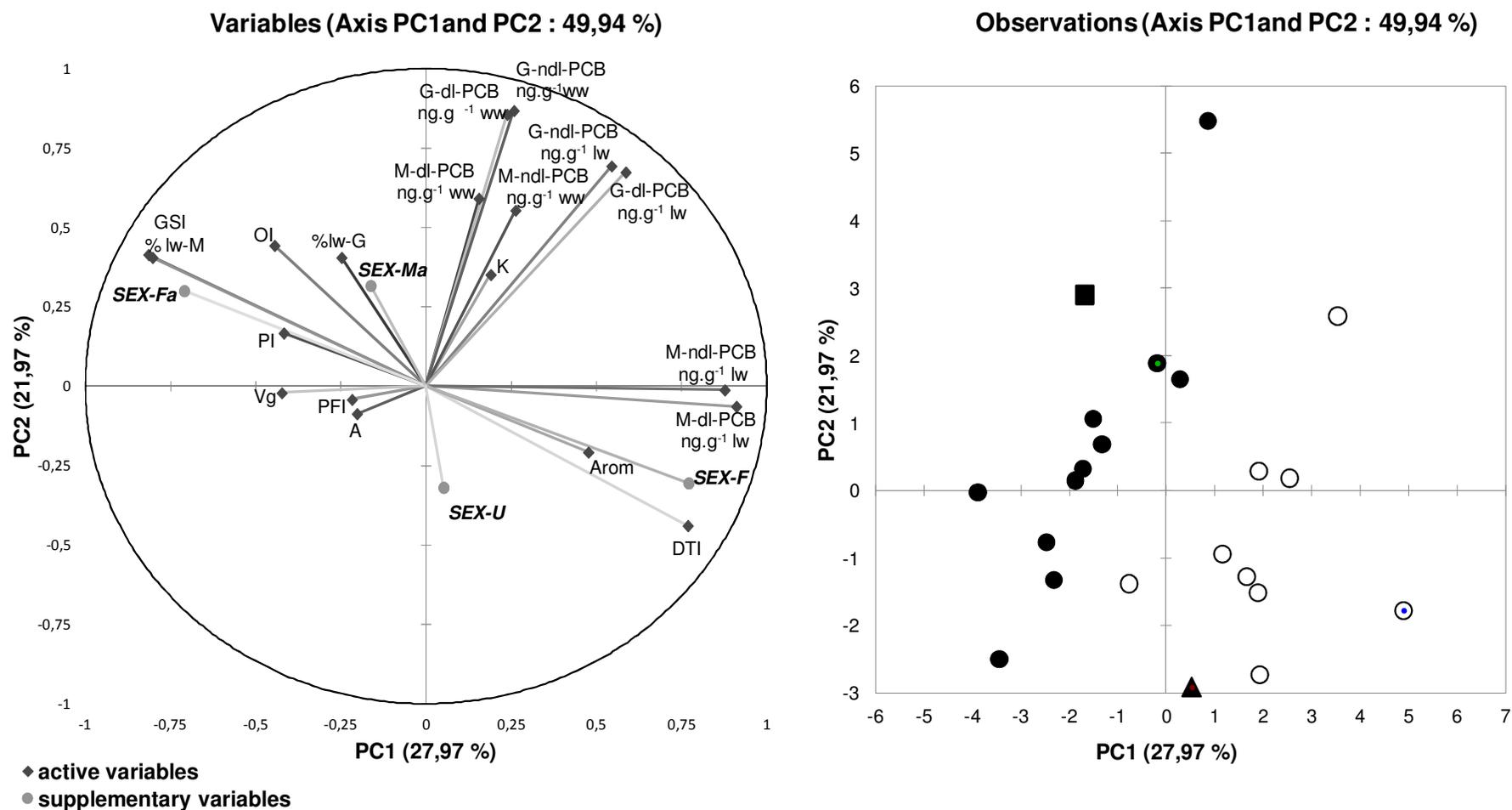
**Figure 4:** Conceptualization of significant percentage variations of PCBs between the three development stages according to different matrices: MS: Muscle Silver; MY: Muscle Yellow; GS: Gonad Silver; GY: Gonad Yellow; gE: Glass Eels. The rectangle represented the muscle, and the oval, the gonads of each development stage. Congeners were symbolized by their number; the characters in parentheses (e.g /MS) indicated the matrix considered for comparison. Not bold characters indicated a significant decrease of the congener percentage and bold characters a significant increase. The small, medium, large and largest characters indicated a multiplier, equal or superior to 2, from 2 to 10 times, from 10 to 40 times and superior to 40 times in average, respectively.



**Figure 5:** Principal Component Analysis of biometric parameters, biomarkers and dl /ndl-PCB expressed in  $\text{ng.g}^{-1}$  (ww and lw) of European eels from Loire estuary ( $n = 22$ ).

**A: correlation loadings** (A: age; K: Fulton index; LW: Lipid Weight; DTI: Digestive Tract Index; PFI: Pectoral Fin Index; GSI: Gonado Somatic Index; PI: Parasite Index; %lw.G: percentage of lipid of gonad; %lw.M: percentage of lipid of muscles; Arom: aromatase mRNA expression; Vg: Vitellogenin mRNA expression; SI: Silver Index); G-ndl and G-dl for PCB contamination levels of gonads; M-ndl and M-dl for muscles.

**B: sample representation** ( $\Delta$ = undifferentiated individuals;  $\blacksquare$  silver males;  $\circ$ = yellow females;  $\bullet$  silver females).



**Table 1:** Means and standard deviations of biometric parameters (body length: BL; body weight: BW; muscle lipid weight: % lw-M; age: A), indices such as Fulton Index (K), ocular index OI, pectoral fin index PFI, digestive tract index DTI and gonado somatic index GSI, Vitellogenin and aromatase mRNA expression (Vg, Arom respectively) and Parasite Index (PI) of the swim bladder (*Anguillicola crassus*) of sampled European eels (n = 23) from the Loire estuary, according to the age class (6-10; 10-13; >13 expressed in years).

Age class	n = 23	BL (mm)	BW (g)	A (year)	K	% lw-M	OI	PFI	DTI	GSI	Vg	Arom	PI
<b>class 6-10</b>	8												
<b>Y</b>	4	530,25±52,71	229,5±95,14	8±1,2	0,148±0,015	9,92±7,03	4,7±1,8	3,93±0,33	3,20±0,70	0,81±0,46	3,0±6	3,23±6,0	0,05±0,01
<b>S</b>	4	531,5±105,61	269,25±125,02	8,5±0,9	0,166±0,004	26,71±3,68	8,48±1,58	4,04±1,22	1,27±0,55	1,50±0,27	36,6±35,6	0,13±0,16	0,17±0,14
<b>class 10-13</b>	9												
<b>Y</b>	3	556,33±15,50	279,67±32,72	11±0,9	0,162±0,007	12,84±7,14	5,13±1,62	4,01±0,74	3,59±0,67	0,57±0,11	1,2±1,1	0,34±0,4	0,001±0,002
<b>S</b>	6	690±150,06	632,33±435,85	11,8±1	0,169±0,014	26,36±2,74	8,82±1,12	4,44±0,51	1,52±0,78	1,57±0,23	7,3±10,1	0,18±0,39	0,024±0,029
<b>class &gt;13</b>	6												
<b>Y</b>	3	791,33±198,02	1173,0±922,49	14,2±1,6	0,19±0,039	12,93±6,90	8,08±1,18	4,43±0,76	3,52±0,47	0,62±0,21	1,4±2,3	0,04±0,05	0,023±0,04
<b>S</b>	3	708,67±121,58	566,67±315,95	17,2±3,8	0,149±0,005	22,41±3,93	8,96±0,60	4,60±0,33	1,10±0,24	1,78±0,13	3012,8±5215	0,08±0,09	0,005±0,009

**Table 2:** Parameters of equations representative of the relationships between PCB levels in muscles and gonads (expressed in ng.g<sup>-1</sup> lw) of eels according to developmental stage and for each PCB congener. Linear regressions were mentioned as follow: [PCB level in gonad] = slope x [PCB level in muscles] + y-intercept. Significant regressions were underlined in bold. n = number of individuals.

Congener #	Yellow eels (n=10)				Silver eels (n=13)			
	slope	y-intercept	r	p	slope	y-intercept	r	p
77	0.271	0.033	0.211	5.59.10 <sup>-01</sup>	<b>0.607</b>	<b>0.006</b>	<b>0.660</b>	<b>1.42.10<sup>-02</sup></b>
81	-0.996	0.012	-0.601	6.60.10 <sup>-02</sup>	-0.052	0.004	-0.177	5.63.10 <sup>-01</sup>
126	0.216	0.163	0.312	3.80.10 <sup>-01</sup>	<b>0.936</b>	<b>0.029</b>	<b>0.972</b>	<b>3.11.10<sup>-08</sup></b>
169	0.051	0.040	0.103	7.78.10 <sup>-01</sup>	<b>0.693</b>	<b>0.009</b>	<b>0.748</b>	<b>3.31.10<sup>-03</sup></b>
105	0.037	35.78	0.072	8.43.10 <sup>-01</sup>	<b>0.851</b>	<b>6.364</b>	<b>0.902</b>	<b>2.49.10<sup>-05</sup></b>
114	0.000	1.799	-0.001	9.99.10 <sup>-01</sup>	<b>0.873</b>	<b>0.491</b>	<b>0.688</b>	<b>9.37.10<sup>-03</sup></b>
118	0.081	98.54	0.148	6.84.10 <sup>-01</sup>	<b>0.826</b>	<b>34.35</b>	<b>0.751</b>	<b>3.11.10<sup>-03</sup></b>
123	0.108	2.419	0.148	6.83.10 <sup>-01</sup>	<b>0.879</b>	<b>0.780</b>	<b>0.816</b>	<b>6.65.10<sup>-04</sup></b>
156	0.009	18.42	0.018	9.61.10 <sup>-01</sup>	<b>0.942</b>	<b>1.917</b>	<b>0.934</b>	<b>3.14.10<sup>-06</sup></b>
157	0.121	3.339	0.199	5.82.10 <sup>-01</sup>	<b>0.907</b>	<b>0.399</b>	<b>0.952</b>	<b>5.34.10<sup>-07</sup></b>
167	0.094	11.31	0.176	6.27.10 <sup>-01</sup>	<b>1.034</b>	<b>1.241</b>	<b>0.873</b>	<b>9.67.10<sup>-05</sup></b>
189	0.147	1.583	0.259	4.70.10 <sup>-01</sup>	<b>0.679</b>	<b>0.441</b>	<b>0.723</b>	<b>5.22.10<sup>-03</sup></b>
28	0.604	-0.070	0.596	6.91.10 <sup>-02</sup>	<b>0.668</b>	<b>2.605</b>	<b>0.686</b>	<b>9.63.10<sup>-03</sup></b>
52	0.245	13.19	0.277	4.39.10 <sup>-01</sup>	<b>0.845</b>	<b>9.028</b>	<b>0.707</b>	<b>6.94.10<sup>-03</sup></b>
101	0.172	45.16	0.300	4.00.10 <sup>-01</sup>	<b>0.734</b>	<b>28.03</b>	<b>0.622</b>	<b>2.33.10<sup>-02</sup></b>
138	0.060	275.6	0.110	7.63.10 <sup>-01</sup>	<b>1.089</b>	<b>3.615</b>	<b>0.954</b>	<b>4.06.10<sup>-07</sup></b>
153	0.072	415.0	0.156	6.66.10 <sup>-01</sup>	<b>1.022</b>	<b>36.25</b>	<b>0.962</b>	<b>1.55.10<sup>-07</sup></b>
180	0.074	159.3	0.155	6.69.10 <sup>-01</sup>	<b>0.794</b>	<b>23.70</b>	<b>0.922</b>	<b>7.38.10<sup>-06</sup></b>

## Conclusion

Les travaux réalisés sur la quantification de l'expression de la Vg chez l'anguille montrent, pour la première fois chez cette espèce en déclin, une induction significative de l'expression génique de la Vg hépatique chez des anguilles européennes indifférenciées, ainsi que chez des mâles jaunes et argentés, prélevés *in situ* et exposés à des PE. La méthode de quantification par q-RT PCR constitue donc une méthode de choix permettant l'utilisation de l'expression génique de la Vg comme biomarqueur de perturbation endocrine chez cette espèce.

Ainsi, sur la fraction de population étudiée en estuaire de Loire, **38 % des individus** apparaissent perturbés. Ces perturbations, au niveau de la fonction de reproduction de l'espèce, pourraient donc entraîner potentiellement des conséquences non négligeables sur son succès reproductif et s'ajouter aux différentes causes proposées pour expliquer son déclin depuis une vingtaine d'années (Robinet and Feunteun 2002; Acou et al. 2011; Feunteun 2002).

La quantification de l'expression de l'aromatase hépatique, à quant à elle, permis de mettre en avant son rôle potentiel dans le déterminisme du sexe.

Cependant, ces deux marqueurs biologiques n'ont pas permis de conclure à l'existence fondée d'une perturbation endocrinienne; par contre, il existe une induction de l'expression des gènes de ces deux protéines en lien direct avec la fonction de reproduction.

L'existence probable de corrélations a donc été recherchée en comparant les niveaux de contamination des deux organes clé du succès reproductif ( muscle, gonade), supposé en relation métabolique.

Les niveaux de contamination en PCB dl et ndl concernant les anguilles juvéniles et les anguilles prépubères, montrent une corrélation significative entre les lipides présents dans les muscles et ceux constituant les gonades, lors du processus de silvering, et ce pour chaque congénère (excepté le PCB 81). Ceci souligne une forte corrélation entre les lipides mis en réserve dans les muscles lors de la phase de croissance (longue phase continentale, juvénile) et leur mobilisation vers les gonades lors de la phase de maturation sexuelle (correspondant au début de l'ovogenèse et à l'intégration de globules lipidiques précédant l'incorporation de Vg).

Ceci démontre un lien direct entre la contamination en PCB et l'argenture. En effet, ce processus physiologique intense et progressif demande une réallocation de la demande énergétique sous



forme de lipides, et la lipidogenèse ne peut être que, endogène, car les anguilles argentées cessent de s'alimenter lorsqu'elles débutent leur migration de dévalaison.

Afin de clarifier le risque potentiel pour les géniteurs, les niveaux de contamination des gonades ont été calculés en Facteurs d'Equivalence Toxique(TEF), afin de les comparer aux études de Palstra (2006). Cette valeur de 18,5 ng TEQ WHO 1998.kg<sup>-1</sup> de gonades exprimées en PF, révèle un risque potentiel d'anormalités lors de l'embryogenèse.

En outre, les profils de PCB dl et ndl entre les civelles, les anguilles jaunes et les anguilles argentées, ont permis d'observer les transferts de contaminants entre les géniteurs, qui meurent après leur unique ponte et les civelles qui reviennent en estuaire quelques mois après l'éclosion des larves. La variabilité des proportions en PCB pourraient indiquer ces congénères comme marqueurs spécifiques d'un stade de développement ou d'une matrice.

Au contraire, la stabilité des proportions des autres congénères non métabolisables souligne un "bruit de fond" en PCB sur l'intégralité du cycle de vie

Les analyses en composantes principales effectuées prennent en compte l'ensemble de ces informations, tant au niveau des facteurs biométriques que de l'expression des deux biomarqueurs recherchés, en les couplant aux analyses chimiques des deux matrices choisies (muscles et gonades) relativement aux PCB.

La contamination en PCB apparait directement corrélée au pourcentage de lipides, tandis que le coefficient de condition, révélateur de l'état de santé des poissons, établit une corrélation avec ces contaminants quand on prend uniquement les individus prépubères en début d'argenteure.

Il n'existe pas de corrélation nette entre les biomarqueurs Vg et aromatase, bien que l'induction du gène de la Vg soit clairement établi : la variabilité individuelle des anguilles peut expliquer pour partie la difficulté à établir des liens francs entre l'exposition aux contaminants de type PE et les effets biologiques au niveau des individus.

Cependant, fragilisées par un métabolisme perturbé, les anguilles européennes, connues pour être résistantes, n'en demeurent pas moins affectées au niveau de leurs systèmes hormonaux et à terme dans leur comportement.

Le succès reproductif étant basé sur un ensemble de régulations fines des fonctions physiologiques, il est à redouter des incidences non négligeables à terme sur le maintien de la population. Par contre, le secteur de l'estuaire de la Loire étant globalement modérément pollué



par rapport à d'autres estuaires, il est nécessaire de préserver la qualité des eaux dans ces zones afin de permettre aux anguilles jaunes en place et aux civelles entrantes d'avoir un cycle continental optimal.

#### En conclusion,

- ❑ La validation de la q RT PCR chez des mâles argentés soumis à des œstrogènes, *in vivo*
- ❑ Une méthode hautement sensible, q RT PCR, permettant l'expression *in vivo* et *in situ* de la Vg hépatique chez une espèce prépubère en début de migration de reproduction .
- ❑ La validation de l'anguille européenne comme espèce sentinelle d'une contamination de type perturbation endocrinienne
- ❑ 12/27 anguilles européennes perturbées en amont de l'estuaire de la Loire, 9/28 en aval.
- ❑ une expression de l'aromatase qui semble correspondre au déterminisme sexuel
- ❑ Les gonades des anguilles jaunes (appartenant à la classe d'âge 6-10) sont deux fois plus contaminées en PCB dl et ndl (exprimés en PF et PS) que les muscles.
- ❑ les anguilles argentées appartenant aux classes d'âge 6-10 et 10-13, présentent des gonades plus contaminées en PCB dl et ndl que les muscles, quelque soit l'unité.
- ❑ des corrélations fortes existent entre les niveaux de contamination des gonades et des muscles des anguilles argentées exprimés en MG pour tous les congénères de PCB sauf le PCB 81.
- ❑ Un niveau de contamination de  $18.5 \text{ ng TEQ}_{\text{WHO 1998}} \cdot \text{kg}^{-1}$  (PF) dans les gonades révèle un risque potentiel lors de l'embryogénèse.
- ❑ Les profils de PCB évoluent fortement entre les différents stades de développement et les matrices.
- ❑ Les congénères 126 et 169 peuvent être considérés comme des marqueurs du processus de l'argenture. Leur présence constante chez les civelles pourrait signer un transfert materno foetal.
- ❑ L'expression de l'ARNm de la Vg n'est pas corrélée à un stade de développement., ni au niveau de contamination en PCB, par il existe un lien avec l'indice parasitaire
- ❑ L'expression de l'ARNm de l'Arom est corrélée au niveaux de PCB dl et ndl (MG) dans les muscles, ce qui pourrait indiquer une induction du gène de l'aromatase par les PCB



# ***PARTIE 6***

## ***CONCLUSIONS et PERSPECTIVES DE RECHERCHE***



## I- Conclusion générale

Espace synaptique privilégié entre activités anthropiques et biodiversité remarquable, l'estuaire de la Loire ouvre de nouvelles voies scientifiques en se préoccupant des contaminants de type Perturbateurs endocriniens (PE).

Ces recherches scientifiques novatrices sur l'estuaire apparaissent indispensables pour comprendre comment évoluent les contaminants en présence, en relation avec ses composantes écologiques, biologiques et hydrodynamiques.

Cependant, la problématique des PE est complexe car les effets sont insidieux et difficiles à mettre en évidence sans ambiguïté.

L'ensemble des travaux initiés au cours de cette thèse ont-ils permis de répondre aux questions formulées en début d'étude?

**1- Existe-t-il des perturbateurs de la fonction endocrine reproductrice (PE) dans les sédiments de l'estuaire de la Loire ?**

Les résultats des tests cellulaires effectués sur les extraits sédimentaires ont montré des réponses positives ayant permis de cibler quatre types d'activité ainsi que la présence de trois familles de composés de type perturbateurs endocriniens (PE) au niveau de l'estuaire de la Loire:

- ✓ Une **activité oestrogénique** présente sur l'ensemble des sites, plus importante au niveau urbain (variant de 1,97 à 35,0 ng Eq-E2.g<sup>-1</sup> de COT )
- ✓ Une **activité anti-androgénique** présente sur 8 sites parmi les 12 étudiés (moyenne de 50 000 Eq-Fluta en ng.g<sup>-1</sup> de COT).
- ✓ Une **activité dioxine-like** homogène et conséquente sur tous les sites (>à 60 ng Eq-TCDD.g<sup>-1</sup> de COT).
- ✓ Une **activité HAP-like** plus hétérogène avec une différence nette entre sites aval et intermédiaire par rapport aux sites amont.

Ces résultats constituent la première étape d'une approche TIE (Sediment Toxicity Identification Evaluation;(EPA 2007)), dont la suite n'a pu être finalisée pour des raisons techniques et



financières. Cependant, cette démarche novatrice a permis d'ouvrir l'expérimentation au niveau de l'écosystème "estuaire de la Loire".

- ✓ L'existence et l'omniprésence de perturbateurs endocriniens a donc été mise en évidence dans les sédiments de l'estuaire de la Loire, bien que celui-ci ne soit pas le plus impacté des estuaires à l'échelle nationale, et plus encore internationale, par les activités anthropiques.
- ✓ Les réponses observées au niveau des extraits sédimentaires sont cependant plus faibles que celles obtenues pour d'autres estuaires (ex : Seine, Gironde) sauf pour les composés « dioxine-like » et « HAP-like ». Entre l'aval et l'amont de l'estuaire, les réponses de type perturbation endocrine sont distinctes et attribuables aux pressions anthropiques de différentes origines qui s'échelonnent le long de l'estuaire, ainsi qu'aux variations des conditions hydrodynamiques de l'estuaire.

Cet état des lieux diagnostic suggère des causes anthropiques de perturbation vis-à-vis de l'organisme sentinelle de ce travail, l'anguille européenne, espèce menacée .

Bien que l'estuaire de la Loire apparaisse plutôt globalement favorable à l'anguille, par rapport à d'autres estuaires internationaux, une réelle vigilance doit être mise en œuvre afin d'éviter toute dégradation supplémentaire des eaux, en relation avec la mise en œuvre ou l'amélioration des STEU existantes, le contrôle des Centres de Stockage des Déchets Ultimes (CSDU), anciens et nouveaux, des rejets diffus de l'agriculture et des assainissements autonomes individuels, ainsi que de la pollution atmosphérique (HAP).

**2- Peut-on corréler l'exposition à ces perturbateurs endocriniens et leur bioaccumulation éventuelle sur cette espèce ciblée, l'anguille Européenne (*Anguilla anguilla*)?**

Les analyses chimiques conduites sur les anguilles mettent en **évidence une contamination significative des organismes en PCB, PCDD et PCDF**, quelle que soit la classe de taille, avec cependant des concentrations obtenues, globalement en dessous des teneurs maximales autorisées par la Commission Européenne et plus faibles que celles observées dans d'autres estuaires, comme celui de la Gironde (Tapie et al. 2011). Les organismes peuvent être exposés via différentes voies, sans préjuger de l'une par rapport à l'autre. Cependant, de par son mode de vie et son cycle reproductif très spécifique, l'anguille est principalement exposée aux contaminants adsorbés sur



les sédiments la quasi-totalité de sa vie (l'âge moyen évalué des génitrices sur la fraction de population étudiée étant de 19 ans, celui des géniteurs de 9 ans).

- ✓ **Un effet site a été clairement établi** au cours de ce travail, montrant que la zone la plus contaminée en PCB environne l'agglomération Nantaise, le site amont apparaissant le moins contaminé. Une différence a été observée entre PCB coplanaires et non coplanaires, avec des niveaux de concentrations mille fois plus élevés pour les PCB ndl, sans que cela présume d'une toxicité plus accrue.
- ✓ En outre, les résultats relatifs aux analyses chimiques sur les anguilles Européennes permettent de montrer que, quel que soit le stade de maturité sexuelle, **seules les concentrations en PCB dans les gonades (exprimée en matière grasse) sont supérieures à celles mesurées dans les muscles des individus immatures non dévalants appartenant à la classe d'âge >13 ans.**

3- Comment une espèce de poisson dite "sentinelle" répond-elle à d'éventuelles perturbations endocrines, de l'adulte au juvénile (atteintes potentielles à la reproduction)?

Le choix de l'anguille Européenne en tant qu'espèce biomarqueur de la qualité du milieu, proposée par Belpaire (2011), a permis de valider la technique de RT PCR quantitative comme outil extrêmement sensible dans l'expression des ARNm de la vitellogénine.

En fait, l'anguille représente un bon indicateur de la qualité des eaux et du milieu (via les sédiments), et constitue un organisme de recherche fondamentale très intéressant tant au niveau phylogénétique qu'endocrinien, déjà souligné dans la littérature (Dufour, Belpaire).

Elle possède aussi les qualités requises pour la mise en évidence de l'accumulation de composés lipophiles et persistants, en raison d'un pourcentage élevé de matières grasses présentes dans son organisme.

Cependant, cet organisme, relativement résistant, présente des spécificités biologiques et physiologiques qui sont autant sources de recherches expérimentales, que de difficultés pour valider nos résultats. En effet, les anguilles ne présentent jamais les mêmes réponses que les autres



poissons, pour des expérimentations équivalentes, ou des contaminants testés semblables (V van Ginneken and GE Maes 2005; Pierron et al. 2007).

Par ailleurs, mettre en évidence des dysfonctionnements partiels de la fonction de reproduction sans pouvoir clairement les valider comme perturbations endocriniennes, est la contrepartie nécessaire à l'échantillonnage de poissons issus du milieu naturel et dont les connaissances relatives au cycle de vie reproductif restent en pointillés, et pour le moment inaccessibles à l'expérimentation.

Cependant, la méthode de quantification par RT PCR constitue une méthode de choix permettant de suggérer que l'utilisation de l'expression génique de la Vg comme biomarqueur de perturbation endocrine puisse être proposée chez cette espèce. En effet, sur la fraction de population étudiée en estuaire de Loire, 38 % des individus apparaissent perturbés. Ces perturbations, au niveau de la fonction de reproduction de l'espèce, pourraient souligner des conséquences potentielles non négligeables sur son succès reproductif et s'ajouter aux différentes causes proposées pour expliquer son déclin depuis une vingtaine d'années [2-4].

Les analyses en composantes principales ont été effectuées en prenant en compte l'ensemble de ces informations, tant au niveau des facteurs biométriques que de l'expression des deux biomarqueurs recherchés, en les couplant aux analyses chimiques (PCBs notamment) des deux matrices choisies (muscles et gonades) relativement aux PCBs. La contamination en PCBs apparaît directement corrélée au pourcentage de lipides, tandis que le coefficient de condition, révélateur de l'état de santé des poissons, établit une corrélation avec ces contaminants quand on considère uniquement les individus prépubères en début d'argenteure.

Par ailleurs, nous n'avons pas observé de corrélation nette entre les biomarqueurs Vg et Aromatase, bien que l'induction du gène de la Vg soit clairement établie : la variabilité individuelle des anguilles peut expliquer pour partie à la difficulté d'établir des liens "francs" entre l'exposition à certains contaminants de type PE et les effets biologiques au niveau des individus.

**Nous pouvons alors proposer nos résultats comme des signaux d'alarme précoces qui suggèrent un dysfonctionnement à terme de la reproduction.**



## II- Perspectives de recherche

Nous avons cherché à compléter nos informations et validé notre démarche sur la même zone d'étude chez une autre espèce de poisson (le flet: *Plathychtys flesus*), présentant des conditions écologiques similaires, des seuils d'exposition à des contaminants de type PE semblables mais dont le cycle reproductif est bien connu. De plus, les individus sont accessibles sur l'ensemble de son cycle de vie (juvéniles sexuellement indifférenciés, mâles et femelles, en voie de maturation sexuelle puis mûres), spatialement et temporellement (Figure ..).

Il s'agit aussi d'un poisson proposé comme bioindicateur par l'ICES et l'ANSES entre autres, permettant des études comparatives et des suivis au niveau international, grâce à des plans d'échantillonnage harmonisés (ICES, 2012). Les preuves de perturbations oestrogéniques sur ce poisson plat ont été validées dans de nombreuses études, soit par le suivi du taux plasmatique de Vg (Matthiensen et al., 1998; Kleinkauf et al., 2004), et l'induction de l'expression de la Vg (Pierron, 2007), soit par l'histologie des gonades entre autres (Minier, 2003).

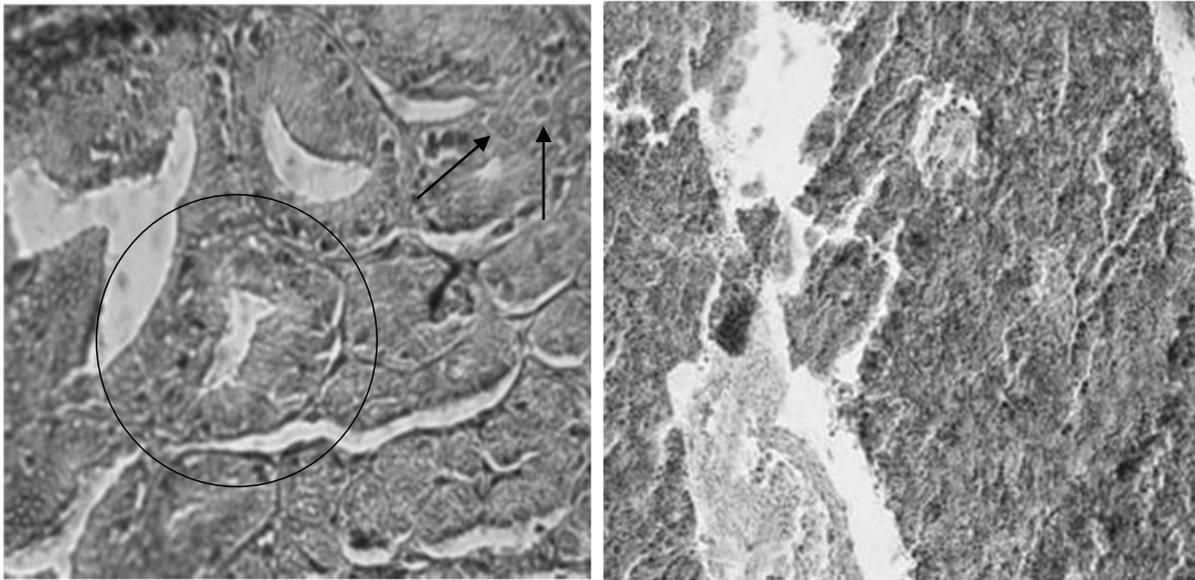
Une campagne de pêche a donc été réalisée sur une année et les investigations prévues sur ce matériel biologique sont classiques et validées sur de nombreuses espèces afin d'avoir une référence homogène et une comparaison inter espèce cohérente.

Ce travail de recherche vise à évaluer les effets d'une perturbation endocrine potentielle, connaissant le niveau de contamination des sédiments sur le secteur estuarien et l'induction de l'expression de la Vg chez une espèce qui ne l'exprime naturellement que très faiblement.

Une autre perspective de recherche repose sur une étude approfondie des anguilles mâles argentées afin de travailler sur l'hypothèse d'une maturation précoce des gonades. En effet, nos travaux réalisés sur la quantification de l'expression de la Vg chez l'anguille ont montré, pour la première fois chez cette espèce en déclin, une induction significative de l'expression génique de Vg hépatique chez des anguilles européennes indifférenciées, ainsi que chez des mâles jaunes et argentés, prélevés in situ.

Cependant, seuls deux organismes argentés mâles ont été échantillonnés durant notre étude (échantillonnage aléatoire décidé au départ et le profil d'un d'entre eux attire l'attention de par son niveau de RGS (1,2) et l'histologie de sa gonade (photographie 12 ci-dessous).





**Photographie 12.** Gonade mâle en cours de maturation sexuelle

A droite: gonade mâle d'une anguille immature, présentant un tissu spermatique dense où les tubes séminifères sont peu différenciés et ne présentent pas de lumière visible, ni de spermatogonies (grossissement  $\times 640$ , microscopie optique)

A gauche: Les testicules apparaissent différenciés et structurés (encadrés) autour d'une lumière bien définie, correspondant à un degré de maturité avancé (présence de spermatogonies: flèches). (grossissement  $\times 640$ , microscopie optique). Clichés: I Blanchet-Letrouvé

Dans la nature, ce type de maturité n'a jamais été décrite pour les mâles, la différenciation sexuelle ayant lieu juste avant le début de la maturation sexuelle ou en même temps que l'argenture.

En effet, chez l'anguille, la différenciation sexuelle histologique varie en fonction de la taille des organismes selon Beullens et al., (1997). Mais chez cette espèce gonochoristique, il a été proposé que la gonade non différenciée (ou organe de Syrski) puisse être une étape intersexuée, avant de se développer en testicule ou directement en ovaires. De récentes études génomiques réalisées par qPCR (Geffroy et al, 2013) mettent en évidence l'expression de 6 gènes différents lors de cette étape particulière de différenciation sexuelle.

En début de migration, les gonades des mâles sont censées être immatures et bloquées en début de spermatogenèse; les mâles débutent leur migration de reproduction plus tôt (fin août) que les femelles (octobre) et sont donc supposées les attendre sur les aires de ponte à condition que la spermiation n'aie pas lieu trop tôt.



Des expériences *in vivo* ont montré l'influence de certains contaminants sur la maturité sexuelle mâle (Perez et al. 2000), de la même manière que des injections de cHCG (Hormone gonado-chorionique de carpe) permettent d'obtenir une spermiation expérimentale (Fontaine, 1994); on peut alors se demander si des xénooestrogènes ne pourraient pas entraîner une maturation sexuelle plus précoce chez les mâles, qui dévaleraient alors en période estivale avec des testicules en spermatogenèse avancée, et seraient temporellement décalés avec la maturation des femelles.

Aucune étude n'a été réalisée en ce sens à ce jour, le problème technique dû à la finesse des gonades mâles, leur faible degré de maturité et leur différenciation parfois juste avant l'argenture, sont un frein pour la réalisation de ce type d'études. Une masse de matériel gonadique suffisante, tant pour l'histologie que pour les analyses de contaminants, est aussi un frein à ce type d'étude.

Malgré tout, cette perspective de recherche paraît essentielle à une meilleure connaissance du statut reproducteur des mâles argentés et donnerait un état des lieux relatif au degré de maturation moyen des géniteurs potentiels en estuaire de Loire, en début de dévalaison. Cet axe est d'autant plus intéressant que les mâles répondent bien à l'induction de l'expression génique de la Vg en q RT PCR, que la méthode est validée sur des mâles argentés et que la quantification de l'expression d'ARNm de Vg permettrait de mettre en évidence des corrélations potentielles avec certains types de contaminants, en réalisant le criblage analytique d'un ensemble de polluants présents sur le secteur.

Pour compléter cette étude, il serait intéressant de soumettre des mâles dévalants à des rejets de stations d'épuration en réalisant un système de "caging" en entrée et en sortie d'effluents (Daverat et al. 2011; Renault et al. 2011), comparativement à des mâles dévalants encagés dans une eau dépourvue de contaminants. Cette technique a été utilisée à plusieurs reprises pour des études *in situ*, concernant des systèmes similaires de bioaccumulation des contaminants chez l'anguille (Pacheco and Santos 1999; Fenet et al., 1998; Maria et al. 2004). Ce "caging" pourrait être réalisé en eaux chaudes, comme celles proches de la centrale thermique de Cordemais, au niveau du rejet de la STEU dans le port, le facteur température ayant été déterminé comme activateur de la maturation sexuelle (Peñaranda et al., 2014). En effet, (Baeza et al. 2014; Gallego et al. 2012) ont montré que la température de l'eau avait une incidence sur le processus de maturation des testicules, tant au niveau de la quantité que de la qualité du sperme, une température de 20°C ayant donné les meilleurs résultats de spermiation.



Cet effet thermique résulte de la modulation de l'expression d'enzymes stéroïdogéniques. Cependant, l'expression des gènes impliqués dans la conversion de testostérone en  $E_2$  ainsi que dans la synthèse de progestagènes a été retardée à des températures inférieures. Par contre, une corrélation a été observée entre les niveaux plasmatiques en 11KT et l'expression de gène 11 $\beta$ -HSD, alors que le niveau plasmatique de l' $E_2$  a augmenté avant que l'expression du gène cyp19a1 n'ait atteint son niveau maximal. Ces résultats suggèrent l'existence d'un système de régulation génique différentiel en fonction de la température du milieu, qui serait utilisé par les mâles d'anguilles européens lors de la migration de reproduction. (Baeza et al. 2014).

En ce qui concerne nos résultats, l'investigation des niveaux de contamination en PCB (dl et ndl) au sein de deux matrices (muscles et gonades) a permis de mettre en évidence des spécificités franches et sans ambiguïté entre les deux stades de développement (anguilles jaunes immature en phase de croissance et anguilles argentées en phase de maturation sexuelle). En particulier, des corrélations significatives positives ont été rapportées pour l'ensemble des congénères de PCB analysés, entre les niveaux de contamination des muscles et des gonades exprimés en ng.g<sup>-1</sup> de matière grasse, et ce, uniquement pour les anguilles argentées (excepté pour le congénère 81).

Ceci prouve que les interactions entre la maturation sexuelle et le métabolisme constituent un processus physiologique complexe impliquant l'action coordonnée d'organes différents et suggèrent des niveaux de régulation différents et hautement perfectionnés, ayant pour objectif de produire des gamètes de haute qualité de façon opportune.

Les essais expérimentaux réalisés en eau douce par Palstra et al. (2005) sur des anguilles femelles, ont révélé des dépôts de lipides corrélatifs à la croissance ovocytaire montrant que les processus physiologiques qui ont lieu dans le muscle et dans l'ovaire sont en conflit.

En fait, notre étude va plus loin en démontrant que seuls les lipides des muscles sont corrélés avec les lipides gonadiques, et ce, uniquement à l'occasion du processus d'argenture, lorsque le tube digestif se soude. A ce moment, seule la lipido-genèse endogène fonctionne afin de gérer le métabolisme énergétique de l'organisme, la maturation sexuelle se bloquant aux stades précoces de développement des follicules ou des spermatides (selon le sexe), en raison d'un verrouillage dopaminergique au niveau du système hypothalamo-hypophysaire.

Lors de la phase de croissance, ces corrélations entre muscles des anguilles jaunes et gonades différenciées mais immatures sont absentes.

La voie des lipides, à l'origine de la biosynthèse de l'ensemble des stéroïdes, est centrée sur le cholestérol présent dans le foie; il permet la synthèse de cortisol, hormones de stress, apparaissant



comme la clé de voûte de l'argenteur, via un système de régulation génique impliquant les récepteurs des glucocorticoïdes (récepteurs GR) et ceux des peroxysomes (PPXR). En parallèle, il a été démontré que les PCB peuvent interférer avec la corticostéroïdogenèse et diminuer les concentrations en cortisol (Soontornchat et al., 1994; Barron et al., 1995). Les lipides sont donc impliqués tant dans la phase continentale, lors de l'incorporation des acides gras sous forme de triglycérides dans les muscles, que dans la phase estuarienne puis marine, de maturation sexuelle, pour l'incorporation de globules lipidiques dans les oocytes, de vésicules vitellines ou et de phospholipides spermatiques dans les testicules. À terme, ces mêmes lipides, remobilisés d'un compartiment vers un autre, constitueront les futures réserves vitellines des embryons.

Or, les PCB, substances lipophiles, sont liés aux lipides au cours du cycle de vie de l'anguille depuis le stade civelle (issu de la métamorphose de la larve Leptocéphale), jusqu'au stade argenté, correspondant à la phase progressive de maturation sexuelle, en passant par le stade anguille jaune, immature, en longue phase de croissance continentale.

Il serait donc intéressant, dans un troisième axe de recherche, d'aborder la nature des lipides et d'identifier les différents acides gras de la fraction lipidique extraite à partir des muscles des anguilles, comparativement aux gonades, et de déterminer en parallèle les différents contaminants présents et associés à ces acides gras spécifiques. À ce titre, il paraît intéressant d'identifier, puis de doser l'acide eicosapentaénoïque, véritable facteur antithrombotique et caractérisant à l'observation macroscopique le sang épais, très gras et à vitesse de coagulation extrêmement rapide des anguilles, mettant souvent en échec les seringues héparinées. Quelle est la vocation de cet acide gras pour l'anguille et quelle en est sa proportion par rapport aux autres acides gras? Sa concentration varie-t-elle selon les saisons, les stades sexuels, les contaminants en présence? Autant de questions dont les réponses pourraient peut-être nous orienter vers les capacités de détoxification ou de protection de l'anguille vis-à-vis des contaminants lipophiles.

Cela permettrait ensuite d'orienter un quatrième axe de recherche vers les voies de détoxification des contaminants par l'anguille, soupçonnée de pratiquer de manière efficace la décontamination de son organisme, même si cela ne résout pas les problèmes de toxicité correspondant à des expositions lors de certaines fenêtres physiologiques.

En effet, l'analyse en composantes principales (ACP) de notre étude met en évidence une forte corrélation entre la proportion d'anguilles jaunes, immatures sexuellement, et la contamination de leurs muscles en PCB ndl et dl exprimée en  $\text{ng.g}^{-1}$  de matières grasses, alors que les anguilles



argentées ne sont pas corrélées ni à la contamination en PCB des muscles, ni à celle des gonades. Pourtant, dans le même temps, le GSI est fortement corrélé au pourcentage de matières grasses dans les muscles, suggérant que les lipides des gouttelettes lipidiques et de la vitellogénine proviennent des lipides musculaires, dégradés lors de la bêta-oxydation dans les mitochondries. Cependant, les proportions des congénères de PCB varient et laissent penser qu'il existe une remise en circulation des contaminants lors de l'argenture. Les lipides permettraient-ils de protéger cet organisme des contaminants en les "piégeant" dans sa matière grasse et en les relarguant tardivement lors de son unique maturation sexuelle, véritable métamorphose pubertaire, avant la ponte précédant sa mort? La mise en œuvre de cinétique d'accumulation de PCB (Tapie, 2006), la mesure des phénomènes d'hydroxylation de ces contaminants, ou encore la recherche des phénomènes adaptatifs chez l'anguille permettraient d'évaluer la charge réelle en contaminants portée par les futurs géniteurs.

Les acides gras sont par ailleurs aussi reliés aux perturbations endocrines via les stéroïdes, à la vitellogenèse et donc à l'embryogenèse, ou encore au développement parasitaire.

À ce titre, un nouvel axe de recherche tourné vers l'impact d'un des parasites spécifiques de l'anguille européenne, le nématode *Anguillicola crassus* pourrait être davantage exploité. Certes, plusieurs pistes intéressantes ont été déjà investiguées (Haenen et al, 2014). Cependant, à la lumière de nos résultats, il apparaît une corrélation significative entre l'induction de l'expression de la Vg et l'indice parasitaire PI, lui-même non corrélé à la contamination des muscles par les PCB.

Sures (2006) a démontré que ces parasites peuvent influencer le métabolisme des polluants dans des hôtes infectés en interagissant de manière synergique ou antagoniste avec ces contaminants.

Il semble qu'ils puissent provoquer des réactions physiologiques chez les hôtes. Cette interaction entre les effets des polluants et les parasites semble résulter d'une médiation partielle du système endocrinien, lui-même étant lié étroitement au système immunitaire chez le poisson. Des études expérimentales sur des anguilles dont la vessie natatoire a été infestée par le nématode *Anguillicola crassus*, révèlent que des produits chimiques toxiques comme les PCB produisent des effets immunosuppresseurs qui facilitent l'apparition d'autres infections.

En outre, on observe une augmentation plasmatique du cortisol et une immunodépression, qui s'accompagnent parfois des effets de perturbation endocrinienne.



Dans le cas de notre étude, cette corrélation entre Vg et parasitisme soulève la question des mécanismes d'action par lesquels ces parasites peuvent induire la transcription de ARNm de la Vg, bien que les effets d'une perturbation endocrine ne puissent être clairement établis.

Il semble qu'il existe des dysfonctionnements ponctuels à différents niveaux du transcriptome, mais que les "anomalies" soient insuffisantes pour déclencher une réponse au niveau protéomique, et encore moins au niveau cellulaire. En tous les cas, l'anguille possède une telle stratégie reproductrice (une seule et unique fois dans sa longue vie), qu'elle nécessite des verrouillages et des rouages extrêmement sensibles et sans aucun doute finement régulés, y compris dans le codage des gènes (Morini et al., 2014). En outre, le jeu de récepteurs vitellogéniques ou estrogéniques, présents ou absents, empêchent les signes précoces d'éventuelles perturbations endocrines d'être lisibles plus en aval (Asturiano et al., 2002). En final, il en résulte malgré tout une dépense énergétique accrue, et des mécanismes homéostatiques beaucoup plus sollicités, entraînant à terme une fatigue supplémentaire de l'organisme ou, au contraire la mise en place de phénomènes adaptatifs par présélection génétique.

Cette plasticité phénotypique permet sans doute cette étape extraordinaire de l'argenture et cette migration toute aussi exceptionnelle réalisée par les anguilles.

Des ressources génomiques pour l'anguille sont maintenant disponibles et la caractérisation transcriptomique des interactions entre le métabolisme et la maturation sexuelle, lors de l'argenture, en vue de la migration de reproduction, chez l'anguille européenne, est à l'étude.

Nos résultats restent fragmentaires mais ils permettent de souligner la présence de PE en estuaire de Loire. Cette exposition entraîne des répercussions plus ou moins visibles lors des investigations réalisées sur cette espèce sentinelle, dont la reproduction reste une énigme en milieu naturel. Cependant, fragilisées par un métabolisme perturbé, les anguilles Européennes, connues pour être résistantes, n'en demeurent pas moins affectées au niveau de leurs systèmes hormonaux et à terme dans leur comportement.

Le succès reproductif étant basé sur un ensemble de régulations fines des fonctions physiologiques, il est à redouter des incidences non négligeables à terme sur le maintien de la population. Par contre, le secteur de l'estuaire de la Loire étant globalement modérément pollué par rapport à d'autres estuaires, il est nécessaire de préserver la qualité des eaux dans ces zones afin de permettre aux anguilles jaunes en place et aux civelles entrantes d'avoir un cycle continental optimal.



# ***BIBLIOGRAPHIE***



1. Aarestrup K, al. e. 2009. *Oceanic Spawning Migration of the European Eel (Anguilla anguilla)*.
2. Abarnou A. 2008. *Distribution et devenir des contaminants persistants dans les écosystèmes littoraux. Comparaison Manche Ouest-Manche Est. . Agence de l'eau Seine Normandie - IFREMER, Plouzané: 118.*
3. Acou A, Rivot E, Van Gils J, Legault A, Ysnel F, Feunteun E. 2011. *Habitat carrying capacity is reached for the European eel in a small coastal catchment: evidence and implications for managing eel stocks. Freshwater Biology 56(5): 952-968.*
4. *activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means*
5. Adam G, Feunteun E, Prouzet P, Rigaud C. 2008. *L'anguille européenne: indicateurs d'abondance et de colonisation. Ed Quae projet indicang: pp.385.*
6. Afssa. 2006. *Rapport scientifique de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'évaluation du dispositif de surveillance du milieu et à l'évaluation du risque lié à la consommation des coquillages, notamment dans la situation du bassin d'Arcachon. N°2006-SA-0254.*
7. Aït-Aïssa,S. *Science of the Total Environment 402: 318 - 329.*
8. Amiard-Triquet C, Rainbow PS, eds. 2009. *Environmental assessment of estuarine ecosystems : A case study. CRC Press.*
9. Amiard-Triquet C, Rainbow PS, Roméo M. 2011. *Tolerance to Environmental Contaminants CRC Press Inc. ed.*
10. WHO.: *An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and 296.*
11. Ankley GT, Jensen KM, Kahl MD, Durhan EJ, Makynen EA, Cavallin JE, et al. 2010. *Use of chemical mixtures to differentiate mechanisms of endocrine action in a small fish model. Aquatic Tox 99(3): 389-396.*
12. ANSES., InVS. 2011a. *Etude nationale d'imprégnation aux polychlorobiphényles (PCB) des consommateurs de poissons d'eau douce; imprégnation et consommation alimentaire de produits de rivière - PCB. Rapport d'étude scientifique(ICAR-PCB 2011): 169.*
13. ANSES., InVS. 2011b. *Étude nationale d'imprégnationaux polychlorobiphényles des consommateurs de poissons d'eau douce. (Édition scientifique). Nantes.*
14. Anway MD, Skinner MK. 2008. *Epigenetic programming of the germ line: effects of endocrine disruptors on the development of transgenerational disease. Reproductive BioMedicine Online 16(1): 23-25.*
15. ARANDA A, PASCUAL A. 2001. *Nuclear hormone receptors and gene expression. Physiol Rev 81 1269-1304.*



16. Aroua S, Weltzien F-A, Belle NL, Dufour S. 2007. Development of real-time RT-PCR assays for eel gonadotropins and their application to the comparison of *in vivo* and *in vitro* effects of sex steroids. *General and Comparative Endocrinology* 153(1-3): 333-343.
17. Arukwe A, Celius T, Walther BT, Goksøyr A. 2000. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Tox* 49(3): 159-170.
18. Babut M, Bonnet C, Bray M, Flammarion P, Garric J, Golaszewski G. 2003. Developing environmental quality standards for various pesticides and priority pollutants for French freshwaters. *Journal of Environmental Management* 69(2): 139-147.
19. Babut M, Miege C, Roy A, Lopes C. 2009. Contaminant transfer from sediment to biota and development of a trophic model in an environmental management perspective. *CEMAGREF*.
20. Babut M, Perrodin Y. 2002. Evaluation des risques écologiques causés par des matériaux
21. Baeza R, Mazzeo I, Vilchez MC, Gallego V, Peñaranda DS, Pérez L, et al. 2014. Effect of thermal regime on fatty acid dynamics in male European eels (*Anguilla anguilla*) during hormonally-induced spermatogenesis. *Aquaculture* 430(0): 86-97.
22. Ball JN, Batten TFC. 1981. Pituitary and melanophore response to background in *Poecilia latipinna* (Teleostei). Role of the pars intermedia PAS cells. *GenCompEndocrinol* 44: 233-248.
23. Barbault. 2006.
24. Barbier G. 2009. Les perturbateurs endocriniens, le temps de la précaution.
25. Barthe M. 2011. Mécanismes de séquestration et cinétique de bioaccumulation et de métabolisation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les sédiments marins et lacustres Rimouski. Université du Québec à Rimouski.
26. Belpaire C, Geeraerts C, Roosens L, Neels H, Covaci A. 2011. What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience. *Environment International* 37(2): 354-364.
27. Ben-Attia, M.
28. Ben-Hassine, O.K.
29. Berckmans P, Leppens H, Vangenechten C, Witters H. 2007. Screening of endocrine disrupting chemicals with MELN cells, an ER-transactivation assay combined with cytotoxicity assessment. *Toxicology in Vitro* 21(7): 1262-1267.
30. Bertin L. 1951. Les anguilles. Variation, croissance, euryhalinité, toxicité, hermaphrodisme juvénile et sexualité, migrations, métamorphoses. Payot, Paris, France.
31. Bertin L. 1956. Eels: A biological study. Leaver-Hume Press Ltd. London.
32. Beullens K, Eding EH, Gilson P, Ollevier F, Komen J, Richter CJJ. 1997a. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153(1-2): 135-150.



33. Beullens K, Eding EH, Gilson P, Ollevier F, Komen J, Richter CJJ. 1997b. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153(1-2): 135-150.
34. Beullens K, Eding EH, Ollevier F, Komen J, Richter CJJ. 1997c. Sex differentiation, changes in length, weight and eye size before and after metamorphosis of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153(1-2): 151-162.
35. Biotope. 2007. Document d'objectifs des sites Natura 2000 « Estuaire de la Loire » (SIC FR5200621 et ZPS FR5210103) : Livret 4-cartographie des espèces. (14 cartes). Nantes.
36. Birkett JW, Lester JN. 2003. Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes. *Lewis Pub.*
37. Blanchet-Letrouvé I, Lafont A-G, Poirier L, Baloché S, Zalouk-Vergnoux A, Dufour S, et al. 2013. Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 97(0): 103-113.
38. Blanchet-Letrouvé I, Zalouk-Vergnoux A, Vénisseau A, Couderc M, Le Bizec B, Elie P, et al. 2014. Dioxin-like, non-dioxin like PCB and PCDD/F contamination in European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuarine continuum: Spatial and biological variabilities. *Science of The Total Environment* 472(www.elsevier.com/locate/scitotenv): 562-571.
39. Blázquez M, Piferrer F. 2005. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) androgen receptor: cDNA cloning, tissue-specific expression, and mRNA levels during early development and sex differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 237(1-2): 37-48.
40. Bouchonnet, S.
41. Brazil. . *Science of the Total Environment* 225: 81-90.
42. Brian J, Harris C, Scholze M, Backhaus T, Body P, Lamoree M, et al. 2005. Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environ Health Perspect* 113(6): 721-728.
43. Bruslé J, Bruslé S. 1983. La gonadogenèse des Poissons. *Reprod Nutr Develop* 23(3): 453-491.
44. Buckman A, Wong C, Chow E, Brown S, Solomon K, Fisk A. 2006. Biotransformation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and bioformation of hydroxylated PCBs in fish. *Aquatic Tox* 78: 176-185.
45. Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58(1-2): 85-97.
46. Burzawa-Gerard E, Dumas-Vidal A. 1991. Effects of 17[beta]-estradiol and carp gonadotropin on vitellogenesis in normal and hypophysectomized European silver female eel (*Anguilla anguilla* L.) employing a homologous radioimmunoassay for vitellogenin. *General and Comparative Endocrinology* 84(2): 264-276.



47. Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, et al. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Tox* 79(3): 257-267.
48. Cheshenko K, Pakdel F, Segner H, Kah O, Eggen RIL. 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155(1): 31-62.
49. Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, et al. 2012. Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *International Journal of Andrology* 35(3): 303-316.
50. Chu Y-W, Han Y-S, Wang C-H, You C-F, Tzeng W-N. 2006. The sex-ratio reversal of the Japanese eel *Anguilla japonica* in the Kaoping River of Taiwan: The effect of cultured eels and its implication. *Aquaculture* 261(4): 1230-1238.
51. Colborn T, Clement C. 1992. *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Scientific Publishing Co, Inc, Princeton, NJ
52. Colborn T. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and
53. Colombo G, Grandi G. 1996. Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *Journal of Fish Biology* 48: 493-512.
54. Commissariat général au développement durable 34(<http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr>): 35.
55. COMMITTEE. NRN. 1999. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell* 97: 161-163.
56. concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs)
57. Cornu P. 2012. *Les polychlorobiphényles: enjeux environnementaux et sanitaires, et mycoremédiations*
58. Couillard CM, Légaré B, Bernier A, Dionne Z. 2011. Embryonic exposure to environmentally relevant concentrations of PCB126 affect prey capture ability of *Fundulus heteroclitus* larvae. *Marine Environmental Research* 71(4): 257-265.
59. COUSE J, LINDZEY J, GRANDIEN K, GUSTAFSSON J, KORACH K. 1997. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER $\alpha$ -knockout mouse. *Endocrinology* 138: 4613-4621.
60. d Kraak, Eds World Health Organization, Geneva, Switzerland WHO/PCS/EDC/022
61. Dargnat C, Fisson C. 2010. *Les Polychloro-Biphényles (PCB) dans le bassin de la Seine et son estuaire*. GIP Seine-Aval (<http://seine-aval.crihan.fr/web/>)
62. Daverat F, Tapie N, Quiniou L, Maury Brachet R, Riso R, Eon M, et al. 2011. Otolith microchemistry interrogation of comparative contamination by Cd, Cu and PCBs of eel and



- flounder, in a large SW France catchment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 92(3): 332-338.
63. Davies IM, Vethaak D. 2012. *Integrated marine environmental monitoring of chemicals and their effects. (ICES Cooperative Research Report).*
64. Davila N, Blakemore L, Trombley P. 2003. Dopamine modulates synaptic transmission between rat olfactory bulb neurons in culture. *J Neurophysiol* 90: 395-404.
65. de Boer J, Dao QT, van Leeuwen SPJ, Kotterman MJJ, Schobben JHM. 2010. Thirty year monitoring of PCBs, organochlorine pesticides and tetrabromodiphenylether in eel from The Netherlands. *Environmental Pollution* 158(5): 1228-1236.
66. de Boer J, Hagel P. 1994. Spatial differences and temporal trends of chlorobiphenyls in yellow eel (*Anguilla anguilla*) from inland waters of the Netherlands. *Science of The Total Environment* 141(1-3): 155-174.
67. de Casamajor FM, Sanchez M, Lissardy, Boussouar A. 2005. Lettre n°5. In: *Tableau de Bord Anguille*
68. de dragage: proposition d'une approche adaptée aux dépôts en gravière en eau -. *Revue des sciences de l'eau* 15(3): 615-639.
69. de Vlaming V, Biales A, Riordan D, Markiewicz D, Holmes R, Otis P, et al. 2007. Screening California surface waters for estrogenic endocrine disrupting chemicals (EEDC) with a juvenile rainbow trout liver vitellogenin mRNA procedure. *Science of the Total Environment* 385(www.elsevier.com/locate/scitotenv): 66 - 79.
70. De Witt T, Swartz R, Lamberson J. 1989. Measuring the acute toxicity of estuarine sediments. *Environ Toxicol Chem* 8 1035-1048.
71. Dekker W. 2003. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* 10(6): 365-376.
72. Desmazes F, Sottolichio A, Bertier C, Libaud J-B, Beche M. 2010. Dynamique de la crème de vase dans l'estuaire de la Loire. (XIèmes Journées Nationales Génie Côtier - Génie Civil. Les Sables d'Olonne -j, ed).
73. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. 2009 Endocrine-Disrupting Chemicals. An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 2009 30: 293-342, doi: 10.1210/er.30.(doi: 10.1210/er.2009-0002.): 293-342.
74. Diotel N, LePage Y, Mouriec K, Tong S-K, Pellegrini E, Vaillant C, et al. 2010. Aromatase in the brain of teleost fish. Expression, regulation and putative functions. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31(2): 172-192.
75. disruptors. In *International Programme on Chemical Safety. T Damstra, S Barlow, A Bergman, R Kavlock, and G v*



76. Douard V, Brunet F, Boussau B, Ahrens-Fath I, Vlaeminck-Guillem V, Haendler B, et al. 2008. The fate of the duplicated androgen receptor in fishes: a late neofunctionalization event? *BMC Evolutionary Biology* 8(1): 336.
77. Dufour S, Burzawa-Gérard E, Le Belle N, Sbaihi M, Vidal B. 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In: *Eel Biology*, (Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K, eds). Tokyo:Springer, 107-117.
78. Dufour S, Delerue-Le Belle N, Fontaine Y-A. 1983. Effects of steroid hormones on pituitary immunoreactive gonadotropin in European freshwater eel, *Anguilla anguilla* L. *General and Comparative Endocrinology* 52(2): 190-197.
79. Dufour S, Montero M, Le Belle N, Bassompierre M, King J, Millar R, et al. 1993. Differential distribution and response to experimental sexual maturation of two forms of brain gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiology and Biochemistry* 11(1): 99-106.
80. Dufour S. 2003. TT. RR.
81. Dupont F, Petter A. 1988. *Anguillicola*, une épizootie plurispécifique en Europe. Apparition de *Anguillicola crassa* (Nématode, Anguillicolidae) chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* en Camargue, sud de la France. *BullFrPêche Piscic* 308: 38-41.
82. durable, : 5 387 p. + 320 pl. couleurs.
83. Durif C, Dufour S, Elie P. 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology* 66: 1025-1043.
84. ecosystems.". *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 69: 109-123.
85. Edeline E, Bardonnnet A, Bolliet V, Dufour S, Elie P. 2005. Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: Effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. *Hormones and Behavior* 48(1): 53-63.
86. Edeline E, Lambert P, Rigaud C, Elie P. 2006. Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eel migratory behavior. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 331(2): 217-225.
87. EELREP. 2005. Quality of life and management of living resources: "estimation of the reproduction capacity of European eel".
88. Eggleton J, Thomas KV. 2004 A review of factors affecting the release and bioavailability
89. Elie P, Girard P. 2009. Effets des micropolluants et des organismes pathogènes chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L. 1758. Collection Etude CEMAGREF 128: 121.
90. Elie P, Lecomte R, Cantrelle I, Charlon N. 1982. Définition des limites des différents stades pigmentaires durant la phase civelle d'*Anguilla anguilla* L. (Poisson, Téléostéen, Anguilliforme). *Vie et Milieu* 32.: pp. 149-157.



91. *Environment International* 30(Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science (CEFAS), UK): 973 – 980.
92. EPA. 2007. *Sediment Toxicity Identification Evaluation*. ([http://www.epa.gov/nheerl/publications/files/Sediment TIE Guidance Document.pdf](http://www.epa.gov/nheerl/publications/files/Sediment_TIE_Guidance_Document.pdf) or <http://www.epa.gov/nheerl/publications/> ).
93. Eustache F, Mondon F, Canivenc-Lavier M, Lesaffre C, Fulla Y, Berges R, et al. 2009. Chronic dietary exposure to a low-dose mixture of genistein and vinclozolin modifies the reproductive axis, testis transcriptome, and fertility. *117(8)*: 1272-1279.
94. Evans TJ, Ramesh CG, Dvm, Mvsc, Phd, Dabt, et al. 2007. Reproductive toxicity and endocrine disruption. In: *Veterinary Toxicology*. Oxford:Academic Press, 206-244.
95. Evans TJ. 2011. Endocrine disruptors. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*. San Diego:Academic Press, 873-891.
96. Evrard E. 2009. Réponses d'un poisson estuarien le flet (*Platichthys flesus*): au stress pesticides en milieu expérimental et au multi-stress in situ ». Institut Universitaire Européen de la Mer; Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin. Université de Brest.
97. Farrugio H, Elie P. 2011. État de l'exploitation de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*, Linné 1758) et éléments pour l'élaboration de plans de gestion dans la zone CGPM.
98. Fazio G, Monée H, Da Silva C, Simon-Levert G, Allienne J, Lecomte-Finiger R, et al. 2009. Changes in gene expression in European eels (*Anguilla anguilla*) induced by infection with swim bladder nematodes (*Anguillicola crassus*). *J Parasitol* 95(4): 808-816.
99. Fazio G, Sasal P, Mouahid G, Lecomte-Finiger R, Moné H. 2012. Swim bladder nematodes (*Anguillicoloides crassus*) disturb silvering in European eels (*Anguilla anguilla*). *J Parasitol* 98(4): .695-705.
100. Fenske M, Segner H. 2004. Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Tox* 67(2): 105-126.
101. Feunteun E. 2002. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*). An impossible bargain. *Ecological Engineering* 18(5): 575-591.
102. Fontaine M, Bertrand E, Lopez E, Callamand O. 1964. Sur la maturation des organes génitaux de l'anguille femelle (*Anguilla anguilla* L.) et l'émission spontanée des oeufs en aquarium. *Comp Rend Acad Sci* 259(2907-2910).
103. Fontaine M. 1936. Sur la maturation complète des organes génitaux de l'anguille mâle et l'émission spontanée. *Comp Rend Acad Sci*: 132-134.
104. Fontaine Y, Dufour S, Alinat J, Fontaine M. 1985. l'immersion prolongée en profondeur stimule la fonction gonadotrope de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle. *CRAcad Sci Paris* 300: 83-87.



105. Fontaine Y. 1993. Adaptations & versus accommodations: some neuroendocrine aspects in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 11(1): 147-154.
106. Fossi Tankoua O, Amiard-Triquet A, Denis F, Minier C, Mouneyrac C, Berthet B. 2012. Physiological status and intersex in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* from thirteen estuaries in northwest France. *Environmental Pollution* 167: 70-77.
107. Fowler P, Dora N, McFerran H, Amezaga M, Miller D. 2008. In utero exposure to low doses of environmental pollutants disrupts fetal ovarian development in sheep *Mol Hum Reprod* 14: 269-280.
108. FRAPEC. 1981. *L'écologie et l'aménagement de la Loire*. Ministère de l'Environnement. 480.
109. Frery N, Deloraine A, Zeghnoun A, Rouviere F, Cordier S, Bard D. 2000. Etude sur les dioxines et les furanes dans le lait maternel en France Rapport d'étude scientifique (InVS DSE)(Editeur : Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire
110. Frye C, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessi-Fulgheri F, Fernández M, et al. 2012. Endocrine Disrupters: A Review of Some Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on Behaviour and Neuroendocrine Systems. *Journal of Neuroendocrinology* 24(1): 144-159.
111. Gagnaire B, Gagné F, André C, Blaise C, Abbaci K, Budzinski H, et al. 2009. Development of biomarkers of stress related to endocrine disruption in gastropods: Alkali-labile phosphates, protein-bound lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquatic Tox* 92(3): 155-167.
112. Gallego V, Mazzeo I, Vilchez MC, Peñaranda DS, Carneiro PCF, Pérez L, et al. 2012. Study of the effects of thermal regime and alternative hormonal treatments on the reproductive performance of European eel males (*Anguilla anguilla*) during induced sexual maturation. *Aquaculture* 354-355(0): 7-16.
113. Gallene B. 1974. *Les accumulations turbides dans l'estuaire de la Loire - Etude de la "crème de vase*. Nantes: Université de Nantes.
114. Garric J, Ferrari B. 2005. Pharmaceuticals in aquatic ecosystem. Levels of exposure and biological effects: a review. *Revue des sciences de l'eau* 18/3: 307-330.
115. Geeraerts C, Belpaire C. 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19(2): 239-266.
116. Geeraerts C, Focant JF, Eppe G, De Pauw E, Belpaire C. 2011. Reproduction of European eel jeopardised by high levels of dioxins and dioxin-like PCBs? *Science of The Total Environment* 409(19): 4039-4047.
117. Geffard O. 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés: évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires.



118. Gérard C, Trancart T, Amilhat E, Faliex E, Virag L, Feunteun E, et al. 2013. Influence of introduced vs. native parasites on the body condition of migrant silver eels. *Parasite* 20 38.
119. Giorgi O, Deiana AM, Salvadori S, Lecca D, Corda MG. 1994. Developmental changes in the content of dopamine in the olfactory bulb of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroscience Letters* 172(1-2): 35-38.
120. GIP Le. 2006. Tableau de Bord Anguille du Bassin Loire. Lettre d'information N°8 Mai 2006: 4.
121. GIP Le. 2009. SCHEMA D'AMENAGEMENT ET DE GESTION DES EAUX DE L'ESTUAIRE DE LA LOIRE. Évaluation environnementale.
122. GIP Loire estuaire. 2014. la dynamique du bouchon vaseux. Cahier indicateur N°1, Avril 2014: 8.
123. Godde M. 2001. Evaluation de la toxicité du pyrène sur des organismes aquatiques au moyen de tests spécifiques. INSA de Lyon, 53.
124. Gouze, M.-E.
125. Gregoraszczyk EL, Ptak A. 2013. Review Article Endocrine-Disrupting Chemicals: Some Actions of POPs on Female Reproduction. *International Journal of Endocrinology* 2(<http://dx.doi.org/10.1155/2013/828532>): 9.
126. GRONEMEYER H, GUSTAFSSON J, LAUDET V. 2004. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3: 950-964.
127. Guiguen Y, Fostier A, Piferrer F, Chang C-F. 2009. Ovarian aromatase and estrogens: A pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165(3): 352-366.
128. Haenen OLM, Lehmann J, Engelsma MY, Stürenberg FJ, Roozenburg I, Kerckhoff S, et al. 2010. The health status of European silver eels, *Anguilla anguilla*, in the Dutch River Rhine Watershed and Lake IJsselmeer. *Aquaculture* 309: 15-24.
129. Hass U, Scholez M, Christiansens S, Dalgaard M, Vinggaard A. 2007. Combined exposure to antiandrogens exacerbates bdisruption of sexual differentiation in rat. *Environ Health Perspect* 115 (suppl 1): 122-128.
130. Hecker M, Karbe L. 2005. Parasitism in fish: an endocrine modulator of ecological relevance? *Aquatic Tox* 72(3): 195-207.
131. Herlder T. 1980. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on early life stages of the pike (*Esox lucius* L.). *Science of The Total Environment* 14: 255-264.
132. Hinfrey N, Palluel O, Piccini B, Sanchez W, Aït-Aïssa S, Noury P, et al. 2010. Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Science of The Total Environment* 408(9): 2146-2154.



133. Hiramatsu N, Cheek AO, Sullivan CV, Matsubara T, Hara A, Mommsen TP, et al. 2005. Chapter 16 Vitellogenesis and endocrine disruption. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. Volume 6: Elsevier, 431-471.
134. Hoar WS, Randal DJ, Donaldson EM. 1969; 1983. *Fish Physiology*, chez Academic Press). Academic Press.
135. Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, et al. 2008. *Fifteen Years after "Wingspread"-Environmental Endocrine Disruptors and Human and Wildlife Health. Where We are Today and Where We Need to Go*
136. Hubaux N, Perceval O. 2011. *Pollution des milieux aquatiques par les PCBs en France. "PCB dans les milieux aquatiques: enjeux de gestion et lacunes dans les connaissances". ONEMA.*
137. Huertas M, Scott AP, Hubbard PC, Canário AVM, Cerdà J. 2006. Sexually mature European eels (*Anguilla anguilla* L.) stimulate gonadal development of neighbouring males: Possible involvement of chemical communication. *General and Comparative Endocrinology* 147(3): 304-313.
138. humans. *Environmental Health Perspectives* 101.
139. Hylland K. 2006. "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine
140. ICES WKAREA. 2009. *Workshop on Age Reading of European and American Eel. Copenhagen.*
141. ICES. 2012. *Report of the Joint EIFAAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL). Copenhagen, Denmark.*
142. Ijiri S, Takei N, Kazeto Y, Todo T, Adachi S, Yamauchi K. 2006. Changes in localization of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage (P450scc) in Japanese eel testis and ovary during gonadal development. *General and Comparative Endocrinology* 145(1): 75-83.
143. INERIS A, Strub MP, . 2009. *Enseignements nationaux de l'opération européenne de recherche des substances émergentes dans les eaux de surface - EUMORE FATE*
144. INERIS, ed. 2012. *Les micropolluants de l'eau.*
145. INERIS. 2005. *Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques; Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. (Rapport final).*
146. INERIS. 2011. *Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Les PolyChloroBiphenyles (PCB). (DRC-11-118962-11081A).*
147. INERIS/VALORENA. 2003. *Usine d'incinération des déchets ménagers de Nantes. Synthèse de l'évaluation des risques sanitaires.*
148. INSERM. 2011. *Reproduction et environnement. Paris: Les éditions INSERM.*
149. ISBN: 978-84-613-0098-3 (Version 2.0, June).



150. ISTAS. Base de données Riscox. ([http://www.istas.net/riscox/dn\\_riscox\\_dis.asp](http://www.istas.net/riscox/dn_riscox_dis.asp)).
151. Jalabert B. 2005 Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reprod Nutr Dev* 45(3): 261-279.
152. Jeng S-R, Yueh W-S, Chen G-R, Lee Y-H, Dufour S, Chang C-F. 2007. Differential expression and regulation of gonadotropins and their receptors in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology* 154(1-3): 161-173.
153. Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M. 2005. Predicted Exposures to Steroid Estrogens in U.K. Rivers Correlate with Widespread Sexual Disruption in Wild Fish Populations. *Environ Health Perspect* 114.
154. Journées Nationales Génie Civil – Génie Côtier, 2006. Brest. 419-430.
155. Kannan K, Blankenship A, Jones P, Giesy J. 2000. Toxicity reference values for the toxic effects of polychlorinated biphenyls to aquatic mammals. *Human Ecol Risk Assess* 6: 181-201.
156. Kannan N, Reusch T, Schulz-Bull D, Petrick G, Duinker J. 1995. Chlorobiphenyls: Model compounds for metabolism in food chain organisms and their potential use as ecotoxicological stress indicators by application of the metabolic slope concept. *Environmental Science and Technology* 29: 1851-1859.
157. KASTNER P, KRUST A, TURCOTTE B, STROPP U, TORA L. 1990. Two distinct estrogenregulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9: 1603-1614.
158. Kavlock RJ. 1999. Overview of endocrine disruptor research activity in the United States. *Chemosphere* 39(8): 1227-1236.
159. KHALAF H, LARSSON A, BERG H, MCCRINDLE R, ARSENAULT G, OLSSON P. 2009. Diastereomers
160. Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, et al. 2007. Collapse of fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 8897-8901.
161. Kime DE, Nash JP, Scott AP. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 177(1-4): 345-352.
162. Kinani S, Bouchonnet S, Creusot N, Bourcier S, Balaguer P, Porcher J-M, et al. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* 158(1): 74-83.
163. Kinani S, Bouchonnet S, Creusot N, Bourcier S, Balaguer P, Porcher J-M, et al. 2009. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* 158(1): 74-83.



164. Kinani, S.
165. Kleinkauf A, Scott AP, Stewart C, Simpson MG, Leah RT. 2004. Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK)--a continuing problem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58(3): 356-364.
166. Kobayashi Y, Horiguchi R, Miura S, Nakamura M. Sex- and tissue-specific expression of P450 aromatase (*cyp19a1a*) in the yellowtail clownfish, *Amphiprion clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 155(2): 237-244.
167. Kopecka-Pilarczyk J, Coimbra Jo. 2010. Short term high hydrostatic pressure effect on selected biomarkers in silver eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 391(1-2): 118-124.
168. Kotula-Balak M, Zielinska R, Glogowski J, Kowalski RK, Sarosiek B, Bilinska B. 2008. Aromatase expression in testes of XY, YY, and XX rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 149(2): 188-196.
169. Kuiper RV, Vethaak AD, Cantón RoF, Anselmo H, Dubbeldam M, van den Brandhof E-J, et al. 2008. Toxicity of analytically cleaned pentabromodiphenylether after prolonged exposure in estuarine European flounder (*Platichthys flesus*), and partial life-cycle exposure in fresh water zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 73(2): 195-202.
170. LAGANIÈRE J, DEBLOIS G, GIGUÈRE V. 2005. Functional genomics identifies a mechanism for estrogen activation of the retinoic acid receptor *a1* gene in breast cancer cells. *Endocrinol* 19: 1584-1592.
171. Land a, Water, Australia, . 2007. *Endocrine Disrupting Chemicals in the Australian Riverine Environment: A pilot study on estrogenic compounds*. 89.
172. Landry CA, Steele SL, Manning S, Cheek AO. 2007. Long term hypoxia suppresses reproductive capacity in the estuarine fish, *Fundulus grandis*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 148(317-323).
173. Le Dù-Lacoste M. 2008. *Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (Poissons); relation exposition-génotoxicité*. Bordeaux: Université de Bordeaux 1.
174. Leaky R, Lewin R. 1996. *The Sixth Extinction*. 288.
175. Lefebure F, Mounaix B, Poizat G, Crivelli A. 2004. Impacts of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* on *Anguilla anguilla*. variation in liver and spleen masses. *Journal of Fish Biology* 64(435-447).
176. Leloup-Hatey J, Hardy A, Nahoul K, Quérat B, Zohar Y. 1988 Influence of gonadotrophic treatment upon the ovarian steroidogenesis in European silver eel (*Anguilla*



- anguilla L.*). INRA Paris, Les colloques de l'INRA, N°44, Reproduction chez les poissons, Bases fondamentales et appliquées en endocrinologie et génétique Tel-Aviv: 127-130.
177. Liney KE, Hagger JA, Tyler CR, Depledge MH, Galloway TS, Jobling S. 2006. Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1: 81-89.
178. Lipiatou E, Tolosa I, Simo R, Bouloubassi I, Dachs J, Marti S, et al. 1997. Deep-Sea Research Part II: Topical Studies Oceanography 44(34): 881-905.
179. Loire et du Guadalquivir.
180. Louiz I, Kinani S, Gouze M-E, Ben-Attia M, Menif D, Bouchonnet S, et al. 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic
181. Louiz, I.
182. Lubzens E, Young G, Bobe J, Cerdà J. 2010. Oogenesis in teleosts: how eggs are formed. *Gen Comp Endocrinol* 165(3): 367-389.
183. Lyonnaise d, Eaux. 2013. Zone libellule du SIVOM de la Palus (34): Evaluation des capacités épuratives et étude de l'évolution de la biodiversité du site.
184. Mackay D, Fraser A. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental*
185. Maes J, Belpaire C, Goemans G. 2008. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla L.*) in Flanders, Belgium. *Environmental Pollution* 153(1): 223-237.
186. Malarvannan G, Belpaire C, Geeraerts C, Eulaers I, Neels H, Covaci A. 2014. Assessment of persistent brominated and chlorinated organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in Flanders, Belgium: Levels, profiles and health risk. *Science of The Total Environment* 482-483(0): 222-233.
187. Marchand J, Elie P. 1983. Contribution à l'étude des peuplements benthiques de l'estuaire de la Loire. Examens particuliers de la dynamique et la production de la macrofaune benthique et de la dynamique des biomasses microphytobenthiques. .
188. Marchand J. 1972. BIONOMIE BENTHIQUE DE L'ESTUAIRE DE LA LOIRE. I. - OBSERVATIONS SUR L'ESTRAN MARITIME DE LA MER A CORDEMAIS (I)
189. Maria VL, Correia AC, Santos MA. 2004. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla L.*) after short-term exposure to harbour waters. *Environment International* 29(7): 923-929.
190. Marohn L, Rehbein H, Kündiger R, Hanel R. 2008. The suitability of cytochrome-P4501A1 as a biomarker for PCB contamination in European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Biotechnology* 136(3-4): 135-139.
191. Massaad C, Barouki R. 1999. An assay for the detection of xenoestrogens based on a



192. Matthiessen P, Allen Y, Bamber S, Craft J, Hurst M, Hutchinson T, et al. 2002. The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom—summary of the EDMAR programme. *Mar Environ Res* 54(3&#224;5): 645–649.
193. Matthiessen P, Allen Y, Bamber S, Craft J, Hurst M, Hutchinson TH, et al. 2002. The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom. summary of the EDMAR programme. *Marine Environmental Research* 54: 645–649.
194. Matthiessen P, Johnson I. 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environmental Pollution* 146: 9–18.
195. Matthiessen P, Johnson I. 2007. Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union. *Environ Pollut* 146(1): 9–18.
196. Matthiessen P, Law RJ. 2002. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution* 120(3): 739–757.
197. Matthiessen P. 2007. Strategy for screening of endocrine activity in the environment. *Toxicology Letters* 172, Supplement(0): S26.
198. Maurice L. 1994. Biodégradabilité de la matière organique dans le bouchon vaseux et le crème de vase de l'estuaire de la Loire. *Oceanologica Acta* 17 (5): 501–516.
199. Mazzeo I, Peñaranda DS, Gallego V, Hildahl J, Nourizadeh-Lillabadi R, Asturiano JF, et al. 2012. Variations in the gene expression of zona pellucida proteins, *zpb* and *zpc*, in female European eel (*Anguilla anguilla*) during induced sexual maturation. *General and Comparative Endocrinology* 178(2): 338–346.
200. Ménanteau L, Gallice A. 2002. La définition d'un cadre territorial pour le patrimoine estuarien : les exemples de la
201. Ménanteau Ld. 2004. Pour une géoarchéologie des estuaires. *Aestuarina Cultures et développement*
202. Menif, D.
203. Miège C, Gabet V, Coquery M, Karolak S, Jugan ML, Oziol L, et al. 2009. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(2): 186–195.
204. Migniot C, Le Hir P. 1997. Tome I, Hydrosédimentaire;1984–1994. Rapport de synthèse de l'APEEL
205. Migniot C. 1993. Bilan de l'hydrologie et de l'hydrosédimentaire de l'estuaire de la Loire au cours des deux dernières décennies.



206. Miller DH, Ankley GT. 2004. Modeling impacts on populations: fathead minnow (*Pimephales promelas*) exposure to the endocrine disruptor 17[beta]-trenbolone as a case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59(1): 1-9.
207. Minier C, Levy F, Rabel D, Bocquene G, Godefroy D, Burgeot T, et al. 2000. Flounder health status in the Seine bay. A multibiomarker study. *Mar Environ Res* 50(1-5): 373-377.
208. Montero M, Le Belle N, King JA, Millar RP, Dufour S. 1995. Differential regulation of the two forms of gonadotropin-releasing hormone (mGnRH and cRnRH-II) by sex steroids in the European female silver eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 61: 525-535.
209. Moriarty C, Dekker W. 1997. Management of the European Eel. *Fish Bulletin (Dublin)* 15: 1-125.
210. Multigner L, Kadhel P. 2008. Perturbateurs endocriniens, concepts et réalité. *Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement* 69(5-6): 710-717.
211. Myers MS, Anulacion BF, French BL, Reichert WL, Laetz CA, Buzitis J, et al. 2008. Improved flatfish health following remediation of a PAH-contaminated site in Eagle Harbor, Washington. *Aquatic Tox* 88(4): 277-288.
212. Norini M. 2007. These de doctorat.
213. of contaminants during sediment disturbance events
214. of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low
215. of the brominated flame retardant 1,2-dibromo-4-(1,2 dibromoethyl)cyclohexane induce androgen receptor activation in the hepg2 hepatocellular carcinoma cell line and the Incap prostate cancer cell line. *Environ Health Perspect* 117: 1853-1859.
216. OHTAKE F, BABA A, TAKADA I, OKADA M, IWASAKI K. 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 562-566.
217. ONEMA (étude), ONEMA (métadonnées)
218. ONEMA/IFREMER. 2010. Monitoring Haute Fréquence pour la surveillance du milieu littoral. (rapport de synthèse).
219. OSPAR. 2011. Évolution des flux polluants à la mer. Synthèse des évaluations réalisées dans le cadre des conventions Ospar et Medpol. Ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement
220. Pacheco M, Santos MA. 1999. Biochemical and Genotoxic Responses of Adult Eel (*Anguilla anguilla*L.) to Resin Acids and Pulp Mill Effluent. Laboratory and Field Experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 42(1): 81-93.
221. Palstra A, van den Thillart G. 2009. Artificial Maturation and Reproduction of the European Eel. In: *Spawning Migration of the European Eel*, Vol. 30, Part Netherlands (Palstra A, van den Thillart G, Dufour S, Rankin JC, eds). Springer Netherlands, 309-331.



222. Palstra AP, Cohen EGH, Niemantsverdriet PRW, van Ginneken VJT, van den Thillart GEEJM. 2005. Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249(1-4): 533-547.
223. Palstra AP, van Ginneken VJT, Murk AJ, Van den Thillart GEEJM. 2006. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93(3): 145-148.
224. Pankhurst NW, Lythgoe JN. 1983. Changes in vision and olfaction during sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* 23(2): 229-240.
225. Pedersen BH. 2003. Induced sexual maturation of the European eel *Anguilla anguilla* and fertilisation of the eggs. *Aquaculture* 224(1-4): 323-338.
226. Pellegrini E, Menuet A, Lethimonier C, Adrio F, Gueguen M-M, Tascon C, et al. 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 142(1-2): 60-66.
227. Perez L, Asturiano J, Tomas A, Zegrari S, Barrera R, Espinos F, et al. 2000. Induction of maturation in the male European eel (*Anguilla anguilla*): assessment of sperm quality throughout treatments. *JFish Biol* 57: 1488-1504.
228. Perraudau Y, Després L. 2009. *L'estuaire de la Loire: un territoire en développement durable?* Rennes: Presses Universitaires de Rennes.
229. Peter M, B.A. Markert AMB, Zechmeister HG. 2003. Chapter 26 Critical assessment of international marine monitoring programmes for biological effects of contaminants in the North-East Atlantic area. In: *Trace Metals and other Contaminants in the Environment*, Vol. Volume 6. Elsevier, 917-939.
230. PETERSSON K, DELAUNAY F, GUSTAFSSON J. 2000. Estrogen receptor b acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 19: 4970-1978.
231. Peyon P, Baloche S, Burzawa-Gérard E. 1993. Synthesis of Vitellogenin by Eel (*Anguilla anguilla* L.) Hepatocytes in Primary Culture: Requirement of 17beta-Estradiol-Priming. *General and Comparative Endocrinology* 91(3): 318-329.
232. Peyon P, Baloche S, Burzawa-Gérard E. 1997. Investigation into the possible role of androgens in the induction of hepatic vitellogenesis in the European eel. *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish Physiology and Biochemistry* 16(2): 107-118.
233. Peyon P, Calvayrac R, Baloche S, Burzawa-Gérard E. 1998. Metabolic studies on eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes in primary culture: effect of 17[beta]-estradiol and growth hormone. *Comp Biochem Physiol, Mol Int Physiol* 121(1): 35-44.



234. Pierron F, Baudrimont M, Bossy A, Bourdineaud J-P, Brèthes D, Elie P, et al. 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Tox* 81(3): 304-311.
235. Pierron F, Baudrimont M, Dufour S, Elie P, Bossy A, Lucia M, et al. 2009. Ovarian gene transcription and effect of cadmium pre-exposure during artificial sexual maturation of the European eel (*Anguilla anguilla*). *BioMetals* 22(6): 985-994.
236. *Pollution* 110: 375-391.
237. Porcher, J.M.
238. Porte C, Janer G, Lorusso LC, Ortiz-Zarragoitia M, Cajaraville MP, Fossi MC, et al. 2006. Endocrine disruptors in marine organisms: Approaches and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 143(3): 303-315.
239. Programme). WWHO/UNE. 2013. *The State-of-the-Science of Endocrine Disrupting Chemicals - 2012* (Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT, eds). Geneva:UNEP/WHO Available: <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/index.html> [accessed 12 March 2013].
240. Project coordinator: Tony Musu, ETUI; Santos, Tatiana Romano, Dolores Gadea, Rafael Legal deposit: M-13412-2009
241. promoter containing overlapping EREs. *Environ Health Perspect* 107: 563-536.
242. Rempel MA, Schlenk D. 2008. Effects of Environmental Estrogens and Antiandrogens on Endocrine Function, Gene Regulation, and Health in Fish. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. Volume 267, (Kwang WJ, ed). Academic Press, 207-252.
243. Renault S, Daverat F, Pierron F, Gonzalez P, Dufour S, Lanceleur L, et al. 2011. The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: Transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(6): 1573-1577.
244. *Rev Trav Inst Pêches marit* 36 (1).
245. Ribeiro CAO, Vollaïre Y, Sanchez-Chardi A, Roche H. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Tox* 74(1): 53-69.
246. Robinet T, Feunteun E. 2002. Sublethal Effects of Exposure to Chemical Compounds. A Cause for the Decline in Atlantic Eels? *Ecotoxicology* 11(4): 265-277.
247. Robinson BJ, Hui JPM, Soo EC, Hellou J. 2009. Estrogenic compounds in seawater and sediment from Halifax Harbour, Nova Scotia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(1): 18-25.



248. Roche H. 2011. *Perturbateurs endocriniens et Ecosystèmes. Médecine & Longévité* 3(2): 56-60.
249. Romaña L-A. 1994. *Les grands estuaires français. Equinoxe, spécial environnement littoral*: 47-48.
250. Safe S, Jutooru I, Chadalapaka G. 2010. *Estrogenic Endocrine Disruptors. Molecular Characteristics and Human Impacts. In: Comprehensive Toxicology, Vol. 2:McQueen, C.A., 609-621.*
251. Sanchez M, Delanoë Y. *L'envasement dans différents ports de Loire-Atlantique. In: Proceedings of the IX*
252. Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditché J-M, Porcher J-M. 2008. *Biomarker responses in wild three-spined stickleback (Gasterosteus aculeatus L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. Environment International* 34(4): 490-498.
253. Sanchez W, Piccini B, Maillot-Marchal E, Porcher J-M. 2010. *Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context. Environment International* 36(4): 377-382.
254. Schmidt J. 1923. *Breeding places and migration of the eel. Nature* 111: 51-54.
255. Scholz S, Kordes C, Hamann J, Gutzeit HO. 2004. *Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (Oryzias latipes): comparison of gene expression and protein levels. Marine Environmental Research* 57(3): 235-244.
256. SDAGE 1-B. 2005. *Rapport d'évaluation environnementale du SDAGE Loire-Bretagne 2010-2015.*
257. Sébert M-E, Amérand A, Vettier A, Weltzien F-A, Pasqualini C, Sébert P, et al. 2007. *Effects of high hydrostatic pressure on the pituitary-gonad axis in the European eel, Anguilla anguilla(L.). General and Comparative Endocrinology* 153: 289-298.
258. Sébert M-E, Weltzien F-A, Moisan C, Pasqualini C, Dufour S, Prévost E, et al. 2008. *Dopaminergic systems in the European eel: characterization, brain distribution, and potential role in migration and reproduction. In: Fish and Diadromy in Europe (ecology, management, conservation), Vol. 200, (Dumont HJ, ed).Springer Netherlands, 27-46.*
259. Sébert P, Theron M, Vettier A. 2004. *Pressure and temperature interactions on cellular respiration: a review. Cell Mol Biol* 50: 491-500.
260. Seiber JN. 1999. *Extraction, cleanup, and fractionation methods. John Wiley & Sons Inc Canada(in W. G. Fong, H. A. Moyer, J. N. Seiber & J. P. Toth (eds). Pesticide residues in foods: Methods, techniques, and regulations*
261. Shang Y, Brown M. 2002. *Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. Science of The Total Environment* 295: 2465-2468.



262. Soyano K, Aoki J-y, Itashiki Y, Park C-B, Nagae M, Takao Y, et al. 2010. Contaminations by Endocrine Disrupting Chemicals in coastal Waters of the East China Sea. *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, Eds., A. Ishimatsu and H.-J. Lie, pp. 215-226. by TERRAPUB and Nagasaki University.
263. Stavrakakis C. 2007. *Analyse et évolution de perturbateurs endocriniens en épuration et traitement des eaux.*
264. Stouthart X, Huijbregts M, Balm P, Lock R, Wendelaar Bonga S. 1998. Endocrine stress response and abnormal development in carp (*Cyprinus carpio*) larvae after exposure of the embryos to PCB 126. *Fish Physiology Biochemical* 18: 321-329.
265. Sultan C, Balaguer P, Terouanne B, Georget V, Paris F, Jeandel C, et al. 2001. Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 178(1-2): 99-105.
266. Sumpter JP, Jobling S. 1995. Vitellogenin as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103: 173-178.
267. Sunobe T, Nakamura M, Kobayashi Y, Kobayashi T, Nagahama Y. 2005. Aromatase immunoreactivity and the role of enzymes in steroid pathways for inducing sex change in the hermaphrodite gobiid fish *Trimma okinawae*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 141(1): 54-59.
268. SWEDENBORG E, POWER K, CAI W, PONGRATZ I, RÜEGG J. 2009. Regulation of estrogen receptor *b* activity and implications in health and disease. *Cell Mol Life Sci* 66: 3873-3894.
269. Tair-Abbaci K, Garric J. 2012. *Histological Study of Gonadogenesis in Potamopyrgus antipodarum and Valvata piscinalis.* *J Cytol Histol* 3(doi: 10.4172/2157-7099.1000140): 140.
270. Tapie N, Le Menach K, Pasquaud S, Elie P, Devier MH, Budzinski H. 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83(2): 175-185.
271. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken R-D, Servos M. 1999. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and
272. Tesch FW. 2003. *The eel.* Oxford: Blackwell Science.
273. Thomas P, Rahman MS, Khan IA, Kummer JA. 2007. Widespread endocrine disruption and reproductive impairment in an estuarine fish population exposed to seasonal hypoxia *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 274: 2693-2702.
274. Thomé RG, Domingos FFT, Santos HB, Martinelli PM, Sato Y, Rizzo E, et al. 2012. Apoptosis, cell proliferation and vitellogenesis during the folliculogenesis and follicular growth in teleost fish. *Tissue and Cell* 44(1): 54-62.



275. Thouvenin B, Le Hir P. 1994. Dissolved oxygen model in the Loire Estuary. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark. 169-178.
276. Thouvenin B, Romana L. 1992. Modélisation mathématique de l'oxygène dissous dans l'estuaire de la Loire. Première Phase.
277. Togola A, Amalric L, Bristeau S. 2008. Les substances pharmaceutiques dans les eaux superficielles et souterraines du Bassin Loire-Bretagne.
278. TOXICOLOGICAL SCIENCES
279. Trade Union Priority List for REACH Authorisation. 2010. ISTAS
280. Trubiroha A, Kroupova H, Würtz S, Frank SN, Sures B, Kloas W. 2010. Naturally-induced endocrine disruption by the parasite *Ligula intestinalis* (Cestoda) in roach (*Rutilus rutilus*). . *General and Comparative Endocrinology* 166: 234-240.
281. Tsukamoto K, al. e. 2011. Oceanic spawning ecology of freshwater eels in the western North Pacific. *Nature Communications* 2: 179.
282. v. 11 n. 1-6(DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00004553>): 77-84.
283. van den Thillart G, Dufour S, Rankin JC. 2009. Spawning migration of the European eel: reproduction index, a useful tool for conservation management
284. van der Meer J, van der Veer HW, Witte JJJ. 2011. The disappearance of the European eel from the western Wadden Sea. *Journal of Sea Research* 66(4): 434-439.
285. van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13(2): 57-149.
286. van der Oost R, Goksøyr A, Celander M, Heida H, Vermeulen NPE. 1996a. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Tox* 36(3-4): 189-222.
287. van der Oost R, Opperhuizen A, Satumalay K, Heida H, Vermeulen NPE. 1996c. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs. *Aquatic Tox* 35(1): 21-46.
288. Van Der Oost R, Satumalay K, Goksoyr A, Vindimian E, Van Den Brink P, Heida H, et al. 1996b. Relationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBS, OCPS and PAHS) and biochemical markers in feral eel (*Anguilla anguilla*); a multivariate analysis. *Marine Environmental Research* 42(1-4): 281.
289. van der Oost R, Vindimian E, van den Brink PJ, Satumalay K, Heida H, Vermeulen NPE. 1997. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic Tox* 39(1): 45-75.



290. van Ginneken V, Maes G. 2005. The European eel (&i&gt;Anguilla anguilla&lt;/i&gt;, Linnaeus), its Lifecycle, Evolution and Reproduction. A Literature Review. *Rev Fish Biol Fish* 15(4): 367-398.
291. van Ginneken V, Maes GE. 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15(4): 367-398.
292. van Ginneken V, Palstra A, Leonards P, Nieveen M, van den Berg H, Flik G, et al. 2009. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquatic Tox* 92(4): 213-220.
293. van Ginneken V, Palstra A, Leonards P, Nieveen M, van den Berg H, Flik G, et al. 2009. PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquatic Tox* 92(4): 213-220.
294. Varanasi U, Nishimoto M. 1985. *Federation Proceedings* 44(3).
295. Vidal B, Pasqualini C, Le Belle N, Holland M, Sbahi M, Vernier P, et al. 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. *Biol Reprod* 71: 1491-1500.
296. vom Saal FS, Guillette Jr LJ, Myers JP, Swan SH, Sven Erik J, Brian F. 2008. *Endocrine Disruptors: Effect in Wildlife and Laboratory Animals*. In: *Encyclopedia of Ecology*. Oxford: Academic Press, 1261-1264.
297. von Schalburg KR, Yasuike M, Davidson WS, Koop BF. Regulation, expression and characterization of aromatase (*cyp19b1*) transcripts in ovary and testis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 155(2): 118-125.
298. Vos JG, Dybing E, Greim HA, Ladefoged O, Lambre C, Tarazona JV, et al. 2000. Health effects of Endocrine Disrupting chemicals on wildlife with special reference to the European situation. *Crit Rev Toxicol* 30: 71-133.
299. Walker M, Peterson R. 1994. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin to brook trout (*Salvelinus fontinalis*) during early development. *Environ Toxicol Chem* 13: 817-820.
300. Walker M, Peterson RE. 1991. Potencies of polychlorinated dibenzo-p-dioxin, dibenzofuran and biphenyl congeners, relative to 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin, for producing early life stage mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *aquatic Tox* 21: 219-238.
301. Watanabe S, Aoyama J, Tsukamoto K. 2004. Reexamination of Ege's (1939) use of taxonomic characters of the genus *Anguilla*. *Bulletin of Marine Science* 74: 337-351.



302. Weltzien F-A, Pasqualini C, Sébert M-E, Vidal B, Le Belle N, Kah O, et al. 2006. Androgen-Dependent Stimulation of Brain Dopaminergic Systems in the Female European Eel (*Anguilla anguilla*). *Endocrinology* 147(6): 2964-2973.
303. Weltzien F-A, Sébert M-E, Vidal B, Pasqualini C. 2009. Dopamine Inhibition of Eel Reproduction Spawning Migration of the European Eel. In: *Spawning migration of the European eel*, Vol. 30, (van den Thillart G, Dufour S, Rankin C, eds). Springer Netherlands, 279-307.
304. Westin. 1990. Orientation mechanisms in migrating european eels. *t° and olfaction*.
305. WHO. 2002. ICPS global assessment of the state-of-the-science of endocrine
306. WHO. 2012. State of the science of endocrine disrupting chemicals .
307. WHO/UNEP. 2013. State of the science of endocrine disrupting chemicals;
308. Wildiers H, Jurcut R, Ganame J, Herbots L, Neven P, De Backer J, et al. 2008. A pilot study to investigate the feasibility and cardiac effects of pegylated liposomal doxorubicin (PL-DOX) as adjuvant therapy in medically fit elderly breast cancer patients. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 67(2): 133-138.
309. Wilson. 1996.
310. Wong A, Chang J, Peter R. 1993. Dopamine functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish, *Carassius auratus*. *Fish Physiology And Biochemistry*
311. Wu RSS, Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ. 2009. Effects of Hypoxia on Fish Reproduction and Development. *Fish Physiology*.
312. Wu RSS, Zhou BS, Randall DJ, Woo NYS, Lam PKS. 2003. Hypoxia Is an Endocrine Disruptor and Impairs Fish Reproduction. *Aquatic Environmental Science & Technology* 37: 1137-1141.
313. WWF. 2011. *Perturbateurs endocriniens et biodiversité: la nécessité d'un changement de paradigme*. Report: 31.
314. Yamamoto K, Yamauchi K. 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in thge aquarium. *Nature* 251: 381.
315. Yamauchi K, Nakamura M, Takahashi H, Takano K. 1976. Cultivation of larvae of Japanese eel. *Nature* 263: 412.
316. Ying G, Kookana R. 2003. Degradation of five selected endocrine-disrupting chemical in seawater and marine sediment. *EnvironSciTechnol* 37: 1256-1260.
317. Ying G-G, Kookana RS, Ru Y-J. 2002. Occurrence and fate of hormone steroids in the environment *Environment International* 28: 545-551.
318. Zoeller RT, Gore AC, Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Russ H, et al. 2009. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 2009 30: 293-342, doi: 101210/er.



# ANNEXES



N°	SEX	Weight (g)	Lenght (mm)	coef Cdt°:K	âge	Index oculaire	Nbre Parasites	RGS	DTI	HSI	Fin index	Vert Eye Diam	Horiz Eye Diam	mean ey Dia	ratio VTG	arom/actin
VA1	F a	931	849	0,15	21,5	8,84	0	1,68	0,83	1,05	4,26	9,00	10,55	9,78	0,40	0,00
VA2	F	134	462	0,14	8	5,05	0	0,16	6,59	1,51	4,20	5,15	5,75	5,45	0,17	0,00
VA3	F	206	511	0,15	7,5	4,48	1	1,32	3,09	1,08	3,87	4,85	5,95	5,40	0,10	0,00
VA4	M	76	380	0,14	3,5	3,82	0	0,73	3,74	1,37	3,58	4,00	4,60	4,30	2,61	0,03
VA5	M	46	320	0,14	4	3,38	0	0,31	2,28	1,32	3,25	3,28	4,15	3,71	0,09	0,01
VA6	M	51	350	0,12	7	3,18	1	0,27	3,32	1,37	3,34	3,53	4,00	3,76	0,05	0,00
VA7	M	44	318	0,14	7	3,71	0	0,26	3,76	1,86	3,87	3,55	4,20	3,88	11,97	0,01
VA8	M	38	300	0,14	4	4,08	0	0,48	4,33	1,62	3,73	3,68	4,23	3,95	2,29	0,01
VA9	F	50	323	0,15	5	2,98	4	0,37	2,99	1,53	3,00	3,05	3,95	3,50	0,42	0,02
VA10	M	29	276	0,14	6	1,94	2	0,21	2,76	1,46	3,08	2,23	3,00	2,61	1,04	0,01
VA11	M	61	332	0,17	7	3,69	2	0,21	2,85	1,13	3,77	3,50	4,40	3,95	26,24	0,03
VA12	M	92	422	0,12	3,5	4,22	1	0,39	3,55	1,09	3,46	4,55	4,98	4,76	0,10	0,02
VA13	F	34	280	0,15	5	2,34	6	0,13	2,85	1,24	3,04	2,78	3,00	2,89	45,46	0,08
VA 14	M	30	282	0,13	5,5	2,40	0	0,47	3,57	1,69	2,80	2,70	3,18	2,94	0,00	0,01
VA 15	M	53	336	0,14	7	3,42	1	0,40	3,41	1,88	3,45	3,28	4,38	3,83	0,09	0,01
VA 16	M	33	296	0,13	4,5	3,32	1	0,25	4,12	1,46	3,38	3,35	3,73	3,54	0,31	0,01
VA 17	M	30	295	0,12	7,5	2,77	3	0,09	2,82	1,08	3,66	3,15	3,30	3,23	0,04	0,00
VA 18	F	124	446	0,14	5	3,71	2	0,45	3,99	1,38	3,92	4,13	5,05	4,59	0,86	0,02
VA 19	F	63	370	0,12	8,5	3,61	1	0,08	4,03	1,37	3,70	3,80	4,45	4,13	0,00	0,01
VA 20	F	80	380	0,15	7	4,05	2	0,37	4,65	1,60	3,05	4,35	4,50	4,43	0,00	0,06
VA 21	I	28	258	0,16	6	1,92	0	0,58	3,71	2,22	2,95	2,45	2,58	2,51	0,58	0,02
VA 22	M	36	285	0,16	6	2,96	0	0,31	3,09	1,78	3,30	3,15	3,40	3,28	0,00	0,01
VA 23	Fa	815	781	0,17	10	9,81	2	1,91	0,94	1,77	4,53	9,45	10,30	9,88	0,00	0,00
VA 24	F	209	555	0,12	10,5	6,47	1	0,45	2,28	1,15	4,23	6,05	7,48	6,76	0,10	0,04
VA 25	I	27	287	0,11	4,5	3,77	1	0,64	4,04	2,64	3,38	3,55	3,88	3,71	0,09	4,69
VA 26	M	96	404	0,15	6	4,50	0	0,52	4,08	1,31	3,24	4,48	5,15	4,81	0,40	0,10
VA27	I	43	329	0,12	5	3,77	1	0,42	3,17	1,87	3,74	3,75	4,20	3,98	0,28	1,51
VA30	Fa	368	635	0,14	15	8,42	2	1,93	1,14	1,51	4,91	8,70	7,80	8,25	3,40	0,05
VA31	Fa	287	577	0,15	12,5	8,44	1	1,45	0,77	1,37	3,64	8,05	7,70	7,88	25,37	0,02
VA32	Fa	245	555	0,14	13,5	10,59	1	2,06	1,19	1,27	5,62	9,48	7,83	8,65	27,78	0,01
VA33	Fa	725	740	0,18	12,5	8,60	2	1,80	1,16	1,87	5,23	9,18	8,83	9,00	2,54	0,02
VA34	Fa	401	642	0,15	15	9,61	1	1,73	1,31	1,00	4,61	9,23	8,50	8,86	9034,53	0,18
VA35	Fa	363	604	0,16	9	6,88	2	1,47	1,17	1,09	4,55	7,35	7,20	7,28	72,30	0,06
VA36	Ma	83	391	0,14	8,5	8,82	8	0,22	2,01	1,37	4,88	7,20	6,05	6,63	1,71	0,02
VA37	Fa	346	590	0,17	8	9,70	0	1,89	1,22	1,12	4,22	8,70	8,38	8,54	36,39	0,32
VA38	Ma	90	376	0,17	9,5	9,98	6	1,26	0,68	2,28	5,11	7,03	6,80	6,91	1,05	0,02
VA39	Fa	295	578	0,15	abs	7,32	2	1,47	1,32	1,57	4,50	7,50	7,18	7,34	13,34	0,09

Tableau 8. Données biométriques des anguilles échantillonnées (site de Varades); Mai 2009- Novembre 2010.



*Evaluation de la contamination de l'estuaire de la Loire en Perturbateurs Endocriniens*

NA1	F	85	410	0,12	10	4,93	1	0,42	3,09	1,78	3,61	4,83	5,33	5,08	0,03	0,03
NA2	F	132	450	0,14	8,5	4,11	1	0,34	1,77	1,82	3,73	4,50	5,20	4,85	0,03	0,05
NA3	F	256	555	0,15	10,5	3,40	0	0,65	3,52	1,70	3,50	5,95	3,85	4,90	0,07	0,79
NA4	M	47	314	0,15	8	3,93	1	0,48	2,96	3,41	3,66	3,60	4,33	3,97	0,14	0,10
NA5	F	2233	1014	0,21	16	8,42	4	0,65	2,99	0,96	3,57	10,25	10,60	10,43	4,03	0,01
NA6	F	552	725	0,14	13,5	6,76	0	0,39	3,70	1,09	4,99	7,55	8,25	7,90	0,24	0,01
NA7	U	317	574	0,17	10,5	5,39	0	0,61	4,29	1,07	3,68	5,98	6,58	6,28	1,21	0,19
NA8	F	162	484	0,14	10	4,75	1	0,98	5,04	1,28	3,88	5,20	5,63	5,41	0,00	0,37
NA9	F	367	607	0,16	6,5	6,27	0	0,48	4,13	1,18	3,97	6,50	7,43	6,96	0,00	12,21
NA10	F	734	703	0,21	13	9,05	2	0,80	3,88	1,42	4,72	8,80	9,20	9,00	0,00	0,09
NA11	Fa	1380	923	0,18	12,5	10,44	2	1,47	2,22	1,34	4,40	10,70	11,45	11,08	0,17	0,97
NA12	F	134	446	0,15	9,5	4,67	0	0,52	2,62	1,58	3,63	5,05	5,25	5,15	0,47	0,40
NA13	F	112	418	0,15	9	6,40	7	0,44	2,19	2,03	5,17	5,50	6,18	5,84	0,00	0,04
NA14	U	90	369	0,18	9,5	5,76	2	0,46	3,82	1,35	4,74	5,00	5,40	5,20	0,00	1,00
NA15	F	378	591	0,18	9,5	7,28	1	0,93	2,50	1,55	4,48	7,20	7,60	7,40	0,01	0,62
NA16	U	93	379	0,17	8,5	3,70	4	0,28	2,67	1,77	3,56	3,75	4,70	4,23	0,00	0,07
NA17	U	118	398	0,19	9	3,20	0	0,34	2,61	1,81	4,15	3,85	4,20	4,03	0,00	0,17
NA18	F	115	414	0,16	8,5	2,67	2	0,40	2,30	1,47	3,99	3,75	3,75	3,75	0,00	0,02
NA19	F	148	487	0,13	9	2,24	0	1,06	2,44	1,54	3,53	3,55	3,90	3,73	0,00	0,04
NA20	F	112	408	0,16	9,5	5,56	1	0,22	3,18	1,75	4,58	5,25	5,50	5,38	0,06	0,10
NA21	F	197	516	0,14	9	5,80	1	0,37	3,14	2,13	4,34	5,90	6,45	6,18	11,98	0,66
NA22	F	266	545	0,16	12	6,61	1	0,45	2,95	1,31	4,86	6,45	7,10	6,78	2,29	0,04
NA23	F	149	464	0,15 abs		4,80	0	0,40	3,23	1,89	4,03	4,75	5,90	5,33	4,04	1,44
NA24	F	121	440	0,14	8,5	3,70	0	0,25	2,22	1,25	3,68	4,30	4,80	4,55	0,00	1,52
NA25	F	197	487	0,17	9,5	4,83	8	0,82	1,95	1,08	5,75	5,15	5,80	5,48	0,01	0,00
NA26	M	59	342	0,15	8	2,25	5	0,13	2,36	1,43	4,75	3,30	2,96	3,13	1,55	4,90
NA27	F	165	495	0,14	8,5	5,16	3	0,69	2,91	1,54	4,36	5,30	6,10	5,70	21,43	23,72
NA28	F	181	491	0,15	13	6,15	38	0,19	4,49	1,74	4,07	5,80	6,60	6,20	0,00	0,74
NA29	F	168	466	0,17	7,5	5,77	2	0,31	2,44	1,51	4,40	5,85	5,85	5,85	1,63	0,54
NA30	Fa	292	541	0,18	11,5	8,33	2	1,33	2,73	1,15	4,33	7,35	7,80	7,58	2,41	15,06

Tableau 9. Données biométriques des anguilles échantillonnées (site de Nantes); Mai 2009- Novembre 2010.



CA1	I	63	338	0,16	4	4,65	0	0,36	4,29	1,98	1,28	4,30	4,65	4,65
CA2	F	251	533	0,17	5,5	4,87	0	0,40	2,81	1,28	1,99	5,78	5,72	4,87
CA3	F	149	457	0,16	5,5	3,64	0	0,10	3,54	1,50	1,75	3,90	5,30	3,64
CA4	F	135	434	0,17	6	5,13	2	0,51	5,09	2,20	1,48	5,10	5,55	5,13
CA5	M	24	265	0,13	4	2,37	1	0,31	3,41	1,76	0,89	2,70	2,95	2,37
CA6	M	31	252	0,19	3	2,23	5	0,45	3,93	1,31	0,8	2,58	2,78	2,23
CA7	I	29	269	0,15	3	3,60	2	0,14	3,37	2,09	0,86	3,50	3,53	3,60
CA8	M	29	280	0,13	2,5	3,05	2	0,59	3,85	2,94	1,06	3,23	3,38	3,05
CA9	M	139	450	0,15	5,5	5,97	0	0,18	3,09	1,28	1,7	5,35	6,35	5,97
CA10	M	151	461	0,15	5,5	4,56	0	0,50	3,67	1,61	1,78	5,28	5,08	4,56
CA11	F	207	512	0,15	6	5,39	0	0,38	2,96	1,32	1,82	5,70	6,15	5,39
CA12	M	75	356	0,17	4,5	4,08	7	0,79	5,30	2,78	1,21	4,15	4,45	4,08
CA13	Fa	278	556	0,16	7,5	7,37	4	1,39	2,01	1,19	2,29	6,95	7,50	7,37
CA14	M	36	299	0,13	3,5	2,29	2	0,22	2,59	1,22	1,25	2,95	2,95	2,29
CA15	M	25	263	0,14	3	3,43	0	0,07	4,72	1,33	1,16	3,38	3,40	3,43
CA16	M	49	308	0,17	4	3,54	3	0,33	3,31	1,29	1,09	3,75	3,70	3,54
CA17	M	81	398	0,13	3,5	3,52	1	0,35	3,97	1,48	1,37	3,95	4,50	3,52
CA18	M	26	257	0,15	2	2,61	3	0,07	2,68	0,82	0,8	2,85	3,00	2,61
CA19	M	36	314	0,12	3	2,05	0	0,40	2,74	1,56	0,86	2,65	3,08	2,05
CA20	F	134	438	0,16	4,5	4,53	8	0,55	3,64	1,43	1,675	4,80	5,25	4,53
CA21	F	224	520	0,16	7,5	5,44	1	0,49	3,31	1,36	2,01	5,95	6,05	5,44
CA22	M	28	285	0,12	3,5	3,62	0	1,03	2,96	1,33	1,06	3,45	3,80	3,62
CA23	M	34	291	0,14	3,5	2,64	2	0,17	2,57	1,17	1,11	3,00	3,25	2,64
CA24	M	25	265	0,13	2,5	2,58	0	0,35	3,93	1,64	0,99	2,90	3,00	2,58
CA25	M	117	441	0,14	4,5	4,89	8	0,67	2,63	0,63	1,69	5,05	5,43	4,89
CA26	M	80	415	0,11	6	4,18	0	0,38	2,12	1,32	1,46	4,40	5,00	4,18
CA27	F	162	473	0,15	5	5,54	6	0,70	2,49	1,28	2,3	5,45	6,10	5,54
CA28	F	225	499	0,18	7	4,68	2	0,54	2,56	1,29	1,82	5,25	5,65	4,68

Tableau 10. Données biométriques des anguilles échantillonnées (site de Cordemais)



## RESUMÉ DE LA THÈSE EN FRANÇAIS

L'estuaire de la Loire subit des modifications liées à l'exposition potentielle de contaminants type perturbateurs endocriniens (PE). Polychlorobiphényles(PCB) et Polychlorodibenzodioxines/furanes(PCDD/PCDF) sont concernés. Cette thèse a pour objectif: 1/ d'évaluer la contamination de l'estuaire par ces PE et d'estimer les éventuelles perturbations sur *Anguilla anguilla*, du juvénile à l'adulte; 2/ mettre en évidence des liens de cause à effets potentiels entre la présence de PE et l'imprégnation dans les muscles et gonades, 3/évaluer les atteintes de la reproduction via des biomarqueurs [Vitellogénine (Vg) et aromatase]. L'existence et l'omniprésence de PE dans les sédiments de l'estuaire a été montrée avec des variations inter-site de St-Nazaire à Ancenis. Les analyses chimiques sur les organismes ont permis de souligner leur contamination significative en PCB, PCDD et PCDF, quelle que soit la classe de taille et le stade de maturité sexuelle ; les gonades étant dans l'ensemble plus contaminées que les muscles. Un lien fort entre le pourcentage de lipides et ces composés lipophiles est apparu, les lipides étant notamment nécessaires à la migration de reproduction, la vitellogenèse et l'ovogenèse. La quantification de l'expression de la Vg chez l'anguille montre que 38 % des individus présentent une expression non attendue. Les analyses en composantes principales établissent des corrélations entre PCB, % de lipides, coefficient de condition et anguilles jaunes juvéniles. Il n'existe pas de corrélation nette entre les biomarqueurs, Vg et aromatase, les niveaux de contamination en PCB et l'histologie des gonades. (1593 carac)

## RESUMÉ DE LA THÈSE EN ANGLAIS

The estuary of the Loire undergoes modifications related to the potential exposure of contaminants such as endocrine disruptors chemicals (EDCs). Polychlorobiphenyls (PCBs), Polychlorodibenzodioxines/furans (PCDDs/PCDFs) were concerned. This thesis aims to: 1/ evaluate the contamination of Loire estuary by these EDCs and estimate the possible disturbances on *Anguilla anguilla*, from yellow to silver eels, including glass eels; 2/ highlight potential correlations between the presence of EDCs and muscle and gonad impregnation; 3/ evaluate adverse effects on reproduction *via* biomarkers [vitellogenin (Vg) and aromatase]. The results showed the existence and omnipresence of EDCs in sediments with a site effect along the estuary from St Nazaire to Ancenis. The chemical analyses on fish underlined significant PCB, PCDD and PCDF contaminations, whatever the size class of and the sexual maturity stage, gonads being more contaminated than muscles. A strong link between the lipid percentage and these lipophilic compounds appeared, lipids being especially necessary for the reproduction migration, the vitellogenesis and ovogenesis. The quantification of the expression of Vg in European eel showed that 38% of the individuals presented abnormal expression levels. The principal component analyses established correlations between PCBs, muscle lipid percentages, condition index and immature yellow eels. This did not show clearly correlations between the biomarkers Vg and aromatase, PCB contamination and histology effects.

## TITRE DE LA THÈSE EN ANGLAIS

**Evaluation of the contamination of the Loire estuary by endocrine disruptor chemicals: one possible hazard for the reproduction of a endangered species, the European eel "*Anguilla anguilla*"**

