

UNIVERSITE DE NANTES
UFR DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ÉCOLE DOCTORALE Végétal, Environnement, Nutrition, Agroalimentaire, Mer (VENAM)

Année 2014

N° attribué par la bibliothèque

N° 14

Évaluation de la contamination des sédiments et de
l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans
l'estuaire de la Loire par des substances chimiques de
type perturbateurs thyroïdiens et interprétation en
termes d'écotoxicité et de risque sanitaire

THÈSE DE DOCTORAT

Mention Sciences de la Vie et de la Santé
Discipline Sciences pharmaceutiques
Spécialité Écotoxicologie

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Mickaël COUDERC

Le 24 octobre 2014, devant le jury ci-dessous

Président

Rapporteurs

M. BETOULLE Stéphane, Professeur, Université de Reims

M. FEIDT Cyril, Professeur, Université de Lorraine

Examineur

Mme GIAMBERINI, Professeur, Université de Lorraine

M. MORTAUD Stéphane, Maître de conférences, Université d'Orléans

Directeurs de thèse :

Mme MOUNEYRAC Catherine, Professeur, Université Catholique de l'Ouest

M. LE BIZEC Bruno, Professeur, ONIRIS - École Nationale Vétérinaire de Nantes

Encadrante de thèse :

Mme POIRIER Laurence, Maître de conférences, Université de Nantes

Membre invité :

Mme HERRENKNECHT Christine, Professeur, Université de Nantes

“If we are going to live so intimately with these chemicals eating and drinking them, taking them into the very marrow of our bones - we had better know something about their nature and their power.”

Rachel Carson, *Silent Spring* (1962)

Remerciements

Aux membres du jury de thèse :

- Madame Laure Giambérini, Professeur à l'Université de Lorraine
- Madame Christine Herrenknecht, Professeur à l'Université de Nantes
- Madame Catherine Mouneyrac, Professeur à l'Université Catholique de l'Ouest d'Angers
- Madame Laurence Poirier, Maître de Conférences à l'Université de Nantes
- Monsieur Stéphane Betouille, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne
- Monsieur Cyril Feidt, Professeur à l'Université de Lorraine
- Monsieur Bruno Le Bizec, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation de Nantes
- Monsieur Stéphane Mortaud, Maître de Conférences à Université d'Orléans

Qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer le travail effectué durant ces quatre années de thèse.

Je les remercie également pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture critique du manuscrit.

Aux membres de mon comité de thèse Farida Akcha et Justine Marchand, pour leurs critiques et conseils avisés dans l'orientation de ce projet.

A la région Pays de la Loire pour avoir financé cette bourse de thèse.

Au SMIDAP (Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en Pays de la Loire, à l'AADPPMFEDLA (Association Agréée Départementale des Pêcheurs Professionnels Maritimes et Fluviaux en Eau Douce de Loire-Atlantique), et à la fondation GENESIA pour leurs soutiens financiers et techniques.

« Les remerciements »...cette partie n'est pas des plus simples à rédiger (surtout quand le temps presse !)...

...ce n'est sûrement pas celle que je préfère mais elle est utile pour dire ce que parfois je n'ai pas dit alors voilà j'adresse à tous un grand MERCI !

Beaucoup de personnes ont contribué de près ou de loin à ce travail donc je vais essayer de n'oublier personne mais je ne garantis rien alors d'avance à ce que j'oublie je vous dis merci aussi !

Merci tout d'abords à mes deux directeurs de thèse Catherine Mouneyrac et Bruno Le Bizec pour la confiance et pour la grande liberté qu'ils m'ont accordé tout au long de la réalisation de ce travail. Grace à vous je pense que j'ai pu m'imprégner du métier de chercheur. Merci également pour vos conseils avisés, pour votre regard critique et constructif sur ce manuscrit.

Merci également à Christine Herrenknecht pour votre aide et vos conseils avisés notamment dans le domaine analytique.

Ce travail n'aurait sûrement pas abouti sans toi Laurence. Je ne vais pas écrire trois pages pour t'exprimer ma gratitude même si tu les mériterais... Merci pour ton encadrement, tes conseils avisés, ta disponibilité, ton écoute et le temps que tu m'as consacré Tu as été présente autant que tu le pouvais et tu m'as toujours soutenu même si parfois je ne suis sûrement pas très facile à supporter...surtout durant ce dernier mois ! Travailler avec toi était un vrai plaisir !

J'adresse un immense MERCI à Aurore, ma « collègue », pour ton soutien, ta bonne humeur permanente (mais quel est ton secret ????) et tes conseils avisés. Tu n'as jamais hésité à consacrer de ton temps pour m'aider. C'est vrai entre sudiste on se soutient ! C'était vraiment un grand plaisir de travailler avec toi !

Je garderai d'excellents souvenirs notamment des campagnes de prélèvements sur le terrain...des moments inoubliables ! Entre mon envasement, les prélèvements nocturnes à la lumière d'une torche de vélo, la crêperie de Paimboeuf, les négociations du prix des anguilles, les petits tours en bateaux (j'attends d'ailleurs avec impatience de vous voir « piloter » un bateau !)..

Aurore et Laurence, vous avez été comme des grandes sœurs et pour une fois je n'exagère pas !!!!

Merci de m'avoir chaleureusement accueilli et d'avoir pu partager des moments avec vos familles. Désolé à toi Yvan et aux enfants Martin et Louis d'avoir parfois « accaparé » Laurence ! Idem pour toi Sofiane et la petite Belinda, j'ai quelque fois « profité » de la gentillesse hors norme d'Aurore pour solliciter son aide. Merci à vous tous !

Mais que serait l'équipe « écotox » sans ce cher Abderhamane ?! Merci à toi, pour ton aide dans la réalisation de ce travail mais aussi pour toutes les discussions scientifiques, politiques, etc.

Merci à toi aussi, Isabelle pour m'avoir transmis ton savoir notamment pour réaliser les dissections de poissons, mais aussi et surtout pour les bons moments partagés ensemble ! Merci de m'avoir accueilli au sein de ta famille. Merci à vous, Gérard, Tanguy, Gwen et toi aussi Maël pour qui j'ai une pensée, pour votre chaleureux accueil.

Un énorme merci à vous mes amis de galère ! Vous les thésards que j'ai eu la chance et l'honneur de côtoyer ! Le futur de la recherche ! Merci à mes collègues féminines du bureau de thésard de MMS, Marie (ou plutôt Marie Gaga), Elodie (ma petite blanchette), Marieke (la princesse de la mer) mais aussi à mes collègues « écotox » Pierre-Emmanuel (PE) et Olivia! Et également à Thomas et Guillaume qui m'ont apporté temporairement un soutien masculin dans le bureau ! On a partagé de super moment ! Entre les apéros labo, les sorties escalades, les soirées vin/fromage, Vieux Bouc Eau (s'est codé !), les discussions philosophiques ou pas, les mots croisés, la minute cucuculturelle quotidienne... Merci pour tout ça !

Merci également aux thésards MMSiens des étages « supérieurs », Nuria, Sigrid, Anthony, Mathilde et Ismaïl pour les discussions de couloir, de laboratoire, vos conseils et votre soutiens !

Et non, je ne vous oublie pas les petites nouvelles du bureau ! Ana Camila Dos Santos Dias De La Playa Del Sol et Anne-Isaline Van Bohemen. Les sportives du labo ! Merci à toutes les deux ! Je vous souhaite une bonne thèse ! Profitez bien de ces moments ! et merci pour votre soutien !

Merci à Claude Amiard-Triquet et Jean Claude Amiard de m'avoir permis de participer à un ouvrage scientifique mais aussi pour les discussions scientifiques et rugbystiques !

Un grand merci à toute l'équipe MMS ! Pour votre accueil au sein du laboratoire. Pour les bons moments partagés qui rendent le travail moins dur ! Je vous souhaite à tous du succès dans vos recherches ! Je remercie également les membres de l'équipe sportive MMS avec qui j'ai partagé de nombreuses défaites aux rencontres avec les étudiants. Je compte sur vous pour perpétuer cette tradition !

Merci à mes collègues de mon second laboratoire le LABERCA pour leur accueil et leur aide dans la réalisation de ce travail.

Merci aux membres de l'Institut d'Études Environnementales d'Amsterdam. [Attention les yeux je me lance dans des phrases en anglais...] I would like to express my special thanks to my colleagues

from the Institute for Environmental Studies for their hospitality, their kindness and for their technical support in achieving TTR-binding assays. Dank u wel!

Enfin un très grand MERCI à ma grande famille notamment mes parents qui m'ont toujours encouragés et qui m'ont permis de réaliser ce long parcours universitaire, à mon frère qui est passé par là lui aussi et qui m'a soutenu et conseillé notamment durant la rédaction, à ma sœur qui elle aussi a contribué à me motiver notamment durant ce dernier mois difficile. A tous les petits cousins, petites cousines, cousins, cousines, oncles, tantes, à ma belle-sœur (my native english speaker !) et à mon « futur » (au moment où j'écris ces lignes) beau-frère, je vous adresse un grand MERCI !

Communication des travaux de recherche

Publications dans des journaux scientifiques internationaux à comité de lecture

Dans le cadre de la thèse :

Couderc M., Gandar A., Kamari A., Allain Y., Zalouk-Vergnoux A., Herrenknecht C., Le Bizec B., Mouneyrac C., and Poirier L. Neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol exposure during gestational and breastfeeding period on F1 rats. *Neurotoxicology* 2014; 44: 237-249.

Couderc M., Poirier L., Zalouk-Vergnoux A., Kamari A., Blanchet-Letrouvé I., Marchand P., Vénisseau A., Veyrand B., Mouneyrac C., Le Bizec B. Occurrence of POPs and other persistent organic contaminants in the European eels (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary, France. Accepted with minor revision in *Science of the Total Environment* (2014)

Dans le cadre de collaborations scientifiques :

Blanchet-Letrouvé I., Zalouk-Vergnoux A., Vénisseau A., **Couderc M.**, Le Bizec B., Elie P., Herrenknecht C., Mouneyrac C., and Poirier L. 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* 2014; 472: 562-571.

Participation à un ouvrage scientifique

Amiard J-C., Chaumot A., **Couderc M.**, Garric J., Geffard O., and Xuereb B. Impairments of Endocrine Functions: Causes and Consequences. In : *Ecological Biomarkers. Indicators of Ecotoxicological Effects*. Eds. Claude Amiard-Triquet, Jean-Claude Amiard and Philip S. Rainbow. CRC Press. 2012; 187-218.

Communications dans des congrès internationaux

Posters :

Couderc M., Bimbot M., Poirier L., Vergnoux A., Karolak S., Herrenknecht C., Levi Y., Le Bizec B., Mouneyrac C. (2012). Detection of thyroid disruption potential in sediments and water of Loire river estuary (France) using *in vitro* PC-DR-LUC assay. SETAC World Congress, Berlin, Germany.

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, *Anguilla anguilla* and *Platytytus flesus*, from the Loire estuary: correlation with sexual stage, geographic locations and thyroid effects. PRIMO Congress, Faro, Portugal.

Couderc M., Poirier L., Zalouk-Vergnoux A., Blanchet-Letrouvé I., Kamari A., Cariou R., Vénisseau A., Veyrand B., Marchand P., Mouneyrac C., Le Bizec B. (2013). Assessment of polychlorinated biphenyl (PCB), polybrominated diphenyl ether (PBDE), perfluorinated alkylated substance (PFAS) levels in European eels (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France). DIOXIN symposium, Daegu, Republic of Korea.

Table des matières

Liste des Figures.....	XIII
Liste des Tableaux.....	XV
Liste des abréviations.....	XVII
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique.....	7
I.1. Le système thyroïdien.....	8
I.1.1. Le système endocrinien.....	8
I.1.2. Le système thyroïdien.....	10
I.1.2.1. Organisation générale.....	10
I.1.2.2. Les hormones thyroïdiennes (HT).....	11
I.2. Les perturbateurs thyroïdiens.....	18
I.2.1. Les perturbateurs endocriniens (PE) : généralités.....	18
I.2.2. Les perturbateurs thyroïdiens.....	19
I.2.3. Des outils pour l'évaluation des perturbations de la fonction thyroïdienne.....	30
I.2.4. En conclusion.....	32
I.3. Des composés organiques persistants à potentiel de perturbation de la fonction thyroïdienne.....	33
I.3.1. Les polychlorobiphényles (PCB).....	34
I.3.1.1. Structures et propriétés physico-chimiques.....	34
I.3.1.2. Sources et utilisations.....	36
I.3.1.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne.....	37
I.3.2. Les polybromodiphényles éthers (PBDE).....	40
I.3.2.1. Structures et propriétés physico-chimiques.....	40
I.3.2.2. Sources et utilisations.....	41

I.3.2.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne	43
I.3.3. Les substances perfluoroalkylées (PFAS).....	45
I.3.3.1. Structures et propriétés physico-chimiques	45
I.3.3.2. Sources et utilisations	46
I.3.3.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne	47
I.3.4. Les alkylphénols (AP).....	50
I.3.4.1. Structures et propriétés physico-chimiques	50
I.3.4.2. Sources et utilisations	51
I.3.4.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne	52
I.3.5. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	54
I.3.5.1. Structures et propriétés physico-chimiques	54
I.3.5.2. Sources et utilisations	55
I.3.5.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne	56
I.3.6. Le bisphénol A (BPA)	58
I.3.6.1. Structure et propriétés physico-chimiques.....	58
I.3.6.2. Sources et utilisations	59
I.3.6.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne	60
I.4. Un site d'étude : l'estuaire de la Loire.....	62
I.4.1. Les estuaires : généralités	62
I.4.2. L'estuaire de la Loire	63
I.4.2.1. La Loire et son estuaire.....	63
I.4.2.2. Quelques caractéristiques physico-chimiques	64
I.4.2.3. Les activités humaines	65
I.4.2.4. Des espaces naturels.....	66
I.5. L'anguille européenne (<i>Anguilla anguilla</i>) : une espèce sentinelle.....	67
I.5.1.1. Description de l'anguille européenne	67
I.5.2. Cycle de vie de l'anguille européenne	69

I.5.3. Aire de distribution de l'anguille européenne.....	70
I.5.4. Intérêt écologique et économique de l'anguille européenne.....	71
I.5.5. Utilisation de l'anguille européenne en tant qu'espèce sentinelle.....	73
Chapitre II : Etude du biotope estuarien : contamination par des polluants organiques persistants et toxicité potentielle de la colonne d'eau et des sédiments des vasières intertidales et subtidales	75
II.1. Introduction	76
II.2. Matériels et méthodes	77
II.2.1. Analytes, standards et solvants.....	77
II.2.2. Échantillonnage	78
II.2.3. Extraction.....	79
II.2.3.1. Extraction sédimentaire des PCB et PBDE	79
II.2.3.2. Extraction sédimentaire des HAP, des AP et du BPA.....	80
II.2.3.3. Extraction des contaminants adsorbés sur la phase stationnaire des capteurs passifs	81
II.2.4. Analyse du carbone organique total (COT) dans les sédiments	82
II.2.4.1. Préparation des échantillons	82
II.2.4.2. Instrument	82
II.2.4.3. Assurance et contrôle qualité.....	83
II.2.5. Test de liaison à la TTR (TTR-binding assay)	84
II.2.5.1. Extraction.....	84
II.2.5.2. Purification	85
II.2.5.3. Test de liaison à la TTR (TTR binding assay).....	85
II.2.6. Analyse des PCB et des PBDE.....	86
II.2.6.1. Instrumentation	86
II.2.6.2. Contrôle qualité	87
II.2.7. Analyse des HAP, des AP et du BPA.....	88
II.2.7.1. Instrumentation	88

II.2.7.2. Transposition HPLC vers UHPLC	89
II.2.7.3. Contrôle qualité	92
II.2.8. Analyses statistiques	94
II.3. Résultats et discussion	95
II.3.1. Profils et concentrations des HAP dans les échantillons	95
II.3.1.1. Étude des profils des HAP	95
II.3.1.2. Étude des variations saisonnières et de l'effet site en vasière intertidale ...	99
II.3.1.3. Étude des variations saisonnières et de l'effet site en vasière subtidale ...	104
II.3.1.4. Étude des variations entre les vasières intertidales et subtidales	107
II.3.2. Profils et concentrations des AP, des PCB et des PBDE dans les échantillons	107
II.3.2.1. Étude des profils des AP	107
II.3.2.2. Étude des profils des PCB	110
II.3.2.3. Étude des profils des PBDE	112
II.3.2.4. Étude de l'effet site sur la contamination en AP, PCB et PBDE en vasière intertidale	114
II.3.3. Étude de l'effet site en vasière intertidale pour le BPA	117
II.3.4. Étude du potentiel d'activité des extraits au test de liaison à la TTR	117
II.3.5. Étude des relations entre les résultats au test de liaison à la TTR et la contamination des sites	121
II.4. Conclusion	124
Chapitre III : Étude du <i>biota</i> : taux d'imprégnation tissulaire par des polluants organiques persistants de l'anguille européenne (<i>Anguilla anguilla</i>) et relation avec des marqueurs potentiels de perturbations thyroïdiennes	126
III.1. Introduction et contexte de l'étude	127
III.2. Article 1	129
III.3. Article 2	175
III.4. Conclusion	222

Chapitre IV : Evaluation du risque sanitaire lié à la consommation de poissons contaminés par des polluants organiques persistants	226
IV.1. Introduction et contexte de l'étude.....	227
IV.2. Article 3.....	230
IV.3. Résultats additionnels	271
IV.4. Conclusion	272
Chapitre V : Conclusion Générale et perspectives	275
Références bibliographiques	286
Annexes	320

Liste des Figures

Figure 1. Principales glandes du système endocrinien chez les vertébrés (http://coproweb.free.fr).	9
Figure 2. Schéma général du système thyroïdien.....	10
Figure 3. (A) Schéma et coupe histologique de follicules de la glande thyroïde, et (B) schéma de la synthèse et de la sécrétion des hormones thyroïdiennes au sein des follicules.	12
Figure 4. Structures chimiques de la tyrosine, de la triiodothyronine (T3) et de la thyroxine (T4).....	13
Figure 5. Structure chimique générique des PCB.	34
Figure 6. Structure chimique générique des PBDE.....	40
Figure 7. Structure chimique générique des acides perfluorocarboxyliques (A), des acides perfluorosulfoniques (B) et des acides perfluoroalkylsulfoniques (C).	46
Figure 8. Structure chimique générique des alkylphénols.	50
Figure 9. Structures chimiques des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA.	54
Figure 10. Structure chimique du bisphénol A	58
Figure 11 : Principaux cours d'eau fluviaux de France et bassin versant de la Loire.....	63
Figure 12. L'estuaire de la Loire	64
Figure 13. Caractéristiques et classification biologique de l'anguille européenne (fishbase.org et migrateur-loire.fr).....	67
Figure 14. Cycle de vie de l'anguille européenne (<i>Anguilla anguilla</i>)	69
Figure 15 Aire de distribution de l'anguille européenne (FAO, 2014).....	70
Figure 16. Répartition des densités d'anguilles sur le bassin de la Loire (source ONEMA, 2007).....	73
Figure 17. Carte des points de prélèvement des sédiments et des capteurs passifs. De l'amont vers l'aval : Ancenis, Champtoceaux, Bellevue Sud, Rezé, Haute-Indre, Paimboeuf, Donges, Mindin, Saint-Nazaire. Les points correspondent aux sites de déploiement des capteurs passifs, les triangles aux sites de prélèvement des sédiments dans la zone intertidale et les croix aux prélèvements des sédiments dans la zone subtidale.	79
Figure 18. Schéma de fonctionnement d'un analyseur élémentaire CHNS.....	83
Figure 19. Principe du test "TTR-binding assay", d'après Legler <i>et al.</i> 2002.....	85
Figure 20. Profils de contamination en HAP des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison	96

Figure 21. Profils de contamination en HAP des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison	96
Figure 22. Profils de contamination en AP des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison	108
Figure 23. Profils de contamination en AP des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison	109
Figure 24. Profils de contamination en PCB des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison	110
Figure 25. Profils de contamination en PCB des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison	111
Figure 26. Profils de contamination en PBDE des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison	113
Figure 27. Profils de contamination en PBDE des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison	113
Figure 28. Variation des niveaux de contamination des sédiments intertidaux en fonction du site de prélèvement.....	116
Figure 29. Résultats des tests de liaison à la TTR des vasières intertidales par site et par saison exprimés en ng d'équivalent T4 par g de sédiment sec (A) et de COT (B).....	118
Figure 30. Résultats des tests TTR des vasières subtidales par site et par saison en ng d'équivalent T4 par g de sédiment sec (A) et par g de COT (B).....	119
Figure 31. Activité en ng d'équivalent T4/g d'extrait (phase stationnaire) des capteurs passifs comparée à celle des extraits sédimentaires (sédiment sec) sur le site de Haute-Indre	120
Figure 32. Analyse en Composantes Principales : (A) Cercle des corrélations des 2 premiers facteurs; (B) Projection des points de prélèvements	122

Liste des Tableaux

Tableau 1. Nomenclature des PCB (IUPAC).....	35
Tableau 2. Propriétés Physico-chimiques des 10 groupes de congénères de PCB (adapté d'après Erickson (1997)).....	36
Tableau 3. Principales caractéristiques physico-chimiques des groupes de congénères et des mélanges commerciaux de PBDE (De Wit <i>et al.</i> 2002 ; Tittlemier <i>et al.</i> 2002).....	41
Tableau 4. Utilisation annuelle mondiale des PBDE en tonnes pour l'année 2001 (Law <i>et al.</i> 2006).....	42
Tableau 5. Principales caractéristiques physico-chimiques de l'octylphénol et du nonylphénol (INERIS, 2005).	51
Tableau 6. Principales propriétés physico-chimiques du BPA	58
Tableau 7. Les 15 espèces du genre <i>Anguilla</i>	68
Tableau 8. Analytes, formules brutes, N° CAS et masses molaires associés	77
Tableau 9. Date et localisation des sites de prélèvement des sédiments et des capteurs passifs en estuaire de la Loire	78
Tableau 10. Conditions opératoires pour l'extraction des PCB et PBDE par ASE.....	79
Tableau 11. Conditions opératoires pour l'extraction des HAP, AP et du BPA par ASE.....	80
Tableau 12. Conditions opératoires pour l'extraction à l'ASE des contaminants adsorbés sur la phase stationnaire des capteurs passifs.....	81
Tableau 13. Moyenne et écart-type des valeurs obtenues et des valeurs certifiées (% , poids sec) des échantillons de référence B2152 et MS68.....	84
Tableau 14. Conditions opératoires d'extraction par ASE des sédiments pour le test de liaison à la TTR.....	84
Tableau 15. Temps de rétention et ions cibles pour l'analyse des 7 PCB	86
Tableau 16. Temps de rétention et ions cibles pour l'analyse des 7 PBDE.....	87
Tableau 17. Limites de détection (LOD) en pg/g sédiment sec et de quantification (LOQ) en pg/g de sédiment sec des congénères de PCB et PBDE.....	88
Tableau 18. Couple de longueurs d'ondes de fluorescence pour chaque analyte.....	89
Tableau 19. Résolution entre chaque analyte, après optimisation UHPLC	91
Tableau 20. Données de quantification : équation de droite, gamme de linéarité et coefficient de corrélation en fonction des analytes	92

Tableau 21. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) par analyte exprimées en ng/mL et ng/g de sédiment sec.....	93
Tableau 22. Rendements (%) de filtration et d'extraction par analyte	94
Tableau 23. Concentrations en HAP par ng/g de phase stationnaire séquestrée dans les capteurs passifs.....	97
Tableau 24. Ratio Phénanthrene/Antracène Fluorène/Pyrène et sources potentielles de contamination en HAP associées par site de prélèvements et en fonction de la saison.....	99
Tableau 25. Résultats des contaminations par les HAP en zone intertidale exprimés en ng/g de sédiment sec et en ng/g de COT: comparaison entre les saisons et les sites.....	102
Tableau 26. Résultats des contaminations par les HAP en zone subtidale exprimés en ng/g de sédiment sec et en ng/g de COT: comparaison entre les saisons et les sites.....	105
Tableau 27. Résultats des contaminations en AP des sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec: comparaison intersites	114
Tableau 28. Résultats des contaminations en PCB des sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec: comparaison intersites	115
Tableau 29. Résultats des contaminations en PBDE des sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec: comparaison intersites	115
Tableau 30. Résultats des concentrations en AP, PCB et PBDE exprimés en ng/g de phase stationnaire séquestrée dans les capteurs passifs.....	115
Tableau 31. Résultats de contamination en BPA dans les sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec : comparaison intersites	117
Tableau 32. Résultats de l'étude histologique et des mesures de concentrations en hormones thyroïdiennes plasmatiques chez les femelles exposées et chez la génération F1 à deux âges différents [21 jours post-natales (PND21) et 75 jours post-natales (PND75)]. Tailles moyennes des follicules thyroïdiens internes et externes (en µm). Concentrations moyennes en hormones thyroïdiennes T3 libre, T4 totale et TSH.....	271

Liste des abréviations

AADPPMFEDLA : Association Agréée Départementale des Pêcheurs Professionnels Maritimes et Fluviaux en Eau Douce de Loire-Atlantique

ABS : Acrylonitrile Butadiène Styrène

ACP : Analyse en Composantes Principales

ADHD : Attention-Deficit Activity Disorder

ADN : Acide désoxyribonucléique

AhR : Aryl hydrocarbon receptor

ANOVA : ANalysis Of VAriance (analyse de la variance)

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

AP : Alkylphénol

APE : Alkylphénol éthoxylates

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ASE : Accelerated Solvent Extraction

BDE : Brominated Diphenyl Ethers

BPA : Bisphénol A

BBOT : 2,5-(bis(5-tert-butyl-2-benzoxazol-2-yl) thiophène

BFR : Brominated Flame Retardants

BW : Body Weight

CAS : Chemical Abstract Service

CHAMACOS : Center for the Health Assessment of Mothers and Children of Salinas

CITES : Convention on International Trade of Endangered Species

COT : Carbone Organique Total

CRM : sédiments de référence certifiés

CV-1 : cellules de rein de singe

D1 : Désiodase de type 1 (Deio 1)

D2 : Désiodase de type 2 (Deio 2)

D3 : Désiodase de type 3 (Deio 3)

DCE : Directive Cadre sur l'Eau

DCM : dichlorométhane

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

DES : Diéthylstilbestrol

DIT : Diiodotyrosine

dl-PCB : Dioxin Like - Polychlorinated Biphenyl

DMF : diméthylformamide

DMSO : diméthylsulfoxyde

dw : dry weight

ECEH : European Centre for Environment and Health (centre européen de l'environnement et de la santé)

EDC : Endocrine Disruptor Compound

EPA : Environmental Protection Agency

EQS : Environmental Quality Standard (Norme de Qualité Environnementale)

EVE : Eel Virus European

EVEX : Eel Virus European X

FAO : Food and Agriculture Organisation

GC-HRMS : Gas Chromatography coupled with High Resolution Mass Spectrometry

GD : Gestational Day

GIP : Groupement d'Intérêt Public

GLM : General Linear Model

GPC : Gel Permeation Chromatography : chromatographie par perméation de gel

GSI : Gonado-Somatic Index

GSU α : alpha-glycoprotein subunit, glycoprotéine sous unité α de la TSH ou d'autres hormones gonadotropes

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

HPA : Hypothalamic – Pituitary – Adrenal

HPG : Hypothalamic – Pituitary – Gonadal

HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance

HPT : Hypothalamic – Pituitary – Thyroid

HSI : hepato-somatic index

HT : Hormones Thyroïdiennes

HTP : Heading To Point

ICES : International Council for the Exploration of the Sea (conseil international pour l'exploration de la mer)

IUCN : International Union for Conservation of Nature

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry

LBD : Ligand Binding Domain (domaine de liaison au ligand)

LC : Chromatographie Liquide

LC-MS : Chromatographie Liquide couplée à un Spectromètre de Masse

LCE : Laboratoire de Chimie de l'Environnement

LW : Lipid Weight

LOD : Limite de détection

LOQ : Limite de quantification

LSD : Least Significant Difference (différence significative minimale)

LTM : Long-Term Memory

MCP : multiple comparison procedure (test de comparaison multiple)

MeOH : Méthanol

MIT : Monoiodotyrosine

MMI : Multimode inlet

NIS : Sodium Iodide Symporter (cotransporteur Na⁺/I⁻)

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

NP : Nonylphenol (Nonylphénol)

OH-HAP : Hydroxy - Hydrocarbures Aromatiques Polycyclique (métabolites de HAP)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ONEMA : Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques

OTAN : Organisation du Traité de l'Atlantique Nord

OP : Octylphénol

PAH : Polycyclic Aromatic Hydrocarbon

PBDE : Polybrominated Diphenyl Ethers (Polybromodiphényle Ethers)

PBT : Polybutylène Téréphtalate

PCB : Polychlorinated Biphenyl (Polychlorobiphényle)

PCDD : Polychlorodibenzo-p-dioxine

PCDF : Polychlorodibenzo-furane

PE : Perturbateur Endocrinien

PFCAs : Acides perfluorocarboxyliques

PFAS : Poly- and Perfluoroalkyl Substances (Substances Perfluoroalkylées)

PFASi : Acides perfluoroalkylsulfoniques

PFASS : Acides perfluorosulfoniques

PFBA : Acides perfluorobutanoïques

PFBS : Perfluorobutanesulfonate

PFC : Perfluorinated Compounds (Composés Perfluorés)

PFCA : Acides perfluorocarboxyliques

PFDA : Acides perfluorodécanoïques

PFDoA : Acides perfluorodécanoïques

PFDS : Perfluorodécanesulfonate

PFHpA : Acide perfluoroheptanoïque

PFHpS : Perfluoroheptanesulfonate

PFHxA : Acides perfluorohéxanoïques

PFHxS : Acide perfluorohexane sulfonique

PFNA : Acide perfluorononanoïque

PFOA : Acide perfluorooctanoïque

PFOS : Acide perfluorooctane sulfonique

PFOSi : Acide perfluorooctyl sulfinate

PFPA : Acides perfluoropentanoïques

PFTeDA : Acides perfluorotétradécanoïques

PFTTrDA : Acide perfluorotridécanoïque

PFUnA : Acides perfluoroundécanoïques

PGA : Plan de Gestion Anguille

PI : Parasite Index (indice parasitaire)

PND : Postnatal Day (jour post-natal)

POP : Persistent Organic Pollutants (Polluant Organique Persistant)

PS-HD : Polystyrène Haute Densité

PT : Perturbateur Thyroïdien

PTFE : Polytétrafluoroéthylène ou Téflon
PVC : Polychlorure de Vinyle
RIA : Dosages radio-immunologiques
RS : Reproduction Success
rT3 : Reverse Triiodothyronine
SCCP : Paraffines Chlorées à Chaîne Courte
SIM : Single Ion Monitoring
SMIDAP : Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en Pays de la Loire
SNC : Système Nerveux Central
SPE : Solid Phase Extraction (extraction sur phase solide)
STEP : Station d'épuration des eaux usées
STM : Short-Term Memory
SYVEL : SYstème de Veille dans l'Estuaire de la Loire
T1 : Monoiodotyrosine
T2 : Diiodotyrosine
T3 : Triiodothyronine ou 3,3',5-triiodo-L-thyronine ou L-thyronine ou thyronine
T4 : Tétraiodothyronine ou L-thyroxine ou thyroxine
TBBPA : Tétrabromobisphénol A
TBECH : Tetrabromoethylcyclohexane
TBG : Thyroxine Binding Globulin (globuline liant la thyroxine)
TCDD : Tétrachlorobibenzo-p-dioxine
TDI : Tolerable Daily Intake
TEF : Toxicity Equivalent Factor (facteur de toxicité équivalent)
TEQ : Toxic Equivalent Quantity
TG : Thyroglobuline
TH : Thyroid Hormone

THOX : NADPH oxydase thyroïdienne
TL : Total Length
TPO : Thyroperoxydase
TR : Thyroid Receptor (Récepteur des hormones thyroïdiennes)
TR-CALUX : Récepteur thyroïdien TR β
TRH : Thyreotropin Releasing Hormone (Thyréolibérine)
TSI : Thyroid-Somatic Index
TSH : Thyroid Stimulating Hormone (Thyréotropine)
TSHR : Thyroid Stimulating Hormone Receptor : récepteur à hormone TSH
TTR : Transthyretin (Transthyréline)
UICN : Union Internationale pour la Conservation de la Nature
UHPLC : Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance
US EPA : United States Environmental Protection Agency
Vtg : vitellogénine
WHO-TEF : World Health Organisation-Toxic Equivalent Factor (Facteur d'Equivalence Toxique de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS))
WHO-TEQ : World Health Organisation-Toxic Equivalent Quantity (Quantité Equivalente Toxique de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS))
ww : Wet weight
ZICO : Zones Importantes pour la Conservation des Oiseaux
ZNIEFF : Zones Naturelles d'Intérêt Ecologique Faunistique et Floristique

Introduction générale

Le 20^{ème} siècle est marqué par des progrès considérables pour l'Homme dans le domaine des sciences et des technologies. Cet essor a engendré un développement massif de l'activité industrielle, agricole, humaine et de l'urbanisation, et par conséquent l'apparition de nouvelles substances chimiques mais aussi l'accroissement des émissions et rejets de contaminants de l'environnement. Ce n'est que vers les années 1960 que la société prend conscience des risques que font peser ces substances chimiques sur notre environnement et notre santé, notamment lorsque Rachel Carlsson observe les effets d'un pesticide massivement utilisé, le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), sur la reproduction des oiseaux. En 1962, elle publie son livre « Silent Spring » dans lequel elle met en évidence le danger pour la faune sauvage que représente l'exposition à des produits chimiques. Une vingtaine d'années plus tard, l'apparition d'un pénis chez des mollusques marins femelles (imposex) imputée au tributylétain est observée dans le bassin d'Arcachon (Féral, 1982). De nombreuses autres observations chez d'autres espèces animales s'en suivront. Ainsi dans les années 1990, des anomalies sur les organes reproducteurs de poissons (Jobling *et al.*, 1995; Jobling *et al.*, 1996; White *et al.*, 1994), de reptiles (Guillette Jr *et al.*, 1995; Guillette Jr *et al.*, 1994) et d'oiseaux (Fry, 1995) sont reportées. Ces résultats ont conduit à mettre en évidence la capacité de certaines substances chimiques à perturber le système endocrinien, qui constitue le principal mécanisme de régulation et de contrôle des différentes fonctions de l'organisme, en association avec les systèmes nerveux et immunitaire.

Suite à ces découvertes, la préoccupation au sujet de composés présents dans notre environnement et capables de perturber le système endocrinien s'est accentuée. En réponse, les scientifiques du monde entier ont réalisé de nombreuses études pour déterminer les concentrations de ces perturbateurs endocriniens dans divers milieux (eau, sol, air), sur la faune sauvage, chez l'Homme ou encore dans les produits de consommation mais également pour identifier leurs effets spécifiques et évaluer les dangers potentiels associés à leur caractère ubiquitaire dans l'environnement. Selon la définition de l'organisation mondiale de la santé (OMS, 2002), « un perturbateur endocrinien potentiel est une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous)-populations ». Jusqu'alors les études menées sur les perturbateurs endocriniens se sont

principalement intéressées aux effets sur la fonction reproductrice. Cependant, de plus en plus d'études réalisées chez l'Homme, chez l'animal ou encore au moyen de tests *in vitro*, ont montré que la thyroïde est également vulnérable aux effets de ces substances (Boas *et al.*, 2006). Le système thyroïdien joue un rôle primordial dans la croissance, la reproduction, le métabolisme ou encore le développement des tissus (*e.g.* osseux, musculaires, nerveux). Des altérations de la glande thyroïde, du mécanisme de rétroaction, des protéines de transport, du métabolisme périphérique et de la « clairance » des hormones vont affecter la fonction thyroïdienne (Boas *et al.*, 2012). Les mécanismes impliqués dans l'homéostasie thyroïdienne sont nombreux et complexes, et certaines substances chimiques peuvent y interférer à plusieurs niveaux (Boas *et al.*, 2012). Les sources d'expositions aux PT sont de natures très diverses et de niveaux très variables. La situation est constamment en évolution, certains composés sont interdits depuis des années, d'autres plus récemment, ou certains voient leur utilisation restreinte. Parmi les PT, plusieurs appartiennent à la famille des polluants organiques persistants (POP). La Convention de Stockholm de 2004 a permis d'établir une liste de certains de ces composés (UNEP 2011, 2011). Il s'en est suivi des interdictions ou des restrictions d'utilisations pour la plupart d'entre eux. Les POP listés regroupent notamment 3 familles de composés auxquelles nous nous sommes intéressés dans ce manuscrit, les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényle éthers (PBDE) et les substances perfluoroalkylées (PFAS ou PFC). De par leurs propriétés lipophiles, ces substances sont très persistantes et tendent à s'accumuler au sein de l'environnement et des organismes vivants, contaminant ainsi l'ensemble des réseaux trophiques. L'omniprésence de ces composés dans l'environnement représente donc un risque pour les espèces y évoluant mais également pour l'Homme notamment *via* sa consommation. Les résultats d'études principalement expérimentales, ont démontré que les PCB, PBDE et PFC peuvent être considérés comme des PT (Boas *et al.*, 2012; Brucker-Davis, 1998; Chang *et al.*, 2008; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Jugan *et al.*, 2010; Kalra *et al.*, 2010; Lau *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2009; Pearce and Braverman, 2009; Zoeller, 2005; Zoeller, 2007). En effet, chez l'Homme comme chez l'animal, ces contaminants sont principalement associés à des perturbations de l'homéostasie thyroïdienne, des dommages sur la glande thyroïde mais également à des perturbations de la synthèse des hormones thyroïdiennes (HT), de leur transport ou encore de leur métabolisation. Chez l'Homme, quelques travaux ont été entrepris pour déterminer l'impact de ces composés sur les forts consommateurs de poissons (Hagmar *et al.*, 2001b; Persky *et al.*, 2001; Turyk *et al.*, 2006). La plupart d'entre eux ont mis en évidence des relations entre la consommation de poissons contaminés par les POP, les niveaux de contaminants dans l'organisme et des

variations anormales des concentrations des HT circulantes. Seulement quelques études se sont intéressées aux impacts de la présence de ces POP, majoritairement les PCB, sur le fonctionnement du système thyroïdien d'espèces animales sauvages (e.g. oiseaux, phoques, ours, mammifères marins) dans le milieu naturel (Braathen *et al.*, 2004; Cesh *et al.*, 2010; Chiba *et al.*, 2001; Skaare *et al.*, 2001; Sørmo *et al.*, 2005; Verreault *et al.*, 2004). Dans la plupart des cas, là encore des corrélations entre les concentrations en contaminants dans les organismes et des modifications de l'homéostasie thyroïdienne ont été observées. Parmi ces études, peu ont porté sur les poissons (Carr and Patiño, 2011). Parmi les plus récentes, Brar *et al.* (2010) et Simmons *et al.* (2014) ont mis en évidence des corrélations entre les concentrations de PCB chez le poisson pêché en baie de San Francisco et de Quinte (Canada) et des altérations de l'homéostasie thyroïdienne mais également des atteintes de certains mécanismes d'activation et de « clairance » des HT chez ces poissons. D'autres contaminants organiques présentant des caractéristiques physico-chimiques proches des POP sont également sous surveillance tels que les alkylphénols (AP) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Bergman *et al.*, 2013; European Commission, 2013). Ces substances ainsi que le bisphénol A (BPA) ont également été étudiés dans cette thèse. Les études principalement expérimentales sur le BPA indiquent qu'il peut être considéré comme un perturbateur thyroïdien au même titre que les PCB, PBDE et PFC. Néanmoins il reste bien moins étudié au regard de son activité perturbatrice de la glande thyroïde que ces derniers (Boas *et al.*, 2012; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Flint *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2009). Les effets sur le système thyroïdien des expositions aux HAP et AP ont été peu investigués et quasi exclusivement lors d'études en laboratoire (Bekki *et al.*, 2009; He *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2002; Schmutzler *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2007; Woodhead *et al.*, 1982; Xi *et al.*, 2013). L'impact des AP, HAP et du BPA sur le système thyroïdien d'espèces sauvages n'a été que très rarement étudié (Albers, 2006; Brar *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2004; Flint *et al.*, 2012; Gentes *et al.*, 2007; Peakall *et al.*, 1981). Les résultats des études disponibles ont toutefois révélé des corrélations entre niveau d'exposition et perturbation de l'homéostasie thyroïdienne.

L'action de la plupart des contaminants (POP et autres composés organiques) sur le système thyroïdien a principalement été étudiée expérimentalement et donc dans la majorité des cas, ces études n'ont porté que sur des composés seuls ou en mélanges peu complexes (produits commerciaux). L'utilisation de tests de toxicité effectués en laboratoire ne permet pas de prendre en compte l'influence des multiples paramètres environnementaux qui, dans le milieu

naturel, peuvent affecter la toxicité, tels que les facteurs abiotiques (*e.g.* salinité, marée, température, oxygénation du milieu, débit), la variabilité interspécifique des espèces et les interactions entre elles, l'hétérogénéité des populations dans leur interaction avec les polluants ou encore dans les interactions entre les polluants (Smolders *et al.*, 2004). De grandes inconnues demeurent donc sur l'étude du potentiel d'action de ces contaminants sur les organismes vivants dans le milieu naturel. De plus, le système thyroïdien étant relativement bien conservé chez les vertébrés, les facteurs environnementaux influant sur la fonction thyroïdienne chez une espèce pourraient également affecter la fonction thyroïdienne chez d'autres espèces animales, y compris l'Homme (Bergman *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2009).

Parmi les milieux où se concentrent de fortes activités anthropiques, qu'elles soient de nature industrielle ou agricole, sources de nombreux contaminants et donc susceptibles de comporter des substances potentiellement toxiques pour le système thyroïdien, se distinguent les estuaires. Ils drainent d'immenses bassins versants et constituent le réceptacle final de nombreux contaminants. Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'estuaire de la Loire (second par sa taille au niveau national), fleuve qui parcourt plus de 1000 km et draine un bassin versant de plus de 180 000 km² soit 1/5 de la surface totale de la France. Sur les rives de l'estuaire de la Loire, l'urbanisation est parfois intense et les activités industrielles, portuaires et agricoles sont nombreuses et de natures diverses. L'estuaire abrite également de nombreuses espèces animales dont certaines sont consommées par l'Homme. C'est notamment le cas de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.), espèce qui possède des caractéristiques physiologiques et comportementales (*e.g.* catadrome, carnivore, haute teneur en matières grasses, une large diffusion, euryhalinité et une longue durée de vie) particulièrement favorables à son utilisation comme espèce sentinelle pour caractériser la contamination chimique d'un milieu (Belpaire and Goemans, 2007b). Ceci est particulièrement vrai pour l'anguille jaune qui correspond à un stade de vie où le poisson est non mature sexuellement et relativement sédentaire (Belpaire and Goemans, 2007b). De plus, les profils de contaminants chez cette espèce fourniraient des informations précises sur la pression chimique spécifique d'un site, notamment dans le cas de contamination par des substances lipophiles (Belpaire and Goemans, 2007b; Belpaire *et al.*, 2008). Elle constitue donc un excellent outil d'évaluation de la contamination du milieu. L'utilisation du *biota* dans la surveillance de la qualité des eaux figure par ailleurs depuis peu comme une nouvelle exigence de la directive cadre sur l'eau (European Commission, 2013). En outre, l'anguille est une espèce menacée de disparition (CITES, 2007), sa population est en fort déclin depuis les

années 1950 (ICES, 2013). L'exposition aux contaminants est avancée comme une des possibles raisons expliquant l'effondrement des stocks (Belpaire *et al.*, 2011; Feunteun, 2002). Peu d'études portent sur sa fonction endocrine thyroïdienne (Marchelidon *et al.*, 1999; Van Ginneken *et al.*, 2007). Des informations sur son état de contamination sont donc également importantes pour permettre d'évaluer le risque sanitaire pour les consommateurs. L'utilisation d'un organisme vivant comme l'anguille permet de déterminer directement les effets des polluants *in situ*. La complexité des mélanges de polluants et du milieu étant alors prises en compte.

Le travail présenté dans ce manuscrit s'est axé autour de trois objectifs visant la caractérisation de la contamination spatiale et temporelle en substances chimiques de type perturbateur thyroïdien en utilisant deux modèles d'étude [un compartiment physique, le sédiment, et un compartiment biologique, l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*)], la détermination de l'écotoxicité pour la fonction thyroïdienne et *in fine* l'évaluation du risque sanitaire associé.

Dans un premier temps, des sédiments de l'estuaire ont été prélevés en divers points de sa partie aval à celle la plus en amont, durant chacune des 4 saisons. Après analyse chimique des contaminants, les extraits de sédiments ont été soumis à un test *in vitro* permettant de déterminer l'activité perturbatrice spécifique d'une protéine de transport des HT.

En outre, des anguilles ont été prélevées en différents points de l'estuaire à deux stades de maturation sexuelle (argentée et jaune). Le premier objectif a été de caractériser les niveaux de contamination des anguilles et d'associer d'une part les valeurs mesurées à de possibles perturbations de l'homéostasie thyroïdienne mais aussi à de potentiels dommages de l'expression de certains gènes impliqués dans le fonctionnement du système thyroïdien.

Enfin, dans le but de déterminer le risque pour les forts consommateurs de poissons de rivière, une étude toxicologique préliminaire chez le rongeur a été entreprise. L'utilisation expérimentale de rongeurs nourris avec du poisson est un outil important dans l'étude des effets biologiques induits par une alimentation à base de poissons contaminés et permet ainsi de caractériser le risque de cette consommation chez l'Homme et l'animal (Somers *et al.*, 2006). Quelques études de ce type ont déjà été menées mais sans s'intéresser aux problèmes thyroïdo-dépendants (Arnold *et al.*, 1998; Feeley and Jordan, 1998; Gerstenberger *et al.*, 2000; Jordan and Feeley, 1999; Somers *et al.*, 2006; Stewart *et al.*, 2000). Ainsi, nous avons entrepris de caractériser les effets d'un composé peu étudié comme PT, le nonylphénol, sur le

développement neurologique de rats dont les mères étaient exposées durant la gestation et la lactation à cette substance. L'étude des altérations du développement et des déficits neurocomportementaux, pouvant être induits par des perturbations de la fonction thyroïdienne, a été conduite au moyen de tests développés en ce sens et déjà décrits chez le rat.

Chapitre I : Etude bibliographique

I.1. Le système thyroïdien

I.1.1. Le système endocrinien

Chez les vertébrés, l'organisme dispose de systèmes de communication travaillant en synergie. Le système nerveux, composé principalement de la moelle épinière et d'un réseau de neurones, transmet des signaux électrochimiques nécessaires à une réponse rapide de l'organisme (quelques millisecondes). Le second système utilise un type de communication qui repose sur la production et la libération de messagers chimiques par des glandes. Son mode d'action bien que plus lent (de quelques secondes à plusieurs jours) est adapté à une réponse plus durable. Il s'agit du système endocrinien.

Le système endocrinien est un système complexe comprenant plusieurs organes : les glandes endocrines, des messagers chimiques : les hormones, et des cibles : les récepteurs hormonaux des cellules (Figure 1). Le terme endocrine vient du terme *endo* qui signifie dedans et de *krinein* qui signifie sécréter. Les glandes endocrines également appelées glandes à sécrétion interne produisent des substances chimiques, les hormones (*e.g.* peptidiques, stéroïdiennes, dérivées d'acides aminés, phospholipidiques) qui vont être libérées dans le liquide interstitiel (extracellulaire). Elles vont alors rejoindre la circulation sanguine. Une fois dans le sang, les hormones vont principalement se lier à des protéines de transport qui vont les conduire vers les cellules cibles qui peuvent être dispersées dans tout l'organisme. Certaines ne nécessitent pas de protéines de transport comme les hormones peptidiques qui sont hydrosolubles. Une fois arrivées à destination, elles vont alors se lier aux récepteurs membranaires (hormones hydrophiles) situés à la surface des cellules cibles ou pour d'autres, comme les hormones stéroïdiennes et les hormones thyroïdiennes, pénétrer la membrane cellulaire et se fixer aux récepteurs nucléaires (intracellulaires). Les récepteurs cellulaires vont alors déclencher une réponse en provoquant dans la cellule une réaction génétiquement déterminée, généralement en relation avec la fonction des cellules cibles. Le système endocrinien est donc un terme générique qui désigne l'ensemble des organes impliqués dans la libération de substances chimiques, les hormones et des processus d'action de ces hormones sur les cellules cibles. Des mécanismes de rétrocontrôles permettent de réguler l'action des hormones. Le système endocrinien rend donc possible une réponse dynamique, coordonnée et mesurée d'organes ou de tissus cibles à un signal provenant d'un autre organe ou également de l'environnement. Au sein de l'organisme, ce système a un rôle essentiel de contrôle et de régulation à court et à

long terme de nombreux processus nutritionnels, comportementaux et reproductifs, la croissance, le développement, les fonctions cardiovasculaires, digestives et rénales ou encore les réponses à tout type de stress (Damstra *et al.*, 2002; Marieb, 2005; Norris, 2007; Ranabir and Reetu, 2011). En règle générale, un stimulus hormonal induit au moins un des effets suivants (Marieb, 2005) : modification du potentiel de repos et/ou de la perméabilité de la membrane plasmique, synthèse de molécules régulatrices (*e.g.* enzymes) ou de protéines dans la cellule, activation ou désactivation d'enzymes ou stimulation de la mitose et de la méiose.

Le système endocrinien peut être séparé selon trois axes principaux interagissant les uns avec les autres (Damstra *et al.*, 2002; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009; Norris, 2007):

- L'axe HPG (Hypothalamic – Pituitary – Gonadal) qui intervient principalement dans la fonction de reproduction (différenciation et maturation sexuelle, vitellogénèse, etc.).
- L'axe HPA (Hypothalamic – Pituitary – Adrenal) qui agit essentiellement sur le métabolisme énergétique et la modulation des réponses aux stress.
- L'axe HPT (Hypothalamic – Pituitary – Thyroid) ou axe thyroïdienne qui joue un rôle prépondérant notamment sur la croissance osseuse, le développement du système nerveux ou encore le métabolisme basal.

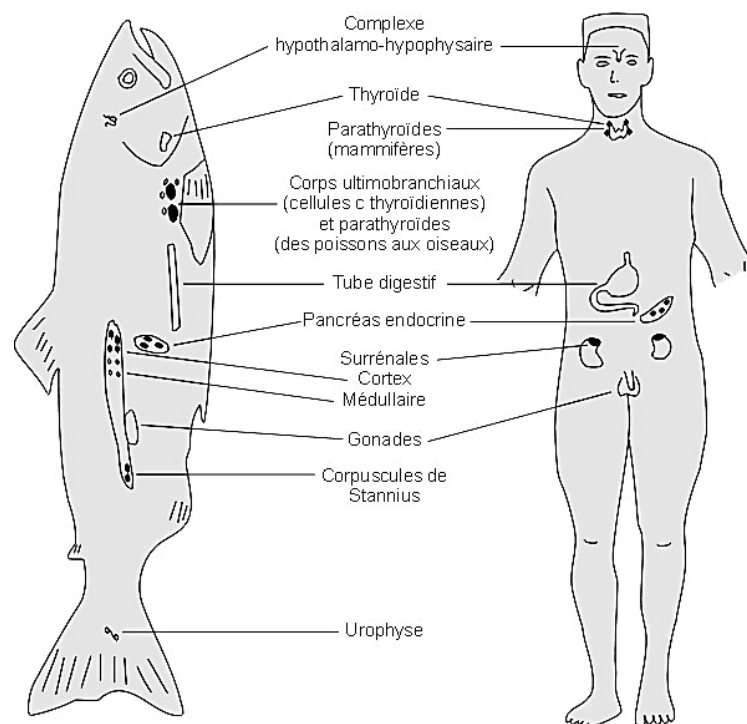


Figure 1. Principales glandes du système endocrinien chez les vertébrés
(<http://coproweb.free.fr>).

I.1.2. Le système thyroïdien

Comme la plupart des systèmes physiologiques, le fonctionnement du système thyroïdien est complexe et encore aujourd'hui des inconnues demeurent. L'axe thyroïdienne est la structure de contrôle du système thyroïdien.

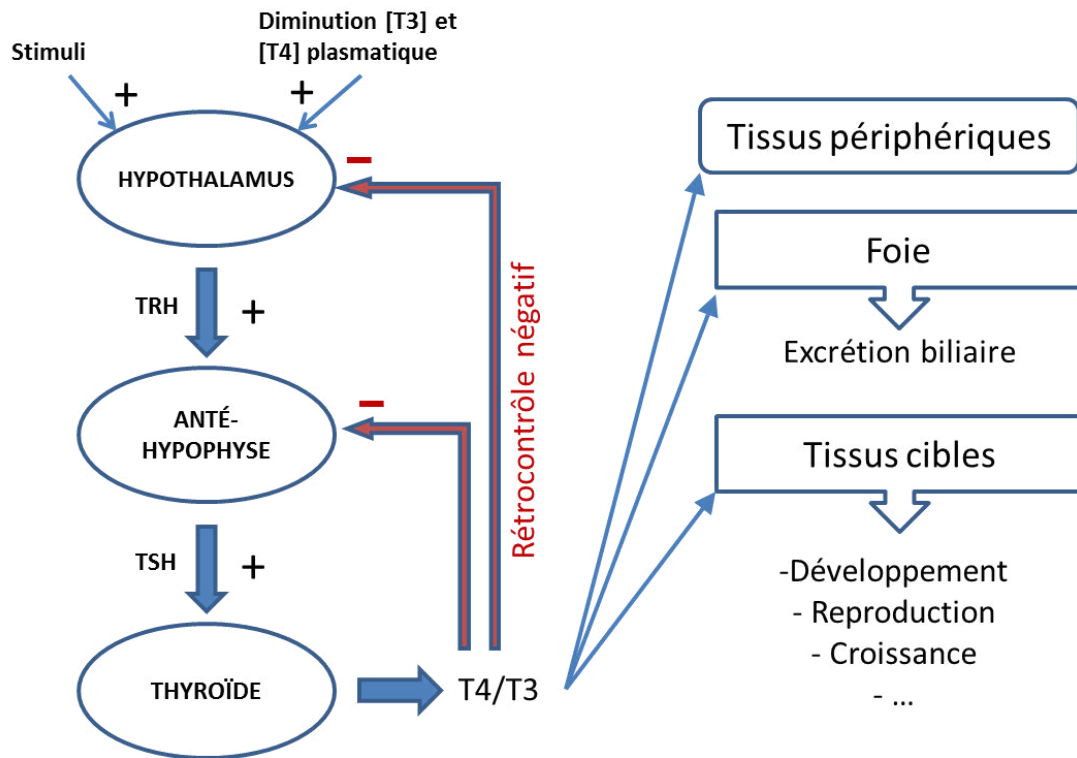


Figure 2. Schéma général du système thyroïdien.

(T3 : triiodothyronine ; T4 : thyroxine ; TRH : thyroïdolibérine ; TSH : thyroïdostimuline ; [] : concentration)

I.1.2.1. Organisation générale

L'axe thyroïdienne est composé de trois glandes : l'hypothalamus, l'anté-hypophyse et la glande thyroïdienne (Figure 2). L'hypothalamus peut être considéré comme un organe neuro-endocrinien (Marieb, 2005) car l'une de ses principales fonctions est de réaliser la liaison entre le système nerveux et le système endocrinien par l'intermédiaire d'une glande endocrine, l'hypophyse (ou glande pituitaire). Cette dernière est composée de deux lobes : l'anté-hypophyse (ou adénohypophyse) et la post-hypophyse (ou neurohypophyse). L'anté-hypophyse produit et libère plusieurs hormones (e.g. hormone de croissance, corticotrophine, hormone folliculostimulante) dont la TSH (« thyroid stimulating hormone » ou thyroïdostimuline) impliquée dans la synthèse des hormones thyroïdiennes. La thyroïde est une glande qui sécrète principalement les hormones thyroïdiennes iodées. Chez l'Homme, elle

est la glande la plus volumineuse du système endocrinien. Sa structure et son fonctionnement ont relativement bien été conservés au cours de l'évolution des vertébrés, et sont donc semblables à de nombreux égards entre les mammifères, les amphibiens et les ostéichthyens (*i.e.* poissons osseux) (Eales and Brown, 1993; Paris and Laudet, 2008; Power *et al.*, 2001). La glande thyroïde est composée de follicules, formés par un épithélium de cellules folliculaires (thyrocytes) organisées autour de l'espace folliculaire (ou lumen) qui contient la substance colloïdale. Ce colloïde constitue le lieu de formation mais également de stockage des hormones thyroïdiennes (Marieb, 2005; Norris, 2007).

La principale différence entre les mammifères et les poissons réside dans le caractère non unique chez ces derniers de la thyroïde, avec une présentation sous forme d'agrégats de follicules thyroïdiens généralement localisés dans la région ventrale du pharynx (Figure 1) (Carr and Patiño, 2011).

1.1.2.2. Les hormones thyroïdiennes (HT)

a) Synthèse et métabolisme périphérique

La synthèse des hormones thyroïdiennes (HT) (Figure 3) est organisée autour de six processus interdépendants (Marieb, 2005; Norris, 2007). Elle va débiter lorsque la TSH sécrétée par l'anté-hypophyse va se fixer sur les récepteurs des thyrocytes (cellules folliculaires). La première étape est constituée par la synthèse de la thyroglobuline (TG) au sein des cellules folliculaires d'où elle sera excrétée pour former le colloïde dans la lumière du follicule. La deuxième étape correspond à la capture et l'oxydation de l'ion iodure (I^-). Cette capture repose sur un transport actif, induit par une différence de concentration entre le milieu extra et intra cellulaire. L'ion iodure est absorbé par la membrane cellulaire grâce à un co-transporteur sodium/iodure ou symport Na/I (NIS). A l'intérieur de la cellule, l'ion iodure est oxydé et transformé en diiode (I_2). Ce dernier, lors de l'étape suivante provoque l'iodation de la tyrosine (Figure 4) que l'on retrouve dans la structure chimique de la TG. La monoiodotyrosine (MIT ou T1) lorsqu'un seul diiode est fixé à la tyrosine et la diiodotyrosine (DIT ou T2) lorsqu'il y en a deux, sont ainsi synthétisées. La quatrième étape correspond à l'assemblage par une réaction enzymatique des deux types de tyrosine T1 et T2 pour former de la thyroxine (T4) lorsque deux T2 sont assemblées, et de la triiodothyronine (T3) lorsqu'une T1 s'unit à une T2. Les MIT et DIT non liées, présentes dans les thyrocytes, vont être métabolisées et recyclées en acides aminés (tyrosine) et iode pour d'autres utilisations.

Lors de l'étape suivante, la TG iodée va pénétrer dans la cellule folliculaire par un mécanisme d'endocytose.

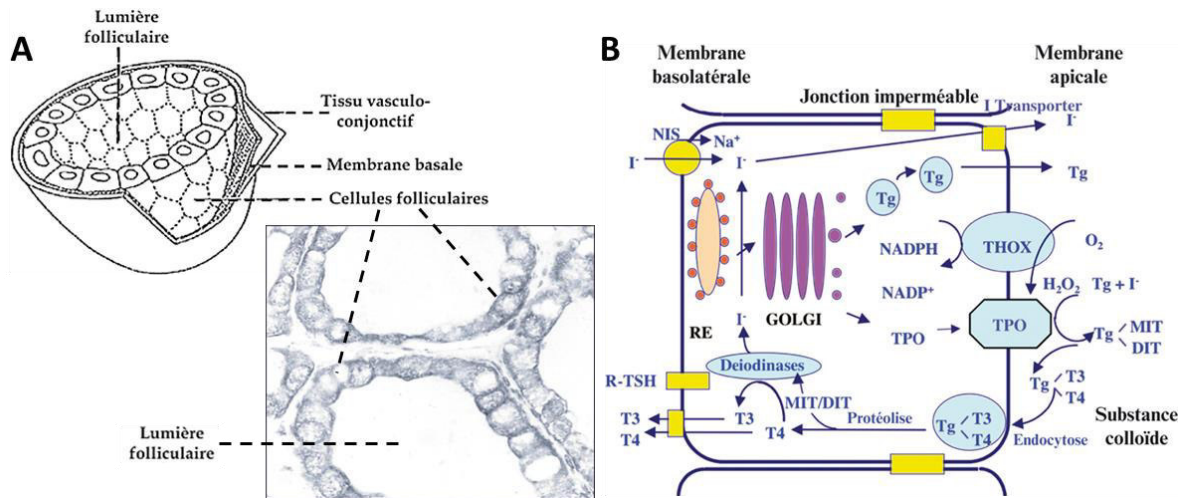


Figure 3. (A) Schéma et coupe histologique de follicules de la glande thyroïde, et (B) schéma de la synthèse et de la sécrétion des hormones thyroïdiennes au sein des follicules.

(DIT : diiodotyrosine ; MIT : monoiodotyrosine ; NIS : cotransporteur Na⁺/ I⁻ ; RE : réticulum endoplasmique ; Tg : thyroglobuline ; TPO : thyroperoxydase ; THOX : NADPH oxydase thyroïdienne) (Source : <http://www.ipubli.inserm.fr>)

Enfin, la dernière étape correspond à la séparation des hormones de la TG grâce à des enzymes lysosomiales (hydrolases). Les hormones libres vont ensuite être sécrétées par diffusion au travers de la membrane des thyrocytes et atteindre la circulation sanguine. Les deux hormones thyroïdiennes iodées formées sont : la L-thyroxine ou tétraiodothyronine ou thyroxine (T₄) et la 3,3',5-triiodo-L-thyronine ou thyronine (T₃) (Figure 4). Avant leur sécrétion dans le sang, une partie de la T₄ produite est convertie en T₃ par des enzymes, les désiodases.

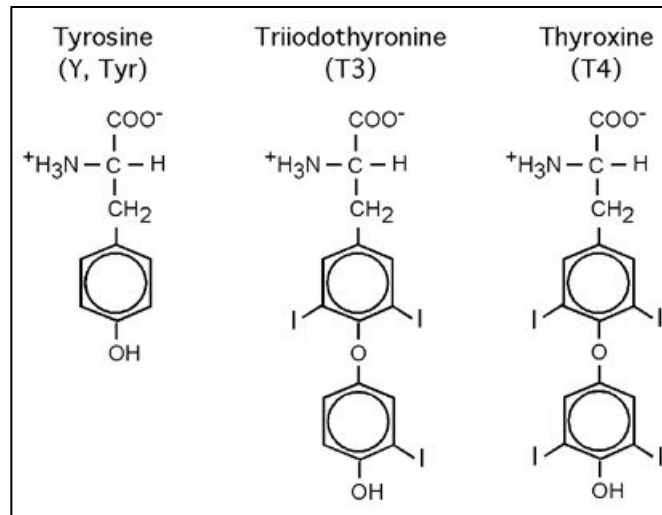


Figure 4. Structures chimiques de la tyrosine, de la triiodothyronine (T3) et de la thyroxine (T4).

Chez l'ensemble des vertébrés, la principale hormone synthétisée par la glande thyroïde est la T4 (Norris, 2007). La T3 n'est qu'en partie sécrétée par la glande thyroïde. Elle provient majoritairement de la conversion par les désiodases de la T4 en T3 dans les tissus périphériques. Le foie est le site principal de conversion mais cette dernière peut avoir lieu directement dans les cellules des tissus cibles (Norris, 2007).

Les désiodases, chez les vertébrés, participent à la régulation des niveaux des HT liées et circulantes. Elles forment un groupe de trois types d'enzymes, chacune ayant des fonctions caractéristiques dans la désiodation des HT. L'enzyme Deio1 (D1) peut convertir la T4 en T3 mais aussi en rT3 qui est une forme inactive de la T3. Sur la rT3 (3,3',5'-triiodothyronine), l'iode supprimé est celui en position 5 sur la molécule. La rT3 est inactive, sa formation participe à la régulation de la T3 (active). La Deio1 est retrouvée généralement dans la thyroïde, le foie, les reins et de nombreux autres tissus périphériques. L'enzyme Deio2 (D2) est présente principalement dans le système nerveux central, l'hypophyse et la thyroïde. Elle convertit essentiellement la T4 en T3. Enfin, la Deio3 (D3) est présente majoritairement dans le cerveau où elle convertit généralement la T3 en T2 (Bernal, 2009; Carr and Patiño, 2011; Norris, 2007).

Les paramètres cinétiques des HT tels que les taux d'excrétion, de dégradation ou encore le ratio T3/T4 varient en fonction de nombreux facteurs, physiologiques (*e.g.* stade de vie, alimentation), abiotiques (*e.g.* pH, température, salinité...) ou encore de stress (Eales and Brown, 1993).

b) Transport, mécanismes d'action et récepteurs

La majorité des HT libérées dans le sang va se lier à des protéines de transport. Il existe un nombre important de protéines de transport chez les vertébrés telles que la TBG (thyroxine-binding globulin), la transthyrétine (TTR), l'albumine et des lipoprotéines (Power *et al.*, 2000). Les HT circulantes sont hydrophobes et se lient donc de façon non covalente et réversible aux protéines de transport spécifiques ou non (Criqui, 2006). Cette nature lipophile contribue au fait qu'il y ait de très faibles concentrations plasmatiques de T3 et de T4 libres chez les vertébrés. Ainsi, la part d'hormones thyroïdiennes libres dans le plasma des vertébrés peut être inférieure, pour la T3, à 0,4% de la concentration en T3 totale et pour la T4, inférieure à 0,03% de la T4 (Kawakami *et al.*, 2006a). Chez l'Homme, 75% de la T4 est liée à la TBG alors que la TTR et l'albumine représentent respectivement 15-20% et 5-10% des liaisons avec la T4 (Schussler, 2000). La fraction des HT libres est généralement faible et estimée à seulement 0,02% (Schussler, 2000). Chez les reptiles, poissons et les amphibiens, l'albumine serait la principale protéine de transport des HT en particulier de la T4 (Richardson *et al.*, 1994) alors que la TTR serait la principale protéine de transport de la T3 (Chang *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002). Ces protéines vont acheminer les HT vers les cellules cibles. Seule la fraction libre des HT est susceptible de pénétrer dans les cellules et est donc considérée comme active (Criqui, 2006).

Les HT vont alors traverser les membranes des cellules des tissus cibles par diffusion simple et vont agir à différents niveaux, soit directement, soit indirectement en modifiant la réceptivité des tissus cibles à d'autres hormones, à des stimulations nerveuses voire même à des stimuli environnementaux comme la lumière (Norris, 2007). Ces actions sont possibles au sein de la cellule par la fixation des HT sur des récepteurs nucléaires spécifiques, les récepteurs thyroïdiens (TR). Les noyaux des cellules de nombreux tissus présentent ce type de récepteurs montrant une affinité 10 fois supérieure pour la T3 par rapport à la T4. Le complexe HT-récepteur fonctionne comme un facteur de transcription régulant l'expression génique et la synthèse de protéines spécifiques (Norris, 2007). Chez les mammifères comme chez les poissons, les TR sont liés à l'ADN et partagent une structure de domaines similaire comportant un domaine central de liaison à l'ADN, un domaine de liaison au ligand (LBD) qui correspond au site de fixation des HT, un domaine charnière caractérisé par une forte variabilité, un domaine C-terminal et un domaine N-terminal (site de liaison aux co-facteurs de la transcription) (Nelson and Habibi, 2009). Chez le mammifère, une HT se fixe au TR, le complexe formé devient actif et induit alors la transcription des gènes spécifiques (Lee and

Yen, 1999). Au contraire, lorsqu'aucune HT n'est fixée, le TR va agir en réprimant la transcription génétique en association avec une protéine, le co-répresseur à laquelle il se lie pour former un complexe co-répresseur (Nelson and Habibi, 2009). Deux types de récepteurs existent chez les vertébrés, les TR α et TR β , chacun ayant des sous-types différents selon les espèces (Harvey and Williams, 2002). Ainsi chez les mammifères cinq sous-types ont été identifiés TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2 et TR β 3 (Kawakami *et al.*, 2006b). Chez de nombreuses espèces de poissons, ces mêmes sous-types ont également été identifiés révélant une conservation relativement importante chez les vertébrés (Nelson and Habibi, 2009). Malgré cette conservation des TR, le rôle fonctionnel de ces récepteurs est beaucoup moins bien connu pour les poissons que pour les mammifères.

La T3 peut également influencer sur le métabolisme cellulaire. Elle agit au niveau des membranes cytoplasmiques en potentialisant des récepteurs adrénergiques, des pompes ioniques ou en facilitant le passage de substrats énergétiques (Norris, 2007).

c) Homéostasie et régulation du système thyroïdien

Chez les vertébrés, le fonctionnement du système thyroïdien implique de nombreuses étapes interdépendantes et séquentielles, de la synthèse de la TG et/ou de la capture d'iode jusqu'à la modulation de l'expression génique par les hormones thyroïdiennes lorsqu'elles se fixent aux TR. Toutes ces étapes nécessitent une coordination du système thyroïdien pour assurer un fonctionnement optimal ainsi qu'un contrôle homéostatique à chaque étape (Fliers *et al.*, 2006; Marieb, 2005). Cette régulation est assurée par l'axe thyroïdienne (HPT) (Figure 2) (Bergman *et al.*, 2013; Fliers *et al.*, 2006; Marieb, 2005; Norris, 2007).

La stimulation notamment hormonale de fibres neurosécrétoires de l'hypothalamus conduit à la libération d'un peptide, la thyroïdolibérine (TRH pour « thyrotropin-releasing hormone ») par l'hypothalamus. La TRH va alors agir directement sur des récepteurs situés dans l'adénohypophyse qui correspond au lobe antérieur de l'hypophyse (anté-hypophyse) et provoquer la libération de la TSH par les cellules thyroïdiques de l'adénohypophyse (Marieb, 2005; Norris, 2007). Les récepteurs de la TRH présentent une structure similaire chez les mammifères comme chez les poissons (Harder *et al.*, 2001). La TSH libérée contrôle non seulement le processus de l'hormono-synthèse mais constitue également un facteur de croissance pour la glande thyroïde (Field, 1968). La TSH des vertébrés est une molécule composée de plusieurs sous-unités. Elle comporte une sous-unité β spécifique (TSH β) et une sous-unité α formée d'une glycoprotéine (GSU α) qui est partagée avec d'autres hormones

gonadotropes (*e.g.* les hormones lutéinisantes et les folliculo-stimulantes) (MacKenzie *et al.*, 2009). Une fois libérée dans la circulation sanguine, la TSH va se lier aux récepteurs (TSHR) des cellules folliculaires et activer la synthèse des HT (Marieb, 2005). Le système stimulé, des changements histologiques des follicules thyroïdiens sont généralement observés tels qu'une augmentation de la taille des thyrocytes associée à une augmentation de la taille de leur noyau ou encore une diminution de la densité du colloïde.

L'homéostasie thyroïdienne est maintenue par un rétrocontrôle négatif effectué par la fraction libre des HT (T4 et T3). L'axe thyroïdienne va répondre à l'augmentation ou à la diminution des taux plasmatiques d'HT libre par une diminution ou une augmentation compensatoire respective de son activité afin de ramener ces taux aux niveaux de base (Fliers *et al.*, 2006; Marieb, 2005; Norris, 2007). Ce rétrocontrôle peut se faire à différents niveaux, soit sur l'hypothalamus soit sur l'hypophyse (Figure 2).

d) Rôles du système thyroïdien

Le rôle du système thyroïdien au sein de l'organisme a été très étudié que ce soit chez les mammifères, les amphibiens et les poissons (Ahmed *et al.*, 2008; Ariachery, 2013; Bernal, 2009; Bernal and Nunez, 1995; Blanton and Specker, 2007; Carr and Patiño, 2011; Chan and Kilby, 2000; Fliers *et al.*, 2014; Power *et al.*, 2001; Tata, 2006). Il joue un rôle important notamment dans la croissance, le développement, la reproduction et le métabolisme des organismes (Norris, 2007). Ainsi les HT vont agir sur de nombreux processus ou systèmes de l'organisme. Quelques exemples d'actions peuvent être cités : au niveau du système digestif, leurs effets vont être de favoriser le tonus gastro-intestinal et la sécrétion des sucs digestifs. Les HT vont favoriser le développement des muscles et du cœur ainsi que leurs bons fonctionnements. Elles vont également permettre la croissance mais aussi la maturation du squelette. Elles vont participer au métabolisme des lipides, protéines et glucides mais aussi au métabolisme basal (accélération et stimulation de la consommation d'oxygène) et à la régulation de la température de l'organisme (Marieb, 2005; Norris, 2007).

Plus spécifiquement, les HT interviennent dans la différenciation terminale des cellules nerveuses, sexuelles, musculaires et osseuses lors du développement embryonnaire et post-embryonnaire. Ce rôle primordial des HT dans la formation et le fonctionnement du système nerveux n'est plus à démontrer aujourd'hui (Ahmed *et al.*, 2008; Bernal, 2009; Bernal and Nunez, 1995; Chan and Kilby, 2000; Haddow *et al.*, 1999; Howdeshell, 2002; Klein *et al.*, 2001; Koibuchi and Chin, 2000; LaFranchi, 2006; Morreale de Escobar *et al.*, 2004a;

Morreale de Escobar *et al.*, 2004b; Portefield and Hendrich, 1993; Smith *et al.*, 2002). Durant les stades de développement et adulte des organismes, les HT exercent une forte influence sur différentes zones du cerveau (*e.g.* hippocampe, aire corticale, cerveau antérieur basal, cérébellum). Il existe une forte affinité entre la T3 et le système nerveux central (SNC) non seulement pour les cellules neuronales mais également chez les astrocytes ou les cellules gliales. Des interactions importantes existent également entre les HT et les fonctions cholinergiques. Un déficit en HT lors des phases pré- et néonatales conduit à un panel de troubles irréversibles du SNC, lié notamment à des effets délétères sur la myélinisation, la migration cellulaire, la connexion synaptique ou encore sur les niveaux de neurotransmetteurs dans le cerveau. Selon le degré de sévérité, il peut entraîner des dysfonctionnements du cortex cérébral, un crétinisme, ou encore des anomalies du développement cochléaire et du cortex visuel. Chez l'Homme adultes, une altération de l'homéostasie thyroïdienne est associée à des anomalies neurologiques et comportementales, et notamment des psychoses dépressives. L'hypothyroïdisme entraîne des problèmes de mémorisation, des hallucinations, de la confusion, de la démence et des comportements psychotiques. A l'inverse, l'hyperactivité, l'irritabilité, la nervosité, les délires, la paranoïa, la stupeur et le coma font partie des symptômes de l'hyperthyroïdie. Un lien de causalité entre maladie d'Alzheimer et dysfonctionnement thyroïdien a également été rapporté par certains auteurs (Breteler *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2002).

Chez d'autres espèces, notamment les poissons et les amphibiens, les HT jouent également un rôle majeur dans la métamorphose des larves (Blanton and Specker, 2007; Power *et al.*, 2001; Tata, 2006). En association avec d'autres hormones comme les corticostéroïdes, elles interviennent notamment dans la smoltification des saumons et l'argenture des anguilles (*i.e.* modifications sur le plan histologique, cytologique, physiologique, biochimique, hormonal et comportemental permettant la migration de l'eau douce vers l'eau de mer) (Aroua *et al.*, 2005; Edeline *et al.*, 2004; McCormick *et al.*, 2003) ou encore la métamorphose des poissons plats (*i.e.* passage d'une symétrie bilatérale des larves pélagiques à des juvéniles benthiques asymétriques) (Inui *et al.*, 1995; Power *et al.*, 2001).

Enfin chez les espèces migratrices, leur importance dans le contrôle des processus métaboliques énergétiques spécifiques à la migration est reconnue, que ce soit pour les oiseaux ou les poissons (Edeline *et al.*, 2004; Norris, 2007).

I.2. Les perturbateurs thyroïdiens

I.2.1. Les perturbateurs endocriniens (PE) : généralités

Comme présenté précédemment (cf. I.1.1), le système endocrinien participe à de nombreux processus physiologiques tels que la croissance, le métabolisme, la reproduction ou la digestion (Norris, 2007). L'action de composés exogènes perturbateurs du système endocrinien peut donc entraîner des dysfonctionnements ou des modifications physiologiques importants et donc avoir un rôle défavorable pour l'organisme exposé. Ces substances sont qualifiées de « perturbateurs endocriniens ». Il existe de nombreuses définitions du terme PE. Celle de Kavlock *et al.* (1996) figure parmi les premières à avoir été formulée. Ils définissent un PE comme étant « un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la sécrétion, le transport, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones naturelles dans le corps qui sont responsables de l'entretien ou de l'homéostasie, de la reproduction, du développement et/ou du comportement ». Considérée comme trop ouverte pour les opérations réglementaires, l'Union Européenne a défini un perturbateur endocrinien comme « une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et qui provoque par conséquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, de sa descendance ou de ses (sous-)populations ». La définition proposée en 2002 par l'OMS reste cependant la plus communément admise : « un perturbateur endocrinien potentiel est une substance ou un mélange exogène, possédant des propriétés susceptibles d'induire une perturbation endocrinienne dans un organisme intact, chez ses descendants ou au sein de (sous-)populations. Cette catégorie est divisée en deux sous-catégories : la catégorie 2a pour les perturbateurs endocriniens suspectés et la catégorie 2b pour les perturbateurs endocriniens pour les substances possédant des indications de propriétés de perturbation endocrinienne. ». Il s'agit donc de substances chimiques d'origine naturelle ou artificielle pouvant interférer avec le fonctionnement des glandes endocrines. Cette action peut se réaliser par l'intermédiaire de différentes voies : 1) le PE peut mimer l'action d'une hormone naturelle et entraîner ainsi la réponse due à cette hormone, 2) la substance chimique peut empêcher une hormone de se fixer à son récepteur et ainsi empêcher la transmission du signal hormonal, 3) la substance peut perturber la production ou la régulation des hormones ou de leurs récepteurs. (<https://www.anses.fr/fr/content/perturbateurs-endocriniens-1>).

Ainsi les PE peuvent agir sur les principaux axes qui composent le système endocrinien (cf. I.1.1) notamment sur l'axe de contrôle de la fonction thyroïdienne et donc en perturber son fonctionnement.

I.2.2. Les perturbateurs thyroïdiens

Crofton *et al.* (2005) ont défini les perturbateurs thyroïdiens (PT) comme des composés chimiques xénobiotiques qui modifient la structure ou la fonction de la glande thyroïde, altèrent les enzymes de régulations impliquées dans l'homéostasie des hormones thyroïdiennes, ou modifient les concentrations en hormones thyroïdiennes tissulaires ou circulantes.

Les PT regroupent un large éventail de substances chimiques. Une grande partie des perturbateurs thyroïdiens fait partie des polluants organiques persistants (POP) publiés dans la Convention de Stockholm (2004), et dont la liste a été réactualisée régulièrement (UNEP 2009, 2009; UNEP 2011, 2011). De par leurs propriétés lipophiles, ces molécules sont très persistantes à la fois dans les organismes vivants et dans l'environnement, et possèdent cette propension à s'accumuler dans les sols, les sédiments et les tissus animaux et végétaux, contaminant ainsi potentiellement l'ensemble de la chaîne alimentaire.

Dans le cadre de cette thèse, un état de l'art concernant les perturbations de la fonction thyroïdienne par des composés chimiques a fait l'objet d'une section au sein d'un chapitre (Chapitre 8 : Impairments of endocrine Functions : Causes and Consequences) publié dans le livre « Ecological Biomarkers » édité par Claude Amiard-Triquet, Jean-Claude Amiard and Philip S. Rainbow (Amiard-Triquet *et al.*, 2012). Cette section et sa bibliographie vous sont présentées ci-après.

Jean-Claude Amiard, Arnaud Chaumot, Mickael Couderc, Jeanne Garric, Olivier Geffard, and Benoit Xuereb (2012). Chapter 8 : Impairments of endocrine Functions : Causes and Consequences dans Ecological Biomarkers, Eds Claude Amiard-Triquet, Jean-Claude Amiard and Philip S. Rainbow

8.4 Thyroid endocrine disruptors

Author : *Mickaël Couderc. Université de Nantes. Mer, Molécules, Santé, EA2160.*

Several classes of chemicals are now suspected or even proved to be disruptive to thyroid function at several levels. However, evidence for thyroid disrupting activity is often not clear because the thyroid is a relatively robust gland in adults. It is able to compensate moderate or mild disruption by a thyroid hyperplasia known to as goitre. Thus the impact of thyroid disruption during the development of individuals is different from that in an adult. Indeed, thyroid hormones have an essential role in fetal development. Prenatal exposure to thyroid disruptors will have consequences that can be very damaging, particularly in the developing brain.

The regulation of thyroid function is a finely tuned negative feed-back mechanism of circulating thyroid hormones at the hypothalamic and pituitary levels, that maintain relatively stable serum levels of thyroid hormones with each individual having it set at a specific point (Feldt-Rasmussen et al. 1980).

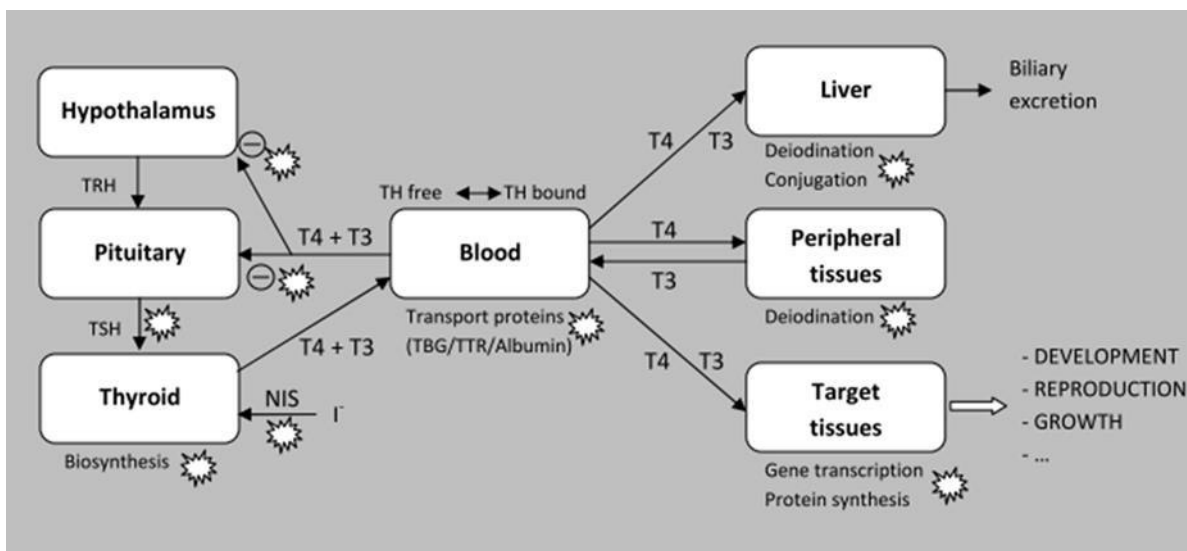



Figure 8.3.

Basic elements of thyroid function. TRH: Thyrotropin-Releasing Hormone; TSH: Thyroid Stimulating Hormone; TH: Thyroid Hormone; NIS: Sodium Iodide Symporter; T3: Triiodothyronine; T4: Thyroxine; TBG: Thyroxine-Binding Globulin ; TTR: Transthyretin;  Main thyroid disruption endpoints.

The mechanisms involved in thyroid homeostasis are numerous and complex, and environmental chemicals may interfere at all levels (Figure 8.3). Thyroid function is affected by binding proteins, peripheral metabolism, alterations in the thyroid gland and clearance (Boas et al. 2011). In a review, Brown et al. (2004) describe the thyroid cascade and the effects of contaminants on the teleost fish thyroid.

Unlike mammals and amphibians that have an organized pair of thyroid glands, the majority of teleost fishes have multiple thyroid follicles, individually or in clusters, scattered amongst the afferent branchial arterioles in the ventral region of the pharynx. Nevertheless, the basic structure and function of the thyroid follicle is fairly conserved across vertebrates (Paris et al. 2008a). The thyroid follicles are formed by a basement membrane surrounding epithelial cells and enclose a lumen. Iodine is obtained by follicular cells from the blood via a Na^+ / I^- symport (NIS). It is then transported to the epithelial surface where it will form thyroxine (T4 or 3,5,3,5-tetraiodo-L-thyronine) by incorporation of I^- into thyroglobulin. The resulting protein complex is stored in the follicle. Activation of the neuroendocrine hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis induces the production of thyroid hormones (Eales 2006; Blanton and Specker 2007; Zoeller et al. 2007). More precisely, under hypothalamic control, the pituitary secretes thyroid-stimulating hormone (TSH) which proceeds to the thyroid gland to activate synthesis of thyroid hormones.

In mammals (De Vito et al. 1999; Ahmed et al. 2008), in amphibians (Fort et al. 2007) and in teleosts (Brown et al. 2004; Blanton and Specker 2007), T4 is the main product released by thyroid follicles into the circulation. It is then bound to thyroid hormone-binding proteins (transport proteins) and carried to target tissues. In peripheral tissues, T4 is converted into triiodothyronine (T3 or 3,5,3-triiodo-L-thyronine) by action of a complex of deiodinase enzymes which removes one of the two outer ring iodines (Blanton and Specker 2007; Fort et al. 2007; Eales 2006; Zoeller et al. 2007). T3 has higher affinity than T4 to the thyroid receptors (TR α or TR β), it is the most active hormone and it is responsible for most biological effects. Thyroxine and T3 are inactivated by the loss of an inner ring iodine catalyzed by another group of deiodinase enzymes and eliminated by biliary excretion. The thyroid condition is usually evaluated by measuring T4 and T3, and moreover it is these two hormones that are generally associated with the term thyroid hormone (TH). THs are evolutionarily conserved molecules present in all extant vertebrates and some invertebrates (Heyland et al. 2005). The action mechanisms of THs through nuclear receptors that influence gene expression is also strongly conserved across the vertebrate taxa (Bertrand et al. 2004; Buchholz et al. 2006; Whitfield et al. 1999). In addition, because of this highly conserved nature of TH chemistry, synthesis, signaling, and regulation, environmental factors that affect thyroid function or TH signaling in one species may well affect thyroid function or TH signaling in others including humans (Miller et al. 2009).

Molecular signaling pathways regulated by THs affect development, energy balance, and metabolism for all taxonomic groups of vertebrates. It is understood that THs regulate, at least in part, the classical larva-to-juvenile metamorphosis of teleosts and amphibians (Paris et al. 2008a) and the embryo-to-larva transformation of teleosts (Liu et al. 2002). Concerning amphibian metamorphosis, many of the morphological changes are TH-dependent, among them the resorption of the tail, development of limbs, and restructuring of the head (Shi 2000; Buchholz et al. 2005; Carr and Norris 2006). Among teleosts, THs are essential for early development, particularly for larval-juvenile transitions and induction of metamorphosis (craniofacial rearrangement and loss of bilateral symmetry) in flatfish (Yamano et al. 1994; Inui et al. 1995; Power et al. 2001; Yamano, 2005; Schreiber et al. 2006; Shiao and Wang, 2006; Blanton and Specker, 2007; Klaren et al. 2008). Many studies have correlated the necessity of THs for gonadal development and reproduction in most teleosts (Cyr and Eales 1996; Weber et al. 1992; Van der Ven et al. 2006; Mukhi and Patiño 2007). In mammals (Zoeller and Rovet 2004), THs are also essential for development. The crucial role of THs in

brain development for mammalian and non-mammalian species have been further described (Ahmed et al. 2008; Koibuchi 2008; Leonard 2008; Ahmed et al. 2010; Sigrun and Heike 2010).

Given the fundamental role of TH for physiologic function and normal development in all vertebrates and some invertebrates, the identification of environmental factors that may adversely affect thyroid function and/or TH signaling is very important as is an evaluation of their ability to adversely affect ecosystems. Main endpoints used for the assessment of HPT disruption in most mammals, teleosts and amphibians are: Central effects-thyroid histopathology; Plasma binding proteins and plasma thyroid hormone levels; TH deiodination and metabolism; Target tissue and receptor level endpoints; Whole animal endpoints (Bruckers-Davis 1998; Pearce et Braverman 2009; Carr and Patiño 2010).

Some EDCs have a structure relatively similar to that of thyroxine (T4) and Triiodothyronine (T3). Thus, these compounds are mainly characterized by their ability to have direct actions on thyroid hormone receptors, inhibit thyroidal iodine uptake, inhibit thyroid hormone synthesis (thyroperoxidase activity), alter deiodinase functions in peripheral tissues, decrease T4 half-life by activating hepatic enzymes, and displace thyroid hormone from thyroid hormone-binding proteins (transport protein). Among these compounds, PCBs, brominated flame retardants (PBDEs and TBBPA in particular), perchlorates or alkylphenols are frequently found in the environment.

In rodents, PCB exposure is associated with a decrease T4 level. In a study on wild fish in San Francisco Bay, Brar et al. (2010) have shown that T3 and T3/T4 ratio are correlated with PCB exposures. Biological effects of PBDEs in animals seem to be similar to those of PCBs. In rodents, amphibians (*Xenopus laevis*), and fish (*Pimephales promelas*) decreased T4 levels have been reported (Kudo et al. 2006; Kuriyama et al. 2007; Lema et al. 2008). It has been reported that PBDEs during prenatal exposure of rats cause long term changes in motor activity (hyperactivity), and disrupt performance in learning and memory tests (Kuriyama et al. 2005). A recent study (Park et al. 2011) on tetrabromoethylcyclohexane (TBECH), a potential substitute for PBDEs hexabromocyclodecane (HBCD) has shown a significant reduction in total plasma thyroxin and a significant increase in mean thyroid epithelial cell height in the juvenile brown trout *Salmo trutta*.

The brominated flame retardant TBBPA has biological effects observed across many species (Darnerud 2003; Saegusa et al. 2009). In amphibians, marked molecular effects were observed *in vivo* on TH signalling (Fini et al. 2007). TBBPA could affect TH binding to thyroid receptors and the transport of TH by the thyroid hormone-binding protein, transthyretin (Kitamura et al. 2005). In rodents, TBBPA induces neurobehavioural effects (Nakajima et al. 2009). Long-term exposure of European flounder (*Platichthys flesus*) to TBBPA increased levels of the thyroid hormone thyroxin (T₄) in correlation with internal concentrations of the test compound. The authors indicated a possibly competition of TBBPA for plasma protein binding. Triiodothyronin (T₃) levels were not affected and histology showed no signs of altered thyroid gland activity (Kuiper et al. 2007).

Perchlorates are chemicals with well known antithyroidal effects (Boas et al. 2011). They inhibit thyroidal iodine uptake in all vertebrates, because they have a greater affinity for NIS than iodine and the structure of the symporter is largely conserved in all vertebrates (Carr and Patiño 2010). In teleosts and amphibians, it has been widely demonstrated that perchlorates decrease T₄ concentration in blood and tissue, cause thyroid histopathological alterations and induce trouble in growth and metamorphosis failure (Carr and Patiño 2010). In fish, more precisely zebrafish, perchlorate induced hypothyroidism, which causes a halt to spawning (Mukhi and Patiño 2007). Another class of chemicals, nonylphenols, induced a significant decrease of thyroxin levels in fish, whereas no effect on triiodothyronine concentrations was detected, thus inhibiting the thyroid hormone balance (Zaccaroni et al. 2009). No histopathological changes were detected in the thyroid. Other organic chemicals and also metals have been described or suspected to cause thyroid disruption (Brucker-Davis 1998; Brown et al. 2004; Miller et al. 2009; Pearce and Braverman 2009; Carr and Patiño 2010)

Thyroid disruption properties can be detected with *in vitro* cellular tests. Jugan et al. (2007) have developed a cellular assay (PC-DR-LUC) that can be used to identify compounds that have thyromimetic or TH-antagonistic effects on thyroid receptors. Kitamura et al. (2005) showed a thyromimetic effect of TBBPA on *in vitro* cellular test using a GH3 pituitary cell line. *In vitro* bioassay, indicate that some of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives have agonist or potentiation activity with thyroid receptors and have a strong TTR-binding activity (Bekki et al. 2009). Fini et al. (2007) have developed an *in vivo* test for the detection of thyroid receptor agonists and for the determination of effects of TH production inhibitors, including inhibitors of TH synthesis, antagonists acting at the receptor and deiodinase inhibitors (Fini et al. 2007).

Real-life exposure of humans and wildlife to a wide spectrum of synthetic chemicals makes it difficult to prove the causative thyroid effect of one single agent. Therefore, it is more prudent to talk of association rather than causation, and the role of potential cocontaminants should always be considered (Brucker-Davis 1998).

References

- Ahmed, O.M. et al. 2010. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *Int. J. Devl. Neuroscience*. 28:437-454.
- Bekki, K. et al. 2009. Evaluation of toxic activities of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives using in vitro bioassays. *Journal of Health Science*. 55:601–610.
- Bertrand, S. et al. 2004. Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. *Mol. Biol. Evol.* 21:1923–1937.
- Black, J.J. et al. 1974. Thyroid enlargement in Lake Erie Coho Salmon. *J. Natl. Cancer Inst.* , 53:725-729.
- Blanton, M.L., Specker, J.L. 2007. The hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37:97-115.
- Boas, M. et al. 2011. Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi:10.1016/j.mce.2011.09.005.
- Brar, N.K. et al. 2010. Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures. *Aquat. Toxicol.* 96:203-215.
- Brouwer, A. 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol. Ind. Health*. 14:59-84.
- Brown, S.B. et al. 2004. Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environ. Toxicol. Chem.* 23:1680-1701.
- Brucker-Davis, F. 1998. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid*. 8:827-856.
- Buchholz, D.R. et al. 2005. Gene-specific changes in promoter occupancy by thyroid hormone receptor during frog metamorphosis. Implications for developmental gene regulation. *J. Biol. Chem.* 280:41222–41228.
- Buchholz, D.R. et al. 2006. Molecular and developmental analyses of thyroid hormone receptor function in *Xenopus laevis*, the African clawed frog. *Gen Comp Endocrinol.* 145:1-19.
- Carr, J.A., Norris, D.O., 2006. The thyroid gland. In: Norris, D.O., Carr, J.A. eds. *Endocrine Disruption: Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans*. Oxford University Press, New York, pp. 87–110.

- Carr, J.A., Patiño, R. 2010. The hypothalamus–pituitary–thyroid axis in teleosts and amphibians: Endocrine disruption and its consequences to natural populations. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Cyr, D.G., Eales, J.G. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.* 6:165-200.
- DeVito, M. et al. 1999. Screening Methods for Thyroid Hormone Disruptors. *Environ. Health Perspect.* 107:407-415.
- Darnerud, P.O., 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ. Int.* 29:841-853.
- Di Paola, M. et al. 2010. Callosal atrophy in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: different effects in different stages. *NeuroImage.* 49:141-149.
- Eales, J.G. 2006. Modes of action and physiological effects of thyroid hormones in fish. In: Reinecke, M., Zaccane, G., Kapoor, B.G., eds. *Fish Endocrinology, vol. 2.* Science Publishers, Plymouth, UK, 767-808.
- Feldt-Rasmussen, U. et al. 1980. Long-term variability in serum thyroglobulin and thyroid related hormones in healthy subjects. *Acta Endocrinol.* , 95:328-334.
- Fernie, KJ. et al. 2005. Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): changes in thyroid, vitamin A, glutathione homeostasis, and oxidative stress in American kestrels (*Falco sparverius*). *Toxicol Sci.* 8:375-83.
- Fini, J.B. et al. 2007. An In Vivo Multiwell-Based Fluorescent Screen for Monitoring Vertebrate Thyroid Hormone Disruption. *Environmental Science & Technology.* 41:5908-5914.
- Fort, D.J. et al. 2007. The hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) axis in frogs and its role in frog development and reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 37:117-161.
- Goldey, E.S. et al. 1995. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 135:77-88.
- Heyland, A. et al. 2005. Cross-kingdom hormonal signaling: an insight from thyroid hormone functions in marine larvae. *J. Exp. Biol.* 208:4355-4361.
- Inui, Y. et al. 1995. The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture.* 135:87-98.
- Jugan, M.L. et al. 2007. A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor. *Toxicol In Vitro.* 21:1197-205.
- Kitamura, S. et al. 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicological Sciences* 84:249-259.

- Klaren, P.H.M. et al. 2008. The thyroid gland and thyroid hormones in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during early development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155:686-694.
- Koibuchi, N. 2008. The role of thyroid hormone on cerebellar development. *Cerebellum.*7:530-533.
- Kudo, Y. et al. 2006. In vitro and in vivo analysis of the thyroid system-disrupting activities of brominated phenolic and phenol compounds in *Xenopus laevis*. *Toxicol Sci.* 92:87-95.
- Kuiper, R.V. et al. 2007. Long-term exposure of European flounder (*Platichthys flesus*) to the flame-retardants tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 67:349-360
- Kuriyama SN, et al. 2005. Developmental exposure to low-dose PBDE-99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environ Health Perspect.* 113:149-54.
- Kuriyama, S.N. et al. 2007. Developmental exposure to low-dose PBDE-99: tissue distribution and thyroid hormone levels. *Toxicology.* 242:80-90.
- Lema, S.C. et al. 2008. Dietary exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain. *Environ Health Perspect.* 116:1694-9.
- Leonard, J.L. 2008. Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development. *Steroids* 73:1008-1012.
- Liu, Y.W. et al. 2002. Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. *Differentiation.* 70:36-45.
- McNabb, F.M. et al. 2006. Avian thyroid development and adaptive plasticity. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147:93-101.
- Miller, M.D. et al. 2009. Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environmental Health Perspectives.* 117:1033-1041.
- Moccia, R.D. et al. 1986. A quantitative assessment of thyroid histopathology of herring gulls (*Larus argentus*) from the Great Lakes and a hypothesis on the causal role of environmental contaminants. *J. Wildlife. Dis.* , 22:60-70.
- Mukhi, S., Patiño, R. 2007. Effects of prolonged exposure to perchlorate on thyroid and reproductive function in zebrafish. *Toxicol. Sci.* 96 :246-254.
- Park, B.J. et al. 2011. Thyroid axis disruption in juvenile brown trout (*Salmo trutta*) exposed to the flame retardant β -Tetrabromoethylcyclohexane (β -TBECH) via the diet. *Environ. Sci. Technol.* 45:7923-7927.
- Paris, M. et al. 2008. The history of a developmental stage: metamorphosis in chordates. *Genesis,* 46:657-672.

- Pearce, E. N., Braverman, L. E. 2009. Environmental pollutants and the thyroid. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 23:801-813.
- Power, D.M. et al. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 130:447-459.
- Schreiber, A.M. et al. 2006. Asymmetric craniofacial remodeling and lateralized behavior in larval flatfish. *J. Exp. Biol.* 209:610-621.
- Saegusa, Y. et al. 2009. Developmental toxicity of brominated flame retardants, tetrabromobisphenol A and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reprod. Toxicol.* 28:456-467.
- Shi, Y.B. 2000. Amphibian Metamorphosis: From Morphology to Molecular Biology. *Wiley-Liss*, New York, NY.
- Shiao, J.-C., Wang, P.-P. 2006. Thyroid hormones are necessary for the metamorphosis of tarpon, *Megalops cyprinoides leptocephalii*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 331:121-132.
- Sigrun, H., Heike, H. 2010. Review: thyroid hormone action during brain development: more questions than answers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 315:19-26.
- Van der Ven, L.T. et al. 2006. Effects of the antithyroid agent propylthiouracil in a partial life cycle assay with zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 40 :74-81.
- Weber, G.M. et al. 1992. Patterns of thyroxine and triiodothyronine in serum and follicle bound oocytes of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, during oogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85:392-404.
- Whitfield, G.K. et al. 1999. Steroid hormone receptors: evolution, ligands, and molecular basis of biologic function. *J. Cell. Biochem.* 32-33:110-122.
- Yamano, K. et al. 1994. Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Dev. Genet.* 15:378-382.
- Yamano, K. 2005. The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. *JARQ* 39:161-168.
- Zaccaroni, A. et al. 2009. Thyroid hormones as a potential early biomarker of exposure to 4-nonylphenol in adult male shubunkins (*Carassius auratus*). *Science of the Total Environment.* 407:3301-3306.
- Zoeller R.T., Rovet J. 2004. Timing of thyroid hormone action in the developing brain: clinical observations and experimental findings. *J. Neuroendocrinol.* 16:809-818.
- Zoeller, R.T. et al. 2007. General background on the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Crit. Rev. Toxicol.* 37:11-53.

I.2.3. Des outils pour l'évaluation des perturbations de la fonction thyroïdienne

Comme présenté dans la section précédente, le système thyroïdien, de par sa complexité de fonctionnement, dispose de multiples points potentiels de perturbation dans son mécanisme d'action. Il existe donc presque autant d'outils pour pouvoir caractériser des perturbations potentiellement induites par des composés chimiques. Leur mise en œuvre est plus ou moins complexe et leur pertinence plus ou moins avérée. Généralement, les concentrations en HT plasmatiques ou sériques chez l'animal ou l'Homme exposés à des PT sont mesurées pour évaluer les modulations du système thyroïdien induites par l'exposition (Bergman *et al.*, 2013). Néanmoins, ces concentrations peuvent être variables (cf. I.1.2.2.a)), aussi il convient de prendre des précautions lors de l'interprétation de ces résultats (Bergman *et al.*, 2013). Ainsi, il a été observé que, dans certains cas, de petites quantités de PT pouvaient altérer l'homéostasie sans toutefois causer de modification anormale des concentrations en HT (Boas *et al.*, 2006). L'observation de changements histologiques de la thyroïde (*e.g.* poids de la glande, taille du colloïde ou nombre de follicules) figure comme un bon marqueur *in vivo* (Janošek *et al.*, 2006). L'utilisation d'outils exploratoires non invasifs (techniques d'imagerie médicale) a également permis des avancées dans l'examen de la glande thyroïde. Chez les poissons, la thyroïde étant diffuse, l'observation histologique est plus complexe que chez les mammifères. Aussi, les mesures de concentrations en HT sont encore principalement utilisées pour mettre en évidence des perturbations du système thyroïdien lors d'études expérimentales et dans le milieu naturel (Brar *et al.*, 2010; Carr and Patiño, 2011; Simmons *et al.*, 2014).

Chez les mammifères, afin d'évaluer la toxicité *in vivo* des PT, plusieurs tests ont été proposés tels que l'âge d'ouverture des yeux et d'apparition de l'audition, le retard de croissance ou encore les anomalies du développement du cerveau (DeVito *et al.*, 1999). Les animaux notamment les rats sont couramment retenus comme modèles pour déterminer de potentiels effets de PT chez l'Homme (Bergman *et al.*, 2013). Par exemple, les rats ont beaucoup été utilisés pour étudier les effets des polybromodiphényles éthers (PBDE) qui ont une structure chimique proche des HT. La plupart des résultats obtenus ont ainsi montré une corrélation négative entre les concentrations d'expositions aux PBDE et les concentrations de T4 circulantes (Darnerud *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2002). Les poissons et les amphibiens sont également utilisés comme modèles, notamment parce que les HT ont un rôle important dans la métamorphose des larves (Carr and Patiño, 2011; Kloas and Lutz, 2006). Une douzaine d'études ont utilisé des amphibiens, principalement *Xenopus laevis* comme modèle et

développé différents tests pour mettre en évidence des perturbations du système thyroïdien, généralement à partir de composés purs ou mélanges commerciaux, comme le test sur les embryons, le test de liaison du ligand, le test de la queue ou encore la culture d'organe. (De Luze *et al.*, 1993; Fini *et al.*, 2007; Fini *et al.*, 2012; Scholz *et al.*, 2013; Tata, 2006; Turque *et al.*, 2005). Chez les poissons, deux tests expérimentaux utilisant des embryons de poissons zèbres (*Danio rerio*) ont été développés ; l'un d'eux est basé sur la liaison à la protéine de transport TTR, l'autre est un test de dosage de la T4 immunoréactive dans le follicule (Scholz *et al.*, 2013). Les études chez l'Homme, visant à mettre en évidence les effets d'un contaminant sur le fonctionnement du système thyroïdien sont peu nombreuses (Bergman *et al.*, 2013). Aussi, dans ce sens, des outils notamment *in vitro* permettant de caractériser l'action des PT ont été développés (Chen *et al.*, 2014; Ghisari and Bonfeld-Jorgensen, 2009; Janošek *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014). Ils s'intéressent notamment aux perturbations de la liaison des HT aux protéines de transports ou encore aux récepteurs cellulaires comme par exemple le test TTR qui consiste à mesurer le potentiel de liaison, du PT testé, à la TTR par rapport à la T4 (Houtman *et al.*, 2004), ou encore le test TR-CALUX (Bekki *et al.*, 2009) ou le PC-DR-LUC (Jugan *et al.*, 2007). Ces approches permettent de mettre en évidence l'affinité du PT pour les TR par rapport à la T3 et ainsi des effets agonistes ou antagonistes imputables à cette liaison (Ren *et al.*, 2014). Leur mise en œuvre peut varier d'un laboratoire à l'autre mais le principe demeure identique. Ces tests peuvent être utilisés pour caractériser le potentiel de perturbation dans de nombreuses matrices biotiques ou abiotiques telles que l'eau (Li *et al.*, 2014), les effluents de stations d'épurations (Metcalf *et al.*, 2013), les sédiments (Houtman *et al.*, 2004; Montañó *et al.*, 2013) ou le plasma (Simon *et al.*, 2011; Simon *et al.*, 2013). Ils sont également utilisés pour caractériser l'activité d'une substance seule ou de mélanges plus ou moins complexes (Bekki *et al.*, 2009; Jugan *et al.*, 2007; Legler and Brouwer, 2003; Ren *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013).

La génomique est également utilisée lors d'études en laboratoire en particulier chez les rongeurs mais aussi sur la faune sauvage. Les mesures d'expression ou de transcription de gènes figurent parmi les plus utilisées notamment celles des récepteurs thyroïdiens, des désiodases mais aussi d'autres enzymes, protéines ou hormones (TSH et TRH) impliquées dans la synthèse et/ou le métabolisme des HT (Blanco *et al.*, 2013; Gentilcore *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Noyes *et al.*, 2013; Roelens *et al.*, 2005; Szabo *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2013).

I.2.4. En conclusion

- Les hormones thyroïdiennes ont un rôle primordial chez les vertébrés et chez l'Homme dans le développement mais aussi à l'âge adulte.
- La fonction thyroïdienne est relativement bien conservée chez les vertébrés notamment les hormones thyroïdiennes et leurs récepteurs.
- Le fonctionnement complexe du système thyroïdien (« robustesse » et nombreuses voies de rétrocontrôles) rend difficile l'identification des causes et les conséquences de perturbation de son fonctionnement.
- Des composés chimiques peuvent provoquer des perturbations de la fonction thyroïdienne.
- De nombreux composés chimiques peuvent perturber la fonction thyroïdienne sans incidence visible notamment sur les concentrations sériques des hormones thyroïdiennes.
- Les études sur les relations entre exposition aux contaminants et perturbation de la fonction thyroïdienne sur la faune ont connu un essor au cours de ces dix dernières années. La reconnaissance de substances largement étudiées telles que les PCB et les retardateurs de flammes bromés (PBDE) pour leur potentiel de perturbation de la fonction endocrinienne principalement de la reproduction, a conduit la communauté scientifique à s'intéresser à d'autres types de perturbations dont celles impliquant le fonctionnement de la thyroïde.
- Les perturbateurs thyroïdiens peuvent agir à tous les niveaux de l'axe HPT et plus généralement du système thyroïdien : interaction avec le NIS, blocage de l'iodure, interaction avec les protéines de transport, transformation de la T4 en T3 (désiodases), impact sur les récepteurs aux HT, stimulation du métabolisme de la T4, etc.
- Les études sur des animaux mettant en évidence le rôle des perturbateurs endocriniens dans les perturbations de la fonction thyroïdienne laissent penser que celles-ci pourraient également se produire chez l'Homme.

I.3. Des composés organiques persistants à potentiel de perturbation de la fonction thyroïdienne

Dans la liste des polluants organiques présents dans l'environnement et susceptibles d'avoir un impact sur le *biota* et sur l'Homme, nous avons opté pour l'étude ciblée de 6 familles de contaminants perturbateurs potentiels ou avérés de la fonction thyroïdienne. Parmi elles les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényle éthers (PBDE), les substances perfluoroalkylées (PFAS ou PFC), les alkylphénols (AP), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et enfin un phénol, le bisphénol A (BPA).

Les PCB, les PBDE et les PFAS appartiennent aux POP. Ces derniers sont des substances chimiques persistantes dans l'environnement, bioaccumulables tout au long de la chaîne alimentaire et qui posent un risque d'effets indésirables pour la santé de l'Homme et de l'environnement. La Convention de Stockholm sur les POP, signée en 2001 par 151 pays, est entrée en vigueur en 2004 dans le but d'interdire certains produits polluants et d'en réduire les quantités dans l'environnement et chez l'Homme. Elle comportait alors 12 composés prioritaires appartenant à cette classe. En 2009, de nouveaux amendements ont inclus 9 nouveaux POP à la liste existante (UNEP 2009, 2009). Une nouvelle actualisation de la liste a été faite en 2011 avec l'ajout de l'endosulfan et de ses isomères (UNEP 2011, 2011) portant le nombre de POP à 22. Ce groupe de substances chimiques est composé de pesticides tels que le DDT, de composés chimiques industriels tels que les PCB, PBDE et PFAS mais aussi de composés produits non intentionnellement lors de processus industriels (dioxines et furannes).

Les trois autres groupes de contaminants organiques (HAP, AP et BPA) ne sont pour le moment pas listés dans la convention de Stockholm mais font l'objet d'une attention particulière de la part de la communauté scientifique et des pouvoirs publics notamment du fait de leur ubiquité dans l'environnement.

Les PCB, PBDE, PFAS, AP et HAP sont également listés comme substances prioritaires par la Directive Cadre sur l'Eau européenne (DCE ; Directive 2013/39/UE) (European Commission, 2013), laquelle impose aux états membres de respecter des normes de qualité environnementale (EQS) pour ces substances.

Les différentes familles étudiées sont brièvement présentées dans les paragraphes suivants. Eu égard à leur nombre, les 69 contaminants chimiques analysés dans ce travail n'ont pas été présentés individuellement ; une liste est toutefois disponible en Annexe 1.

I.3.1. Les polychlorobiphényles (PCB)

I.3.1.1. Structures et propriétés physico-chimiques

Les polychlorobiphényles (PCB) font référence à une famille de composés organo-chlorés présentant une même structure générique. Les PCB sont des substances synthétiques constituées de deux cycles phényles reliés entre eux par une liaison carbone-carbone (noyau diphenyle) et comportant jusqu'à 5 atomes de chlore par cycle par substitution des atomes d'hydrogènes (Figure 5).

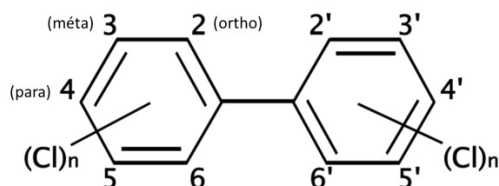


Figure 5. Structure chimique générique des PCB.

Les différentes combinaisons entre le degré de substitution (de 1 à 10) et la position des atomes de chlore (en ortho, méta ou para) permettent d'obtenir 209 congénères. En fonction du nombre et de la position des atomes de chlore une nomenclature a été établie dès les années 80 (Ballschmiter and Zell, 1980). Elle classe les congénères de 1 à 209 en fonction de la numérotation des atomes de carbone substitués par les atomes de chlore (Tableau 1). Différentes nomenclatures existent, leurs principales différences résident dans les numérotations entre les congénères (Mills Iii *et al.*, 2007). La nomenclature de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) est la plus fréquemment utilisée avec le « BZ number » attribué suite à la publication de K. Ballschmiter and M. Zell en 1980 (Ballschmiter and Zell, 1980; Mills Iii *et al.*, 2007; Rigaudy and Klesney, 1979).

Tableau 2. Propriétés Physico-chimiques des 10 groupes de congénères de PCB (adapté d'après Erickson (1997))

Groupe de congénères	Poids moléculaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Pression de vapeur (Pa) à 25°C	Solubilité à 25°C (g/m ³)	Coefficient de partage octanol/eau logKow
Monochlorobiphényle	188,7	25-77,9	285	0,9 - 2,5	1,21 - 5,5	4,3 - 4,6
Dichlorobiphényle	223,1	24,4-149	312	0,008 - 0,6	0,06 - 2	4,9 - 5,3
Trichlorobiphényle	257,5	28,87	337	0,003 - 0,22	0,015 - 0,4	5,5 - 5,9
Tétrachlorobiphényle	292	47-180	360	0,002	0,0043 - 0,01	5,6 - 6,5
Pentachlorobiphényle	326,4	76,5-124	381	0,0023 - 0,051	0,004 - 0,02	6,2 - 6,5
Hexachlorobiphényle	360,9	77-150	400	0,0007 - 0,012	0,0004 - 0,0007	6,7 - 7,3
Heptachlorobiphényle	395,3	122,4-149	417	1,3.10 ⁻⁴	0,000045	6,7 - 7
Octachlorobiphényle	429,8	159-162	432	2,8.10 ⁻⁵	0,0002 - 0,0003	7,1
Nonachlorobiphényle	464,2	182,8-206	445	6,3.10 ⁻⁶	0,00018 - 0,0012	7,2 - 8,16
Décachlorobiphényle	498,7	305,9	456	1,4.10 ⁻⁶	0,000001	8,26

1.3.1.2. Sources et utilisations

Les PCB sont des composés organiques synthétiques produits par chloration progressive du noyau diphenyle par l'action de dichlore (sous pression et à chaud) et en présence d'un catalyseur tel que le chlorure de fer. Seulement une centaine de congénères peut se former durant la synthèse en raison de contraintes physico-chimiques notamment du caractère orienté de la chloration (positions para puis ortho privilégiées), des contraintes stériques mais aussi des contraintes thermodynamiques. Les autres congénères se forment par des réactions d'isomérisation. Les produits commerciaux correspondent à des mélanges complexes de congénères plus ou moins purs. La variation du taux de chlore du mélange permet d'obtenir des propriétés physiques différentes en fonction de l'utilisation prévue. Les mélanges de PCB se présentent sous forme de liquides à faible viscosité voire des résines. Les PCB ont été synthétisés pour la première fois en 1881, puis ont été produits industriellement à partir de 1929 par la société américaine Swann Chemical Company à Anniston dans l'Alabama. En 1935, l'usine a été rachetée par Monsanto Company qui fut un des principaux producteurs de PCB. En fonction du pays d'origine, les noms commerciaux des mélanges techniques varient : Aroclor (Monsanto - Etats-Unis), Pyranol et Pyroclor (Etats-Unis), Clophen et Elaol (Allemagne), Fenchlor (Italie), Sovol (URSS), Pyralène et Phénochlor (France), etc. Pendant les 60 années d'exploitation, la production mondiale de PCB aurait atteint 1,5 million de tonnes dont environ 700 000 produites rien qu'aux Etats Unis (93% par Monsanto). Dès 1975, la France a interdit les PCB en tant qu'additifs et restreint leur utilisation à des systèmes clos. La production a été définitivement arrêtée en 1985 aux Etats-Unis puis en 1987 en France.

La présence de PCB dans l'environnement est uniquement d'origine anthropique. Leur utilisation, dans le milieu industriel, était due notamment à leur grande stabilité et à leurs

propriétés physico-chimiques. A l'origine, les PCB ont été conçus pour trois types d'applications : les systèmes clos, les systèmes clos non contrôlables et les systèmes ouverts non contrôlables (Erickson and Kaley, 2011). Ces trois types d'applications sont aujourd'hui utilisés pour les classer selon leur impact sur l'environnement :

- Les systèmes clos contrôlables : il s'agit de systèmes fermés et contrôlés pour éviter les fuites. La récupération des PCB est donc possible. Dans ces systèmes, les PCB sont utilisés comme fluides diélectriques pour des équipements de grande taille type transformateurs et condensateurs de puissance.
- Les systèmes clos non contrôlables : le système est fermé mais un risque d'écoulement dans l'environnement existe et les PCB y sont difficilement récupérables pour un retraitement. Ces systèmes étaient en général des équipements électriques de petites tailles tels que des condensateurs, des commutateurs, des régulateurs de voltage, des disjoncteurs, des câbles électriques, mais également des fluides caloporteurs et des fluides industriels (huiles hydrauliques, huiles de coupes, huiles de pompes à vide, etc.).
- Les systèmes ouverts non contrôlables : dans ces systèmes, la récupération est impossible car les PCB étaient en contact direct avec l'environnement par le biais d'une utilisation dispersive. Ils étaient utilisés comme additifs stabilisants dans les pesticides, les lubrifiants, les cires, les teintures, etc. et comme ignifugeants dans les plastiques, la peinture, les encres, revêtement de surface, de textiles, de câbles, etc.

1.3.1.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne

L'accident de Yusho en 1968 au Japon a participé à la mise en évidence des propriétés toxiques des PCB. Bien que les congénères possèdent une structure chimique quasi identique, d'un point de vue toxicologique, deux catégories de PCB se distinguent : les PCB-dl (PCB-dioxin like) et les PCB-ndl (PCB-non dioxin like). Les PCB sont qualifiés de dioxine like lorsqu'ils sont non-ortho substitués (PCB 77, 81, 126 et 169) mais aussi mono-ortho substitués *i.e.* avec l'atome de chlore en position ortho (PCB 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 et 189). Ces 12 congénères possèdent une structure quasi plane et peuvent se lier de manière relativement affine avec le récepteur AhR. Cette propriété les rapproche des dioxines (PCDD) et furanes (PCDF) (Kannan *et al.*, 1988). Afin de déterminer la toxicité de mélanges de PCB-dl, un système basé sur une équivalence toxique a été établi (Kannan *et al.*, 1988). Celui-ci est basé sur la toxicité de la 2,3,7,8 tétrachlorobibenzo-p-dioxine (2,3,7,8-TCDD) à

laquelle est attribué un facteur de toxicité équivalent (TEF) de 1. La valeur de TEF des autres composés est déterminée notamment par comparaison de leur capacité d'induction enzymatique à celle de la TCDD. Le tout premier système d'équivalence a été développé par l'OTAN en 1989. Puis en 1997, le centre européen de l'environnement et de la santé (ECEH European Centre for Environment and Health) a créé son propre système les WHO-TEF et les WHO-TEQ qui a été réactualisé en 2006 (Van den Berg *et al.*, 1998; Van den Berg *et al.*, 2006). Ces valeurs de TEQ sont particulièrement utilisées par les autorités pour exprimer des valeurs seuils de PCB-dl, PCDD et PCDF dans les organismes vivants.

Un nombre important d'études a reporté une association entre une exposition au PCB et des effets sur l'homéostasie thyroïdienne chez l'Homme (Abdelouahab *et al.*, 2013; Abdelouahab *et al.*, 2008; Hagmar *et al.*, 2001a; Hagmar *et al.*, 2001b; Persky *et al.*, 2001; Schell *et al.*, 2008; Turyk *et al.*, 2007). Le mécanisme de perturbation des HT est facilité par la structure chimique des PCB très proche des HT, induisant donc l'activation ou l'inhibition de la fonction thyroïdienne notamment par la liaison aux TR ou aux protéines de transport de HT (Chauhan *et al.*, 2000; Kitamura *et al.*, 2005). Les résultats obtenus sont parfois discordants. Ainsi chez l'Homme, les PCB provoquent parfois une diminution de la T4 sérique, alors que, dans certaines études, c'est la concentration de la T3 qui est affectée. De la même manière pour les différences entre sexes, des effets peuvent être observés uniquement chez les hommes alors que d'autres études indiquent les femmes comme les seules affectées. Il est donc difficile d'établir des effets propres à une exposition au PCB, si ce n'est des perturbations de l'homéostasie ou plus généralement de la fonction thyroïdienne. Turyk *et al.* (2006) ont ainsi constaté chez une population humaine masculine des Grand Lac, consommatrice de poisson, une corrélation négative des PCB avec les HT sériques, TSH, T3 libre et T4 libre. Lors d'une vaste étude réalisée sur plus de 1000 slovaques adultes, Langer *et al.* (2008) ont montré que pour les plus fortes concentrations de PCB trouvées chez les individus, les concentrations de T4 libre augmentaient proportionnellement à l'exposition. Une augmentation du volume de la thyroïde a également été constatée dans des zones polluées aux PCB chez des sujets présentant les concentrations en PCB les plus élevées (Langer *et al.*, 2008; Langer *et al.*, 2003). Au contraire, l'analyse d'une population d'enfants n'a révélé aucun lien entre la concentration en PCB dans le sang et les concentrations en hormones thyroïdiennes (TSH, T3 et T4) (Wilhelm *et al.*, 2008).

Du fait de l'importance des HT pour le neuro-développement, des recherches ont également été menées chez l'Homme afin d'examiner les effets d'une exposition aux PCB durant la

grossesse sur l'homéostasie thyroïdienne (Chevrier *et al.*, 2007; Chevrier *et al.*, 2008; El Majidi *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2013; Koopman-Esseboom *et al.*, 1994; Steuerwald *et al.*, 2000; Takser *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Ainsi récemment, Kim *et al.* (2013) ont recherché 19 PCB dans le sérum de 105 femmes enceintes. Ils ont observé une corrélation négative entre certains PCB (PCB 28, 52 et 118) et les concentrations sériques de T3 libre et totale, de T4 et de TSH. Dans deux études, sur des femmes enceintes, les concentrations en PCB dans le sérum étaient positivement corrélées avec les niveaux de TSH (Chevrier *et al.*, 2007; Takser *et al.*, 2005). Dans quelques études, une association entre une exposition prénatale aux PCB et une diminution des fonctions cognitives chez l'enfant attribuée entre autres à une hypothyroïdie a été constatée (Boucher *et al.*, 2009; Schantz *et al.*, 2003). Cependant aucune étude chez l'animal de laboratoire n'a pu corroborer clairement cette hypothèse (Zoeller, 2007).

Il a également été observé que les PCB peuvent avoir des effets au niveau de l'expression génique thyroïdo-dépendante, notamment de par leur fixation sur les TR et/ou l'inhibition de la T3 (Bansal *et al.*, 2005; Gauger *et al.*, 2004; Iwasaki *et al.*, 2002; Miyazaki *et al.*, 2004; Roelens *et al.*, 2005; Santini *et al.*, 2003).

Au contraire des études sur l'Homme, les études sur les animaux de laboratoire, en particulier sur le rongeur, montrent des résultats plus concordants. L'exposition aux PCB est toujours associée à une réduction de la concentration de T4 (libre et totale) sérique (Gauger *et al.*, 2007). Ainsi, une exposition au PCB 118 (10-1000 µg/kg/jour) chez des rats mâles, a montré un lien entre l'augmentation de la dose d'exposition et une diminution des concentrations sériques des T4 libre, T3 libre, et TSH (Tang *et al.*, 2013). Les auteurs ont constaté également des changements histologiques et de structure lors de l'observation des thyroïdes.

Comme chez l'Homme, une exposition périnatale aux PCB pourrait également affecter l'homéostasie, par le biais d'une diminution de HT sériques. Cela a été démontré dans plusieurs travaux chez le rat (Crofton *et al.*, 2000; Donahue *et al.*, 2004; Meerts *et al.*, 2002; Meerts *et al.*, 2004; Zoeller and Crofton, 2000) et récemment aussi chez le chien (Kirkegaard *et al.*, 2011).

Chez les amphibiens exposés en laboratoire, les PCB induiraient un retard dans la métamorphose. Gutleb *et al.* (2000) ont constaté ce retard après une exposition orale durant 10 jours au Clophen A50 (mélange commercial de PCB équivalent à l'Aroclor 1254 et Phénochlor DP5) (2 et 200 mg/kg) et au PCB 126 (0,2 mg/kg) chez *Xenopus laevis* et *Rana*

temporaria. Lehigh Shirey *et al.* (2006) ont observé un effet similaire pour une exposition de *Xenopus laevis* à une dose environnementale d'Aroclor 1254 (50 µg/L) dans l'eau. Ces auteurs ont également constaté une altération de l'expression des gènes de la TTR, de la désiodase de type 2 et de type 3. Ces perturbations de la métamorphose pourraient donc être induites par une diminution des concentrations des HT, des interférences avec les TR, ou encore une altération de la désiodation et/ou du métabolisme des HT (Gutleb *et al.*, 2000; Kloas and Lutz, 2006; Lehigh Shirey *et al.*, 2006).

Les quelques études s'intéressant aux PT sur la faune sauvage, poissons, oiseaux, phoques ou encore ours polaires, ont montré des corrélations entre concentrations de PCB et des modifications de l'homéostasie thyroïdienne (Braathen *et al.*, 2004; Brar *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2004; Cesh *et al.*, 2010; Chiba *et al.*, 2001; Jørgensen *et al.*, 2004; Simmons *et al.*, 2014; Skaare *et al.*, 2001; Sørmo *et al.*, 2005; Sormo *et al.*, 2009; Verreault *et al.*, 2004). Cependant celles-ci se sont généralement limitées à l'exploration des variations des niveaux d'HT circulantes donc il ne faut pas exclure la possibilité d'autres types de perturbations dues aux PCB chez ces espèces.

I.3.2. Les polybromodiphényles éthers (PBDE)

I.3.2.1. Structures et propriétés physico-chimiques

Les polybromodiphényles éthers (PBDE) font référence à une famille de composés organobromés présentant une même structure générique (Figure 6). Les PBDE sont constitués de deux cycles phényles reliés entre eux par une fonction éther qui forme le noyau diphenyle éther. Chacun des cycles phényles peut comporter jusqu'à 5 atomes de brome en substitution des atomes d'hydrogènes.

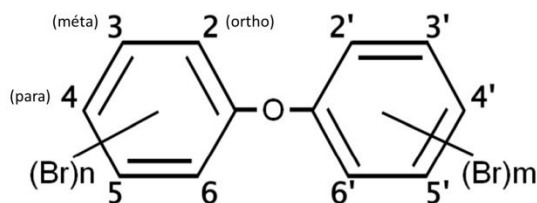


Figure 6. Structure chimique générique des PBDE

Les différentes combinaisons entre le degré de substitution (de 1 à 10) et la position des atomes de brome (en ortho, méta ou para) permettent d'obtenir, comme pour les PCB, 209 congénères possibles. Une nomenclature selon le système développé par Ballschmiter et Zell (1980) a également été établie. Elle utilise le degré de bromation et la position des atomes de brome. Comme pour les PCB, la nomenclature de l'IUPAC est largement utilisée. Le Tableau 3 présente les principales propriétés physico-chimiques.

Tableau 3. Principales caractéristiques physico-chimiques des groupes de congénères et des mélanges commerciaux de PBDE (De Wit *et al.* 2002 ; Tittlemier *et al.* 2002).

Groupe de congénère ou mélange technique	Poids moléculaire (g/mol)	Point de fusion (°C)	Pression de vapeur (Pa) à 25°C	Solubilité à 25°C (g/m ³)	Coefficient de partage octanol/eau logKow
Tétra-BDE	485,82	79-82	$2,6-3,3 \cdot 10^{-4}$	0,0109	5,9-6,2
Penta-BDE	564,75	-7 à -3	$2,9-7,3 \cdot 10^{-5}$	0,0024	6,5-7,0
Mélange penta-BDE	564,69	92-98	$4,69 \cdot 10^{-5}$	0,0133	6,46-7,4
Hexa-BDE	643,62	-	$4,2-9,4 \cdot 10^{-6}$	0,001	6,9-7,9
Octa-BDE	801,38	75-220	$1,2-2,2 \cdot 10^{-7}$	0,0005	
Mélange octa-BDE	802	-	$6,69 \cdot 10^{-5}$	0,0005	6,29-8,9
Deca-BDE	959,17	290-306	$<10^{-4}$	$<0,0001$	8,4-8,9
Mélange deca-bde	959,2	300-310	$4,63 \cdot 10^{-6}$	$6,8 \cdot 10^{-7} - 0,1 \cdot 10^{-3}$	6,27-9,97

Une des caractéristiques principales des PBDE est d'avoir un Log de Kow relativement élevé (entre 5 et 9 en fonction des congénères) qui augmente avec le nombre d'atomes de brome (Tittlemier *et al.*, 2002). Les PBDE ont donc un caractère hydrophobe très marqué. Les PBDE sont très peu solubles dans l'eau et sont également peu volatils (Tittlemier *et al.*, 2002). Leur pression de vapeur est relativement faible et diminue avec le nombre d'atomes de brome (Tittlemier *et al.*, 2002).

1.3.2.2. Sources et utilisations

Les PBDE ne sont pas exclusivement d'origine anthropique mais peuvent être produits par certains organismes marins comme des éponges, des algues ou encore des bactéries (Guitart *et al.*, 2011; Haraguchi *et al.*, 2011; Malmvärn *et al.*, 2005). La part de la contamination par les PBDE d'origine naturelle reste moindre par rapport à ceux synthétisés par l'Homme même si une étude récente montre qu'elle n'est pas négligeable dans certaines zones (Rotander *et al.*, 2012).

Les PBDE synthétiques sont produits par bromation du diphenyle éther en présence d'un catalyseur (AlCl_3) selon la réaction de Friedel-Crafts (réaction de substitution électrophile aromatique). Comme dans le cas des PCB, cette synthèse n'est pas spécifique et le produit obtenu n'est donc pas pur mais correspond à un mélange de congénères. Il est cependant possible de favoriser la formation de certains congénères en modifiant les conditions de synthèse. Le caractère orienté de la bromation pour les positions en ortho et en para lors des substitutions explique la prédominance de certains PBDE plus que d'autres. Leur production commerciale a débuté en 1970 aux Etats Unis (de Wit, 2002). Trois mélanges techniques à usage industriel ont ainsi été produits, le penta-BDE, l'octa-BDE et le déca-BDE. La dénomination se réfère au type de congénère majoritairement présent dans le mélange *e.g.* le PBDE 209 (10 bromes) dans le cas du deca-BDE. La composition exacte de chaque mélange varie en fonction du fabricant (de Wit, 2002; Korytár *et al.*, 2005; La Guardia *et al.*, 2006). En Europe, l'utilisation des mélanges penta et octa-BDE est interdite depuis 2004 et ils figurent depuis 2009 sur la liste des POP de la Convention de Stockholm (INERIS, 2012). Le troisième mélange, le déca-BDE reste le seul autorisé en Europe mais son utilisation dans les équipements électriques et électroniques a été fortement restreinte (Directive 2011/65/EU) (European Union, 2011). Il ne figure pas dans la liste de la Convention de Stockholm mais il n'est plus fabriqué en France et en Europe depuis plusieurs années (INERIS, 2012). Depuis les années 80, la production mondiale des PBDE a augmenté de façon exponentielle. Il est difficile d'obtenir des données sur celle-ci mais on peut penser que les récentes réglementations ont contribué à sa diminution. L'utilisation des mélanges commerciaux dans le monde pour l'année 2001 est présentée dans le Tableau 4 tiré de la publication de Law *et al.* (2006). Même si l'Europe ne produit plus de déca-BDE, son apport *via* l'importation de produits manufacturés est estimé à 1300 tonnes par an.

Tableau 4. Utilisation annuelle mondiale des PBDE en tonnes pour l'année 2001 (Law *et al.* 2006)

	Europe	Amérique du Nord	Asie	Reste du monde
Penta-BDE	150	7100	150	100
Octa- BDE	610	1500	1500	180
Deca-BDE	7600	24500	23000	1050

Les PBDE sont des retardateurs de flammes, ils sont ou ont été utilisés en tant qu'additifs ignifugeants dans de nombreux produits industriels ou de consommation courante :

- Le mélange penta-BDE est composé principalement de congénères tétra, penta et hexabromés. Il a le plus souvent été utilisé dans la fabrication de polyuréthane, une mousse de rembourrage souple ou solide ayant des applications notamment dans le secteur de l'ameublement (literie), du bâtiment (isolant) ou encore de l'automobile (siège, isolant). Il a également été utilisé mais dans des proportions moins importantes dans les tissus, les composants électroniques, les peintures, les résines (époxy et phénoliques) ou encore les fluides hydrauliques.
- Le mélange commercial octa-BDE a pour composition des congénères hexa, hepta, octa et nonabromés ainsi que des traces de congénères décabromés. Il a majoritairement (95 %) été utilisé dans la fabrication des polymères ABS (acrylonitrile butadiène styrène). Les 5 % restant concernaient la fabrication d'autres plastiques dont des polymères polyamides, le polystyrène haute densité (PS-HD) mais aussi le polybutylène téréphtalate (PBT).
- Le mélange déca-BDE est lui quasi exclusivement composé de décabromés, c'est-à-dire du congénère 209. Il est principalement utilisé dans les polymères, les plastiques et le textile.

1.3.2.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne

Une des particularités des PBDE est la similarité structurale notamment de ses métabolites hydroxylés avec les hormones thyroïdiennes. En effet, les HT sont des diphenyléthers hydroxylés et halogénés (iodés). De nombreuses études ont démontré que les PBDE peuvent nuire au développement neurologique, comportemental, au fonctionnement du foie, au système endocrinien ainsi qu'au système thyroïdien mais pourrait également être cancérigène (Akutsu *et al.*, 2008; Branchi *et al.*, 2003; Darnerud, 2008; Darnerud, 2003; Hooper and McDonald, 2000; McDonald, 2002).

Les populations les plus sensibles à une exposition aux PBDE sont les femmes enceintes, les nourrissons et les fœtus en développement (McDonald, 2002). Ainsi parmi les effets observés chez l'Homme, deux études ont montré une corrélation négative entre l'exposition à des PBDE et la concentration en TSH sérique chez l'homme adulte (Hagmar *et al.*, 2001a) mais aussi chez la femme enceinte (Chevrier *et al.*, 2010). Turyk *et al.* (2007) ont noté une

corrélation négative entre concentrations sériques en PBDE et celles des T3 et TSH, mais aussi, une corrélation positive avec celle en T4. Julander *et al.* (2005) ont aussi constaté une tendance à l'augmentation de la T4 libre dans le plasma d'employés d'une usine de recyclage de matériel électronique exposés aux congénères 28, 153 et 183. Cette augmentation de la T4 (totale, libre dans le sang et urinaire) a également été constatée dans une vaste étude chez des hommes exposés à des niveaux comparables à ceux auxquels est confrontée la population américaine générale (Turyk *et al.*, 2008). Par ailleurs, une corrélation négative entre les concentrations de PBDE et celles des T3 et TSH a été observée. Malgré une similarité de structure chimique avec les HT, il semblerait que les PBDE et leurs métabolites ne montrent pas d'affinité importante pour les récepteurs thyroïdiens (Kitamura *et al.*, 2008). Seuls les 3- et 4-OH-PBDE montrent une forte affinité pour les récepteurs thyroïdiens (TR α et TR β) (Kitamura *et al.*, 2008; Kojima *et al.*, 2009; Schriks *et al.*, 2007).

Un nombre important d'études expérimentales sur les animaux a exploré et identifié les associations entre l'exposition au PBDE et les effets négatifs pour la santé. Les données toxicologiques sur les mammifères sont donc nombreuses. Ainsi chez le rat, les mélanges commerciaux ainsi que plusieurs congénères de PBDE ont induit une diminution de la concentration en hormones thyroïdiennes (T4 et T3) dans le sang (Hallgren *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2010; Stoker *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2002). De même, une exposition pré- et post-natale au PBDE diminue la concentration en hormones thyroïdiennes sériques durant la gestation et après la mise bas chez la mère mais aussi chez le juvénile (Kodavanti and Curras-Collazo, 2010; Zhou *et al.*, 2002). Kim *et al.* (2009) ont constaté qu'une exposition au BDE 209 durant la gestation est liée à une augmentation de la TSH chez le juvénile. Une exposition orale au mélange commercial penta-BDE (DE-71) chez le rat diminue la concentration en HT mais aussi provoque une hyperplasie de la glande thyroïdienne (Stoker *et al.*, 2004). Des effets sur l'homéostasie thyroïdienne ont également été observés chez la souris (Darnerud, 2003). Il a été démontré qu'une exposition périnatale de rongeurs au BDE 99 (60-300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ au 6^{ème} jour de gestation) peut provoquer des changements durables de l'activité motrice (hyperactivité) et perturber la performance lors de tests d'apprentissage et de mémoire (Kuriyama *et al.*, 2005). Des études sur plusieurs générations avec des niveaux d'exposition comparables à ceux d'exposition humaine et environnementale, ont montré des effets similaires sur l'homéostasie thyroïdienne chez les ratons (Kuriyama *et al.*, 2007) et les agneaux (Abdelouahab *et al.*, 2009).

Chez d'autres espèces, des études ont également montré des effets des PBDE sur la fonction thyroïdienne. Chez les amphibiens, une inhibition de la métamorphose de *Xenopus tropicalis* (1-10 mg BDE99/g de nourriture) (Carlsson *et al.*, 2007) et de *Xenopus laevis* (1000–5000 µg mélange DE-71/g de nourriture) (Balch *et al.*, 2006) ainsi qu'une inhibition de la régression de la queue chez le têtard de *Xenopus laevis* ont pu être observées (20-1000 nM BDE206), cette dernière étant dépendante de la T3 (Schriks *et al.*, 2006). Bien que les mécanismes d'action des PBDE sur l'axe HPT ne soient pas encore totalement connus, il semblerait, d'après ces observations chez les amphibiens, que les PBDE aient un rôle antagoniste dans la liaison de la T3 avec les récepteurs thyroïdiens. Des réductions similaires des concentrations d'hormones thyroïdiennes ont été relatées chez le poisson (Lema *et al.*, 2008; Tomy *et al.*, 2004), le faucon crécerelle (Ferne *et al.*, 2005) et chez le vison (Zhang *et al.*, 2009). Chez ce dernier, un effet transgénérationnel a également été démontré. Néanmoins, certaines études ont également montré l'absence d'effet des PBDE sur la fonction thyroïdienne. Ainsi, chez deux espèces de poissons (le flet et le poisson zèbre), aucun effet n'a été observé suite à une exposition en laboratoire au mélange commercial penta-BDE (0,007-14 000 µg DE-71/g de sédiments et nourriture pour les flets et 5-500mg DE-71/L d'eau pour les poissons zèbres) (Kuiper *et al.*, 2008).

I.3.3. Les substances perfluoroalkylées (PFAS)

I.3.3.1. Structures et propriétés physico-chimiques

Les substances perfluoroalkylées (PFAS) également appelées composés perfluorés (PFC), représentent une importante famille de substances chimiques (Buck *et al.*, 2011). Le terme PFAS est générique et englobe deux groupes de composés fluorés, les polyfluoroalkyles (alkyles polyfluorés) et les perfluoroalkyles (alkyls perfluorés) (Buck *et al.*, 2011). Ces composés sont caractérisés par une chaîne hydrophobe linéaire carbonée totalement fluorée liée à une ou à plusieurs têtes hydrophiles. Ces deux groupes sont constitués de plus de 800 molécules différentes. Les perfluoroalkyles sont eux-mêmes divisés en plusieurs sous familles selon le type de groupement fonctionnel porté par la chaîne carbonée. Les plus connues sont les acides perfluorocarboxyliques (PFCA) et les acides perfluorosulfoniques (PFASS). Les PFCA possèdent une fonction acide carboxylique à l'extrémité de la chaîne carbonée. L'acide perfluorooctanoïque (PFOA) est le composé le plus connu et répandu des PFCA. Les PFASS portent quant à eux une fonction sulfonate en bout de chaîne carbonée. Le composé le plus

connu et répandu parmi cette sous-famille est le perfluorooctane sulfonate (PFOS). Dans cette étude, l'utilisation du terme PFAS correspond aux sous-familles suivantes : les acides perfluorocarboxyliques (PFCA), les acides perfluorosulfoniques (PFASS) et les acides perfluoroalkylsulfoniques (PFASi) qui appartiennent également au groupe des perfluoroalkyles. Les structures chimiques des PFAS étudiés sont présentées dans la Figure 7.

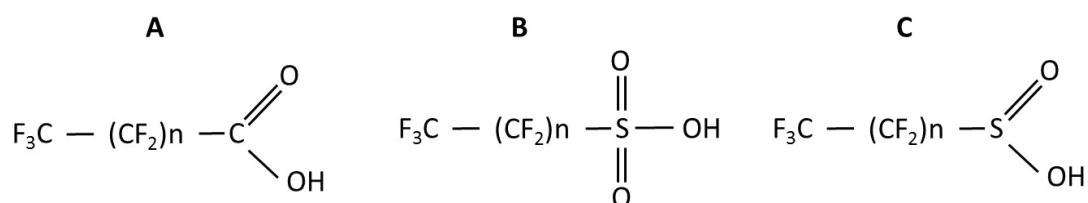


Figure 7. Structure chimique générique des acides perfluorocarboxyliques (A), des acides perfluorosulfoniques (B) et des acides perfluoroalkylsulfoniques (C).

La liaison carbone/fluor est extrêmement forte en termes d'énergie (Key *et al.*, 1997) et est donc *in fine* particulièrement stable (Smart, 1994). L'association d'un groupement fonctionnel hydrophile à l'extrémité de la chaîne carbonée hydrophobe confère aux PFAS un caractère amphiphile ainsi qu'une forte stabilité chimique. Ces deux propriétés font des PFAS des molécules tensioactives particulièrement résistantes à la dégradation (biotique et abiotique), aux attaques chimiques (notamment aux acides, aux bases et aux réactions d'oxydoréduction), aux hautes températures, aux dégradations microbiennes et à la photolyse, expliquant leur persistance dans l'environnement (Giesy and Kannan, 2001; Kissa, 2001). En effet, les PFAS sont considérés comme ubiquitaires, ils ont été détectés dans la quasi-totalité des compartiments environnementaux, reflétant une pollution à l'échelle mondiale de tous les écosystèmes (Giesy and Kannan, 2001). La persistance des PFAS dans l'environnement, leur potentiel d'accumulation dans les organismes ainsi que leur propension à se bioaccumuler dans la chaîne alimentaire sont donc particulièrement préoccupants.

1.3.3.2. Sources et utilisations

Les PFAS sont fabriqués industriellement selon deux voies de synthèse, la fluoration électrochimique et la télomérisation (Buck *et al.*, 2011). Suite à ces deux processus non sélectifs, un raffinage par distillation est nécessaire afin d'obtenir des mélanges correspondant à des applications spécifiques (PERFORCE, 2006). L'origine des PFAS est majoritairement anthropique, toutefois certains composés perfluorés peuvent être produits naturellement mais ceux-ci ne comportent pas plus d'un atome de carbone fluoré.

Depuis les années 1950, les propriétés physico-chimiques des PFAS sont largement exploitées dans de nombreuses applications industrielles mais également domestiques (Hekster *et al.*, 2003; Lehmler, 2005). Ils sont utilisés notamment dans la fabrication de tapis (14 à 48 %), dans le textile et les chaussures (43 à 48 %), les produits d'emballages et le papier (15 à 28 %), dans la production de mousses tels que les mousses anti-incendies ou des mousses isolantes (polyuréthane) (6 à 16 %) mais aussi dans d'autres produits comme des revêtements anti-adhérents, les vernis, les lubrifiants des encres (8 à 20 %) (Paul *et al.*, 2008; Prevedouros *et al.*, 2005). Le Teflon® et le Gore-Tex® figurent parmi les applications les plus connues des PFAS.

Les PFAS sont émis dans l'environnement durant tout le cycle de vie des produits, de leur synthèse à leur élimination. Les sources sont donc à la fois directes et indirectes. Entre 1970 et 2002, la production mondiale de PFOS a été estimée à 96 000 tonnes avec des rejets directs et indirects (dans l'eau et l'air) estimés à environ 42 000 tonnes durant cette même période (Paul *et al.*, 2008). La production de PFCA (représenté majoritairement par le PFOA) a été estimée entre 4 400 et 8 000 tonnes pour une période allant de 1951 à 2004 avec des rejets totaux compris entre 3 200 et 7 300 tonnes (Armitage *et al.*, 2009; Prevedouros *et al.*, 2005). La production de PFOS par la société 3M, la principale productrice de PFOS dans le monde, a cessé en 2002 (Buck *et al.*, 2011). La production mondiale a alors fortement chuté (Ahrens, 2011; Lau *et al.*, 2007). Depuis 2006, des restrictions d'utilisations ont été émises pour le PFOS et ses sels mais aussi un de ses précurseurs, le fluorure de perfluorooctanesulfonyle dans l'Union Européenne (Directive UE 2006/122/ECOF). Néanmoins, d'autres PFAS sont encore produits. Le PFOS et ses dérivés sont les seuls PFAS à avoir intégré la liste des POP de la convention de Stockholm, ils y figurent depuis 2009 (UNEP 2009, 2009).

1.3.3.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne

La toxicité des PFAS a été largement étudiée notamment chez les rongeurs, en particulier l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), souvent désignés comme références ou substances clés pour les deux principaux groupes de PFAS (PFCA et PFASS)(Stahl *et al.*, 2011). Les principaux effets connus des PFAS sont leur immunotoxicité, leur hépatotoxicité, leur potentiel carcinogénique, leur toxicité sur le développement et leurs perturbations de la fonction endocrinienne. Plusieurs publications ont référencé et discuté les résultats obtenus au travers de ces multiples études (Andersen *et al.*,

2008; Domingo, 2012; Fromme *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2007; Stahl *et al.*, 2011).

Ainsi, Austin *et al* (2003) ont montré que le PFOS peut avoir une influence sur le système neuro-endocrinien chez le rat. Les auteurs ont découvert qu'une exposition durant 2 semaines au PFOS (1-10 mg/kg) réduit la prise de nourriture et le poids corporel, a une influence sur le cycle de l'ovaire, augmente la concentration de la corticostérone, diminue la concentration de leptine dans le sérum. Les premières études relatant des effets des PFAS sur les hormones thyroïdiennes datent des années 80 (Gutshall *et al.*, 1988; Langley and Pilcher, 1985). Les rats ayant reçu une dose d'acide perfluorodécanoïque (50-250 µg PFDA/kg/j) pendant 7 jours ont alors présenté des concentrations en T4 réduites, une baisse de la température corporelle ainsi qu'un rythme plus lent par rapport aux animaux témoins. Le traitement par T4 n'était pas en mesure d'inverser l'hypothermie. D'autres études sur les rats ont également montré qu'une exposition au PFOS entraîne une réduction de T4 et de T3 sérique. Néanmoins, en contrepartie, aucune augmentation de la TSH n'a été constatée. Il existe des preuves que le PFOS, comme le PFDA, déplacent les hormones thyroïdiennes au niveau de leur protéine de liaison dans la circulation sanguine (Lau *et al.*, 2007). Weiss *et al.* (2009) ont observé que les PFAS sont des compétiteurs de la liaison de l'hormone thyroïdienne T4 à la transthyréine (TTR), une des protéines de transport des hormones thyroïdiennes. La capacité de liaison des PFAS à la TTR diminue selon l'ordre suivant : PFHxS > PFOS / PFOA > acide perfluoroheptanoïque (PFHpA) > perfluoro-1-octanoïque sulfinate (1-PFOSi) > acide perfluorononanoïque (PFNA). Cette affinité pour la TTR reste toutefois inférieure à celle de la T4 d'environ 12,5 à 50 fois. Cette compétition pourrait toutefois expliquer la diminution de la concentration en hormones thyroïdiennes suite à un traitement avec des PFAS. Les PFAS peuvent également agir sur l'expression génique spécifique à la fonction thyroïdienne. L'exposition pré- et postnatale au PFOS a provoqué des perturbations dans l'expression de l'ARNm de la TTR (Yu *et al.*, 2009b). Ainsi, chez les rats exposés (3.2 mg PFOS/kg), une augmentation de 150% du niveau de transcription de l'ARNm de la TTR a été constatée. Toujours chez le rat, l'ingestion de PFOS entraîne une augmentation de la disponibilité des tissus pour la T4, mais également une augmentation du rétrocontrôle de la T4 en lien avec une réduction de la T4 totale sérique (Chang *et al.*, 2008). Néanmoins d'après les auteurs de l'étude, cette exposition n'a pas induit d'hypothyroïdie ni de perturbation de la libération de la TSH chez les rats exposés et n'a vraisemblablement pas non plus altéré le fonctionnement de l'axe HPT. D'autres études ont constaté qu'une exposition au PFOS chez le rat provoque une

hypothyroïxémie (faible concentration de T4 sérique) là encore sans pour autant induire une hausse de la TSH (Lau *et al.*, 2003; Luebker *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2009b). Récemment, il a été trouvé que le PFOS et le PFOA diminuent l'activité de la thyroperoxydase humaine (TPO) (Song *et al.*, 2012). La TPO est une enzyme clef dans la biosynthèse des HT, elle joue le rôle de catalyseur dans la capture d'iode par la thyroglobuline au sein de la glande. Une étude de Ji *et al.* (2012) portant sur des enfants coréens a montré que les concentrations sériques en acide perfluorotridécanoïque (PFTrDA) étaient corrélées négativement avec celles de la T4 totale et positivement avec celles de la TSH en particulier chez les jeunes filles. Dans une autre étude sur des enfants vivant à proximité d'une usine de fabrication de Téflon (PFOA), Lopez-Espinosa *et al.* (2012) ont observé un lien entre hypothyroïdie et PFOA mais aussi une corrélation positive entre les concentrations de PFOS et PFNA et la concentration de T4 totale sérique. Enfin, une étude portant sur les relations entre concentrations en PFAS dans le sérum et les concentrations fœtales en hormones thyroïdiennes a montré que la présence de PFOS mais aussi de PFTrDA dans le sérum de la mère induisait une diminution de la T3 fœtale (Kim *et al.*, 2011). Wang *et al.* (2014) suggèrent également que l'exposition à certains PFAS pendant la grossesse peut interférer avec l'homéostasie des hormones thyroïdiennes chez les femmes enceintes et les fœtus.

Il existe donc de nombreuses études relatant des effets négatifs des PFAS sur la fonction thyroïdienne notamment sur l'homéostasie des hormones thyroïdiennes. Néanmoins, de nombreuses contradictions peuvent être relevées dans ces corrélations positives, négatives ou nulles entre les PFAS et les hormones thyroïdiennes (Bloom *et al.*, 2010; Dallaire *et al.*, 2009; Emmett *et al.*, 2006; Olsen and Zobel, 2007).

I.3.4. Les alkylphénols (AP)

I.3.4.1. Structures et propriétés physico-chimiques

Les alkylphénols sont des molécules chimiques composées d'un cycle phényle substitué par un groupe hydroxyle et un groupe alkyle. Le groupe alkyle peut être linéaire ou ramifié et positionné sur le cycle en position ortho, méta ou para (Figure 8).

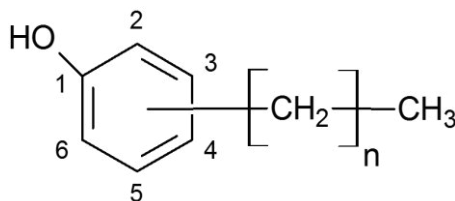


Figure 8. Structure chimique générique des alkylphénols.

La nomenclature ou dénomination des alkylphénols est complexe, ce qui rend parfois difficile l'identification exacte du ou des composés visés (INERIS, 2005). En effet, pour une même dénomination, on peut avoir parfois, comme dans le cas du nonylphénol, plus d'une centaine d'isomères (en théorie) sous cette appellation. Dans la pratique, le terme nonylphénol est surtout employé pour désigner des mélanges comportant pas plus de 22 isomères ou encore le composé sous sa forme linéaire. L'utilisation de la numérotation CAS (Chemical Abstract Service) qui attribue un numéro unique à chaque substance ou mélange, a facilité l'identification des isomères bien que demeurent encore de nombreuses confusions dans la citation de ces numéros. Les principaux alkylphénols utilisés et étudiés sont essentiellement le nonylphénol et dans une moindre mesure l'octylphénol (INERIS, 2005). Les principales caractéristiques physico-chimiques de ces deux alkylphénols sont présentées dans le Tableau 5.

Tableau 5. Principales caractéristiques physico-chimiques de l'octylphénol et du nonylphénol (INERIS, 2005).

	Octylphénol	Nonylphénol
Poids moléculaire (g/mol)	206,3	220,3
Point de fusion (°C)	84-85	81-83
Point d'ébullition (°C)	280-302	295-320
Pression de vapeur (Pa) à 25°C	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$1,05-8,05 \cdot 10^{-3}$
Solubilité à 20°C (g/m ³)	12,60	5,43
Coefficient de partage octanol/eau logKow	4,12	4,20-4,48

Les alkylphénols présentent une solubilité dans l'eau ainsi qu'une volatilité plutôt faibles. Les logKow des alkylphénols les rendent faiblement hydrophobes favorisant une accumulation modérée de ces substances dans les milieux lipophiles et une préférence dans l'environnement pour les sédiments *versus* la phase aqueuse (Ying *et al.*, 2002). Isobe *et al.* (2007) ont constaté qu'en milieu aquatique, 80% des nonylphénols sont retrouvés dans la phase particulaire et 20% dans l'eau. La solubilité varie en fonction de la longueur de la chaîne alkyle, elle diminue quand la longueur de la chaîne augmente.

1.3.4.2. Sources et utilisations

Les alkylphénols sont synthétisés par substitution électrophile aromatique selon une réaction de type Friedel-Crafts qui intéresse phénols et alcènes (C_nH_{2n}). Lorsque la chaîne alkylée produite est longue (> à 3 carbones), les isomères en para (appelés également *p*- ou *4*-) sont prédominants bien que des isomères en ortho (*o*- ou *2*-) soient également produits. Les isomères en méta sont produits en très petite quantité au cours de la réaction du fait notamment de leur grande stabilité thermique.

Les alkylphénols sont principalement utilisés, depuis plus de 50 ans, pour produire des alkylphénols éthoxylates (APE), des agents tensio-actifs non-anioniques (INERIS, 2005). Les APE sont majoritairement utilisés pour leurs propriétés tensioactives dans les détergents anti-moussants, détergents liposolubles, les agents mouillants et émulsifiants et les détergents à haute température et haute salinité. Ils entrent également dans la composition des pesticides, des produits de traitement du bois (peintures et résines phénoliques), des additifs pour les

lubrifiants et certains produits cosmétiques. Les alkylphénols sous leur forme brute peuvent être utilisés dans la composition de cosmétiques, de détergents, d'adoucisateurs, de lessives ou encore de décapants. Le nonylphénol et l'octylphénol représentent 95% des alkylphénols utilisés par l'industrie (INERIS, 2005). La production mondiale d'APE a été évaluée à 500 000 tonnes pour l'année 1997 (Ying, 2006; Ying *et al.*, 2002). Durant cette même année, la production et l'importation de nonylphénol étaient d'environ 82 000 tonnes en Europe (INERIS, 2005). Les deux classes d'APE que l'on retrouve majoritairement sur le marché mondial sont les nonylphénol éthoxylates (80-90%) et les octylphénol éthoxylates (10-20%) (Renner, 1997). L'octylphénol et le nonylphénol ont été, dès les années 2000, inscrits sur la liste des 33 substances prioritaires de la DCE (European Commission, 2000). La directive fille de 2008 fixe, quant à elle, des normes de qualité environnementale de 300 et 100 ng/L (European Commission, 2008) respectivement pour le 4-nonylphénol et l'octylphénol. Depuis 2003 en Europe, le nonylphénol et les nonylphénols éthoxylates sont soumis à des restrictions d'utilisation et de vente (European Union, 2003). A noter que les alkylphénols sont également obtenus lors de la dégradation des APE. Dans la mesure où les APE ne sont pas produits naturellement, la présence de leurs métabolites dans l'environnement est exclusivement liée aux activités anthropiques (Ying *et al.*, 2002). Les alkylphénols sont rejetés directement, notamment lors d'épandage de pesticides, soit à partir des dispositifs de traitement des eaux ou de l'épandage de boues d'épuration contaminées (Bennett and Metcalfe, 2000; Hale *et al.*, 2000; Ying, 2006). Ils sont ubiquitaires dans l'environnement, leur présence a été détectée dans l'eau, l'air, le sol et les sédiments (David *et al.*, 2009; Kovarova *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2009; Ying, 2006; Ying *et al.*, 2002).

1.3.4.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne

De nombreuses études ont démontré le potentiel toxicologique des alkylphénols particulièrement en tant que PE chez l'Homme et chez l'animal. Leur activité oestrogénique est connue depuis des années (Dodds *et al.*, 1938). En raison notamment de leur structure chimique, ils sont des compétiteurs de l'œstrogène sur les récepteurs oestrogéniques (Routledge and Sumpter, 1997; White *et al.*, 1994). Les conséquences de cette compétition sont notamment une induction de la vitellogénine ayant pour résultats une altération du métabolisme stéroïdien et de la croissance des gonades en particulier chez les poissons. L'impact des alkylphénols sur le système thyroïdien a en revanche été très peu étudié (Naderi

et al., 2014). La grande majorité des études s'intéressent aux deux alkylphénols massivement utilisés, l'octylphénol et surtout le nonylphénol.

Actuellement, aucune étude chez l'Homme n'a fait de lien entre exposition aux alkylphénols et perturbation du système thyroïdien. Ils sont toutefois suspectés d'être des PT (Li *et al.*, 2013). Chez le mammifère, en revanche quelques études ont été menées. Schmutzler *et al.* (2004) ont observé une augmentation de la T3 et T4 plasmatiques chez des rattes exposées à 80 mg/kg/jour, tandis que Kim *et al.* (2002) ont montré une diminution de la T4 à 100 mg/kg/jour. Dans une étude de 28 jours, durant lesquels des rats mâles et femelles ont été gavés avec du nonylphénol (10-250 mg/kg/jour), une augmentation de la masse de la thyroïde a été détectée chez les mâles (Woo *et al.*, 2007). De même, une étude récente de Xi *et al.* (2013) sur des rats gavés avec du nonylphénol (40-200 mg/kg /jour) durant 15 jours, a révélé des dommages au niveau de la glande thyroïde ainsi que des modifications de l'homéostasie. Une corrélation négative entre concentration en nonylphénol et diminution des hormones T3 et T4 libres mais également une augmentation de la TSH a été constatée. Goktekin *et al.* (2008) ont observé suite à une exposition orale au 4-tert-octylphenol (100-250 mg/kg/jour) de femelles rattes gestantes, une diminution du poids de la thyroïde et des lésions chez la progéniture mâle. Au cours d'une étude sur deux générations, l'exposition orale au nonylphénol (2-50 mg/kg/jour) a montré des effets sur les juvéniles uniquement pour la plus forte dose. Les femelles ont vu leur concentration sérique de T3 augmenter alors qu'au contraire chez les mâles celle-ci diminuait ainsi que la TSH. Certains auteurs ont cherché à évaluer l'effet du nonylphénol sur le développement et le fonctionnement neuro-moteur ou cognitif du rat qui est un processus thyroïdo-dépendant, sans toutefois arriver à relier ces deux (Flynn *et al.*, 2002; Jie *et al.*, 2010; Negishi *et al.*, 2004).

L'effet du nonylphénol a été montré chez les poissons, notamment sur l'homéostasie thyroïdienne (McCormick *et al.*, 2003; Naderi *et al.*, 2014; Zaccaroni *et al.*, 2009) mais avec des réponses parfois non concordantes. Naderi *et al.* (2014) ont injecté du nonylphénol en intra-péritonéale (10-200 µg/g) chez le pagre à nageoire jaune (*Acanthopagrus latus*) et ont observé une diminution dose-dépendante de la concentration plasmatique en T3 et une augmentation en T4 mais aucune variation de la TSH n'a été relevée. A l'inverse une injection intra-péritonéale de 10 µg/g a entraîné une diminution de la T4 et aucun effet sur la T3 chez le poisson rouge (*Carassius auratus*) (Zaccaroni *et al.*, 2009) et chez le saumon atlantique (*Salmo salar*) (McCormick *et al.*, 2003). Dans une autre étude sur le saumon atlantique (*Salmo salar*), McCormick *et al.* (2005) ont injecté du nonylphénol à différentes

doses (0-150µg/g) sur des juvéniles à plusieurs jours d'intervalles (4, 8 et 11 jours). Ils ont ainsi constaté une diminution de la T4, dépendante de la dose de nonylphénol, hormis en fin de traitement ou l'effet n'était constaté que pour la plus forte dose. De même, la T3 était réduite durant le traitement mais exclusivement à la dose de 150 µg/g. Les auteurs ont suggéré que de telles affections des concentrations en hormones thyroïdiennes étaient susceptibles de perturber la métamorphose chez les saumons.

I.3.5. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

I.3.5.1. Structures et propriétés physico-chimiques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représentent un important groupe de composés qui comportent au minimum deux noyaux benzéniques fusionnés entre eux et renfermant uniquement des atomes de carbone et d'hydrogène. Toutefois, il existe d'autres formes de HAP comportant sur les cycles aromatiques des groupements alkyles ou au sein de la structure aromatique des atomes d'oxygène, de soufre ou d'azote mais celles-ci n'ont pas été étudiées durant ce travail. En théorie, il existerait plus de 1000 HAP différents. La Figure 9 présente les structures des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA.

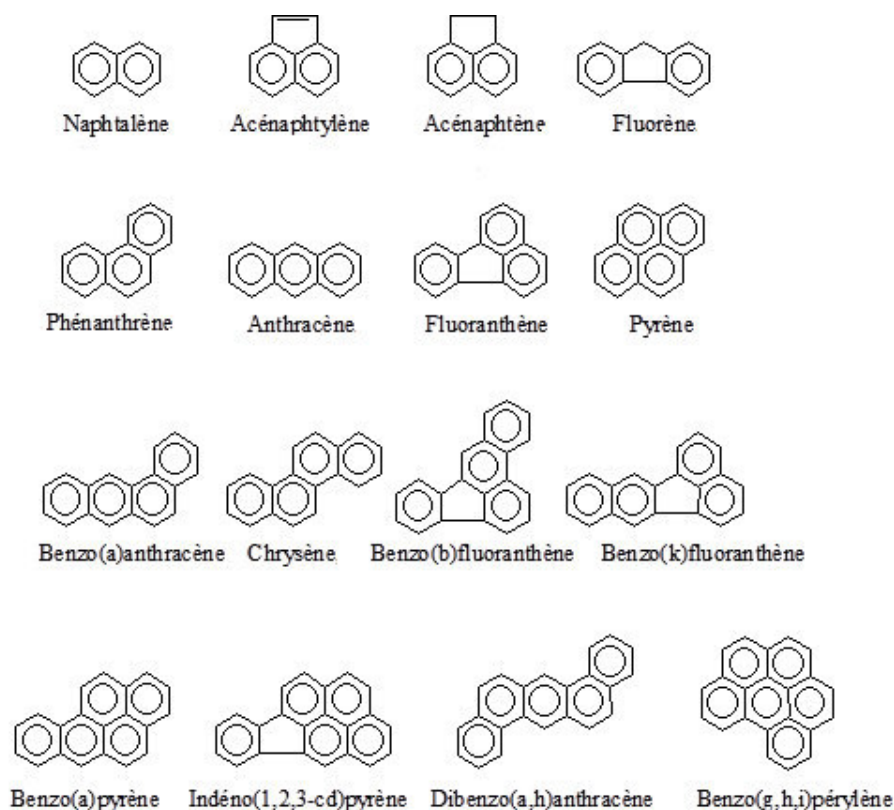


Figure 9. Structures chimiques des 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA.

La grande variété de HAP conduit à des masses molaires tout aussi variables, qui vont de 128 g/mol pour la forme la plus légère ($C_{10}H_8$) à 1792 g/mol pour la plus lourde ($C_{144}H_{64}$). Ils peuvent être classés selon le nombre de cycles formant leur structure chimique. Les HAP dits « légers » peuvent comporter jusqu'à 3 cycles alors que les HAP dits « lourds » possèdent plus de 3 cycles. La solubilité dans l'eau des HAP est inversement proportionnelle au nombre de cycles que comporte la molécule. Elle est donc faible pour les HAP légers (de 1 à 30 mg/L) à très faible pour les HAP les plus lourds (de 1 μ g/L à 1 mg/L). Ainsi dans les environnements aquatiques, les HAP vont généralement avoir tendance à s'adsorber sur les particules en suspension et la matière organique. Les autres caractéristiques physico-chimiques des HAP sont des points de fusion et d'ébullition élevés et une faible pression de vapeur (entre 10 et 10^{-10} Pa) qui explique la présence de nombreux HAP dans l'atmosphère sous forme gazeuse et particulaire. La pression de vapeur est inversement proportionnelle au nombre de cycles que comporte la molécule. Tous les HAP composés de 5 cycles ou plus sont liés aux particules tandis que les HAP avec 3 cycles ou moins sont majoritairement présents sous forme gazeuse. Les valeurs de log de Kow sont comprises entre 3 et 7 (non polaires à apolaires) pour les HAP les plus courants. Ils sont donc considérés comme fortement lipophiles et sont majoritairement retrouvés adsorbés à la matière organique dans l'eau, les sédiments et le sol.

1.3.5.2. Sources et utilisations

Un nombre important de HAP peuvent être formés et rejetés au cours de différents processus de combustion et de pyrolyse. Les sources naturelles et anthropogéniques de HAP sont nombreuses. Les HAP sont souvent classés selon deux types :

- Les HAP pétrogéniques : correspondent aux hydrocarbures présents dans les produits bruts pétroliers
- Les HAP pyrogéniques : correspondent aux hydrocarbures produits lors de la combustion de matière organique (bois, combustibles fossiles, etc.).

Peu d'informations sont disponibles sur la production industrielle et la fabrication de HAP. Seules des faibles quantités seraient libérées par le biais de ces activités en comparaison avec la libération de HAP due à des processus de combustions incomplètes. Les HAP sont libérés majoritairement suite à des phénomènes de pyrolyse, pyrosynthèse et combustion de la matière organique. Les principales sources naturelles de HAP sont les feux de forêt et

l'activité volcanique. Les principales sources anthropiques sont la combustion résidentielle de bois de chauffe, pétrole, gaz et charbon, les transports (voitures, avions, trains, bateaux, etc.) mais aussi la production d'électricité industrielle (centrales thermiques), l'incinération, la production de métaux (aluminium, fer et acier), le raffinage des hydrocarbures, et également la production d'asphalte, de goudron, de houille et de coke. Industriellement, les HAP peuvent être utilisés comme produits intermédiaires dans la fabrication de PVC (chlorure de polyvinyle) et de plastifiants (naphtalène), mais aussi de pesticides (phénanthrène), de colorants (l'antracène, le fluoranthène) et de pigments (l'acénaphène, le pyrène).

La multiplicité des sources de HAP est à l'origine d'une présence ubiquitaire dans l'environnement (air, eau et sol). Cette origine multiple rend également difficile l'estimation des émissions de HAP (European Food Safety Authority, 2008). Jusqu'ici environ 500 HAP ont été détectés dans l'air. Les émissions anthropiques de HAP dans l'environnement ont fortement augmenté durant les dernières décennies. A titre d'exemple, les quantités émises dans l'atmosphère sont passées de 50 000 tonnes en 1987 à plus de 500 000 tonnes en 2004 (Eisler, 1987; Zhang and Tao, 2009). Les HAP font partie des composés dont la surveillance est accrue notamment dans l'eau où des normes de qualités environnementales (EQS) ont été fixées dans le cadre de la DCE (European Commission, 2013; European Commission, 2008).

1.3.5.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne

La plupart des travaux concernant les HAP se sont intéressés à leur propriétés cancérigènes, immunotoxiques et reprotoxiques (Hertz-Picciotto *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012; Reynaud and Deschaux, 2006; Rocha Monteiro *et al.*, 2000; Santodonato, 1997; Vinggaard *et al.*, 2000; Wester *et al.*, 2012; White, 1986). Peu d'études ont été entreprises pour étudier les effets de ces composés sur la fonction thyroïdienne.

Les quelques études chez l'Homme ont relevé principalement des perturbations de l'homéostasie. Ainsi, dans une étude sur une population de 480 hommes adultes chinois portant sur des métabolites de HAP mesurés dans l'urine, une corrélation positive entre les concentrations de 2-hydroxyfluorène et les concentrations sériques de TSH a été mise en évidence (Zhu *et al.*, 2009). Toutefois, aucune altération des niveaux de T4 et T3 n'a été remarquée.

Il semblerait que les effets des HAP sur le système thyroïdien des rats n'aient été que très peu investigués. Toutefois, lors d'un test *in vitro* basé sur la mise en évidence du potentiel

d'activité pour le récepteur thyroïdien TR β (TR-CALUX) mais également pour un des transporteurs des hormones thyroïdiennes, la TTR (TTR-binding), 25 métabolites de HAP (hydroxyde, cétone et quinone) ont été testés (Bekki *et al.*, 2009). Sept d'entre eux ont révélé un potentiel d'activité pour le TR β . Les HAP hydroxylés et quinones ont montré une forte activité lors du test TTR-binding. Suite à ces résultats, les auteurs de cette étude ont suggéré que les métabolites de HAP pourraient avoir une activité toxique chez les animaux.

Chez les téléostéens comme chez d'autres espèces animales sauvages, les quelques études existantes permettent de mettre en évidence des relations entre exposition et perturbation du système thyroïdien notamment de l'homéostasie (Brown *et al.*, 2004; Rolland, 2000). Lors d'une importante étude menée dans le but de mettre en évidence des relations entre perturbation de la thyroïde et niveau de contaminants chez différentes espèces de poissons de la baie de San Francisco, Brar *et al.* (2010) n'ont observé que de faibles associations entre les niveaux de HAP et de HT. Chez les perches (*Cymatogaster aggregata*), aucune association avec la T4 ou le ratio T3/T4 n'a été relevée pour la concentration de HAP détectés dans le foie. Seuls 3 HAP (acénaphène, fluorène et phénanthrène) étaient positivement corrélés avec la T3. Chez l'autre espèce investiguée, les chabots (*Leptocottus armatus*), les niveaux de T3 et le ratio T3/T4 étaient positivement corrélés aux concentrations de HAP alors qu'une corrélation négative était trouvée pour la T4 avec un HAP (acénaphène) et une positive avec le pyrène. Lors d'une exposition de cinq jours au pyrène (0,5-50 nmol/L) des embryons de *Sebastes marmoratus*, une diminution de la concentration en T3 mais également de l'expression génétique des TR a pu être observée ainsi que de nombreuses perturbations génétiques notamment des gènes codant pour la désiodase, la TTR ou encore la thyroglobuline (He *et al.*, 2012). Suite à injection d'un mélange de HAP chez le molly amazonne (*Poecilia formosa*), la prolifération accrue de tissu thyroïdien au niveau pharyngal et de manière ectopique au niveau de la rate a été stimulée (Woodhead *et al.*, 1982).

Des études ont été menées chez les oiseaux, notamment afin d'estimer les dommages suite à des expositions aux hydrocarbures (Albers, 2006). Chez deux espèces d'oiseaux de mer (goéland argenté et guillemots à miroir) ayant été exposées à une unique dose orale de pétrole brute, une augmentation plasmatique de la T4 a été constatée durant les semaines suivantes (Peakall *et al.*, 1981). Gentes *et al.* (2007) ont observé chez des hirondelles (*Tachycineta bicolor*), provenant de sites à proximité d'exploitation de sables bitumeux au Canada, une augmentation des concentrations de T3 et T4 dans la glande thyroïde.

I.3.6. Le bisphénol A (BPA)

I.3.6.1. Structure et propriétés physico-chimiques

Le bisphénol A ou 4,4'-dihydroxy-2,2-diphénylpropane ou 2,2-bis(4-hydroxyphényl)propane est un composé organique synthétique contenant deux groupements fonctionnels phénols dont il tire son nom. La Figure 10 représente la structure du BPA et le Tableau 6 présente les principales caractéristiques physico-chimiques du BPA.

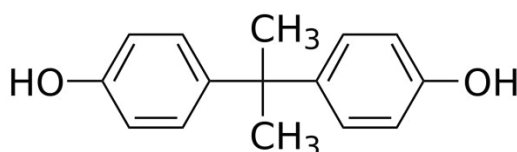


Figure 10. Structure chimique du bisphénol A

La bonne réactivité du BPA est due à la présence des groupements hydroxyles sur sa structure. Comme les autres phénols, le BPA peut être converti en esters, éthers mais aussi en sels. De plus, il peut également subir des substitutions électrophiles impliquant alkylation, sulfonation ou nitration (Flint *et al.*, 2012; Vandenberg *et al.*, 2007). Le BPA est peu soluble dans l'eau et sa volatilité est faible (Staples *et al.*, 1998). Les principales propriétés physico-chimiques du BPA sont présentées Tableau 6.

Tableau 6. Principales propriétés physico-chimiques du BPA

Propriétés physico-chimiques	
Formule chimique	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Poids moléculaire (g/mol)	228,287
Point de fusion (°C)	158-159
Point d'ébullition (°C) à 5 hPa	220
Pression de vapeur (Pa) à 25°C	9,7.10 ⁻⁵
Log Kow	3,32
Solubilité (mg/L) à 25°C	120-300

1.3.6.2. Sources et utilisations

Le BPA a été synthétisé pour la première fois en 1891 par le chimiste russe Alexander P. Dianin. Sa synthèse repose sur la condensation de deux molécules de phénol en présence d'acétone aidée par un catalyseur (*e.g.* chlorure d'hydrogène ou une résine échangeuse d'ions). Le BPA figure parmi les composés chimiques les plus produits et utilisés dans le monde. Sa production continuerait d'augmenter. En 2003, elle excédait les 2,7 millions de tonnes (Vandenberg *et al.*, 2007) et aurait plus que doublée en 2011, pour atteindre 5,5 millions de tonnes (Rochester, 2013). Le BPA est principalement utilisé (95 %) dans la production de polymères synthétiques tels que les polycarbonates ou encore les résines époxydes (Flint *et al.*, 2012). Il est ainsi la matière de base de 71 % des polycarbonates et 27 % des résines époxydes (Fernandez *et al.*, 2007). Le BPA confère à ces polymères synthétiques de bonnes propriétés mécaniques, une stabilité thermique et une faible adsorption de l'humidité. Ils sont donc utilisés dans une grande variété de produits dont notamment les produits dentaires, les équipements médicaux, les conduites d'eau, les bouteilles plastiques, les jouets, les récipients/emballages alimentaires, les tétines de biberons, les appareils électroniques et les disques type CD ou DVD (Huang *et al.*, 2012). Le BPA est également largement utilisé dans la production d'autres polymères tels que les polyacrylates et les polyesters mais aussi dans les revêtements de boîtes de conserves qui après dégradation peuvent être une importante source de BPA dans la nourriture et dans l'environnement (Vandenberg *et al.*, 2012). Il est également employé comme stabilisant et antioxydant lors de la production du chlorure de vinyle (Nam *et al.*, 2010), qui a son tour est utilisé pour produire un polymère connu sous le nom de PVC (polychlorure de vinyle). Le BPA est aussi un des constituants du papier thermique (Liao *et al.*, 2012; Rochester, 2013). Ce papier produit en masse à une grande diversité d'applications telles que les reçus (tickets de caisses), les livres, les fax, les étiquettes et après recyclage il permet la production de brochures, tickets, enveloppes, journaux, papiers absorbants, papiers toilettes et cartons d'emballages. La production de masse du BPA implique des émissions continues dans l'environnement lors de la production et de l'utilisation des produits dans lesquels il est incorporé. Rien que pour l'Europe, les émissions de BPA seraient de 30 tonnes dans le sol, 2,1 tonnes dans l'air et de 199 tonnes dans l'eau (Tsai, 2006). En France, le BPA est interdit depuis 2013 pour les contenants alimentaires de produits destinés aux enfants de moins de 3 ans et à compter de 2015, il sera définitivement prohibé dans tous les autres emballages alimentaires (JORF n°0300 du 26 décembre 2012, p20395 texte n° 2).

Le BPA a également eu une utilisation médicale comme œstrogène synthétique dans les années 30 mais son utilisation a été abandonnée à la fin des années 40 en faveur du diéthylstilbestrol (DES) (Rubin and Soto, 2009). Ce remplacement s'expliquant par des tests montrant que le DES était un œstrogène bien plus puissant que le BPA (Dodds and Lawson, 1936).

1.3.6.3. Toxicité et perturbations de la fonction thyroïdienne

Le BPA est un xénoestrogène *i.e.* un composé qui perturbe le système endocrinien (Flint *et al.*, 2012; Vandenberg *et al.*, 2007). Un nombre important d'études a été publié sur les effets du BPA chez l'Homme et lors d'expérimentations sur des animaux de laboratoire (Fujimoto *et al.*, 2006; Rochester, 2013; Rubin and Soto, 2009; Vandenberg *et al.*, 2012; Vom Saal and Hughes, 2005; Willhite *et al.*, 2008). Les effets sur la faune ont été moins étudiés (Flint *et al.*, 2012). Outre son activité oestrogénique, le BPA pourrait se fixer aux TR et agir comme un antagoniste en inhibant l'activité de transcription normalement induite par les HT (Moriyama *et al.*, 2002; Zoeller, 2005).

Meeker *et al.* (2009) ont mesuré les concentrations de BPA dans l'urine de 167 hommes infertiles (<0,4-36,4 ng/mL) et ont mis en évidence une association entre le niveau de BPA et une diminution de la TSH. Au cours d'une deuxième étude portant cette fois sur une plus large population comprenant plus de 1346 adultes et 329 adolescents, le BPA était corrélé négativement avec la concentration de T4 totale, ce qui suggère également une corrélation négative avec la TSH (Meeker and Ferguson, 2011). Ces effets ont été relevés uniquement chez l'adulte. Des concentrations urinaires élevées en BPA chez 3394 chinois âgés de plus de 40 ans ont été associées à des augmentations de T3 libre et TSH sérique (Wang *et al.*, 2013). Les auteurs ont également constaté une augmentation de la fonction thyroïdienne (hyperthyroïdie) en lien avec les taux de BPA. Une association entre une exposition au BPA et une augmentation du poids du corps en lien avec une augmentation de l'activité thyroïdienne a également été constatée chez l'Homme (Mansourian, 2010). Afin d'évaluer les possibles perturbations du développement en lien avec la fonction thyroïdienne, des études ont été réalisées chez le nouveau-né. Récemment une association forte entre les concentrations urinaires en BPA et une perturbation de la fonction thyroïdienne chez les nouveaux-nés a été trouvée. Une population de 476 femmes enceintes a été examinée par Chevrier *et al.* (2013) dans le cadre d'une vaste étude (CHAMACOS (Center for the Health Assessment of Mothers and Children of Salinas)). Les résultats de celle-ci montrent qu'une

exposition au BPA durant la grossesse est associée à une réduction de la T4 totale chez la mère et une diminution de la TSH chez les fœtus de sexe masculin. Cette corrélation BPA et TSH était très forte durant le troisième trimestre de grossesse qui correspond à une période sensible du développement du fœtus (Chevrier *et al.*, 2013).

Une étude *in vivo* a montré que les rats juvéniles dont les mères ont été exposées au BPA (1-50 mg/kg/J) durant la gestation et la lactation ont des concentrations en T4 plus élevées. Un effet antagoniste de l'expression d'un gène sensible aux HT (RC3/neurogranine) dans le cerveau des rats a également été constaté (Zoeller *et al.*, 2005). Xu *et al.* (2007) ont exposé des femelles gestantes à du BPA dans l'eau de boisson (0,1 mg/L) durant la gestation et l'allaitement. Les résultats ont montré une diminution de la T4 libre chez les femelles durant l'allaitement et une augmentation de cette hormone chez les juvéniles. Selon les auteurs, un système de compensation des faibles niveaux de T4 chez les mères pourrait expliquer la hausse chez les juvéniles.

Chez le poisson zèbre, Gentilcore *et al.* (2013) ont constaté qu'une faible dose (10^{-9} M) de BPA entraîne une altération des facteurs de transcriptions spécifiques à la thyroïde mais également affecte les cellules des follicules thyroïdiens, et plus précisément la transcription des gènes spécifiques à la synthèse des HT. Pour une dose similaire mais cette fois sur des cellules de reins de singe (CV-1), le BPA a annihilé la transcription de gènes spécifiques des TR (Sheng *et al.*, 2012). Pour les auteurs, le mécanisme d'action serait non-génomique.

Chez les amphibiens, les œufs et les larves sont considérés comme particulièrement sensibles à une exposition au BPA (Iwamuro *et al.*, 2003). Par ailleurs, Hayes *et al.* (2002) ont suggéré que les perturbateurs endocriniens tels que le BPA pourraient jouer un rôle dans le déclin des amphibiens. En effet, ceux-ci ont la peau très perméable et évoluent en environnement aquatique durant tous les stades de développement contrôlés par le système endocrinien. Ainsi chez *Xenopus tropicalis*, le BPA a inhibé la métamorphose spontanée après neuf jours d'exposition à des concentrations de 2,28 mg/L (Kashiwagi *et al.*, 2008). Étant donné que la métamorphose est contrôlée par les hormones thyroïdiennes, le BPA pourrait agir comme un antagoniste des HT (Kashiwagi *et al.*, 2008). Néanmoins dans une autre étude sur des larves de *Xenopus laevis*, aucun effet n'a été constaté (0,93 à 4971 µg de BPA/L durant 90 jours) (Pickford *et al.*, 2003).

I.4. Un site d'étude : l'estuaire de la Loire

Il est des territoires aux enjeux écologique, économique et social importants. L'estuaire est un milieu riche et complexe et parce qu'il est souvent fortement anthropisé, il est aussi particulièrement vulnérable.

I.4.1. Les estuaires : généralités

Deux phénomènes peuvent caractériser un estuaire. Dans cette zone où eaux douces et eaux salées se mêlent, deux fois par jour les eaux coulent vers l'amont et ces eaux peuvent au cours de certaines périodes devenir fortement turbides. La salinité, la taille de la zone intertidale (zone de balancement des marées) et la turbidité (teneur de l'eau en particules en suspension) sont des paramètres permettant de définir et de classer les estuaires. D'un point de vue étymologique, l'estuaire vient du latin *aestuarium*, de *aestus* qui signifie mouvement des flots. Un des grands spécialiste des estuaires, Donald W. Pritchard (1967), les définissait ainsi : un estuaire est constitué par une masse d'eau confinée ayant une connexion libre avec la mer ouverte et à l'intérieur duquel l'eau de mer est diluée d'une façon mesurable avec de l'eau douce issue du drainage du bassin versant.

La France compte un grand nombre d'estuaires ou de systèmes estuariens sur sa façade ouest. Les fleuves de la façade Méditerranéenne ne sont pas soumis à des marées importantes et n'entrent donc pas dans la notion d'estuaire, ils correspondent à des deltas. Chaque estuaire possède ses propres caractéristiques morpho-dynamiques dépendantes de certains paramètres tels que la zone géologique de sa situation, les aménagements effectués (barrages, dragages, drainages, etc.) ou encore son bassin versant (taille, caractéristiques géologiques et hydrologiques). Sa fonction de recueil des eaux douces du bassin versant ainsi que sa position particulière à l'interface du milieu océanique et du milieu continental font que l'estuaire constitue un réceptacle des « déchets » d'une grande partie des activités anthropiques. Il constitue donc une zone importante d'apport des contaminants à la mer mais aussi, de par ses caractéristiques biologiques et hydrosédimentologiques, de stockage de ces contaminants. Le système estuarien est donc, pour ces raisons, un milieu particulièrement sensible et vulnérable. Il est donc nécessaire de développer une gestion et un suivi efficace notamment en termes de contamination de ce système afin de le protéger.

I.4.2. L'estuaire de la Loire

I.4.2.1. La Loire et son estuaire

L'estuaire de la Loire (60 km²) est le deuxième des trois grands estuaires français en termes de surface après la Gironde (625 km²) et devant la Seine (50 km²). Il est l'aboutissement d'un fleuve qui lui a donné son nom. Ce fleuve, la Loire, est le cours d'eau le plus long de France et un des dix plus grands fleuves d'Europe. Elle s'étend sur plus de 1000 km de sa source au Mont Gerbier de Jonc en Ardèche (nord-ouest du Massif central), en passant par le bassin Parisien avant de rejoindre l'Océan Atlantique au niveau de Saint Nazaire (Loire Atlantique) (Figure 11). Son bassin versant draine les eaux sur une surface d'environ 117 000 km² ce qui représente 20 % de la superficie totale de la France (Figure 11).

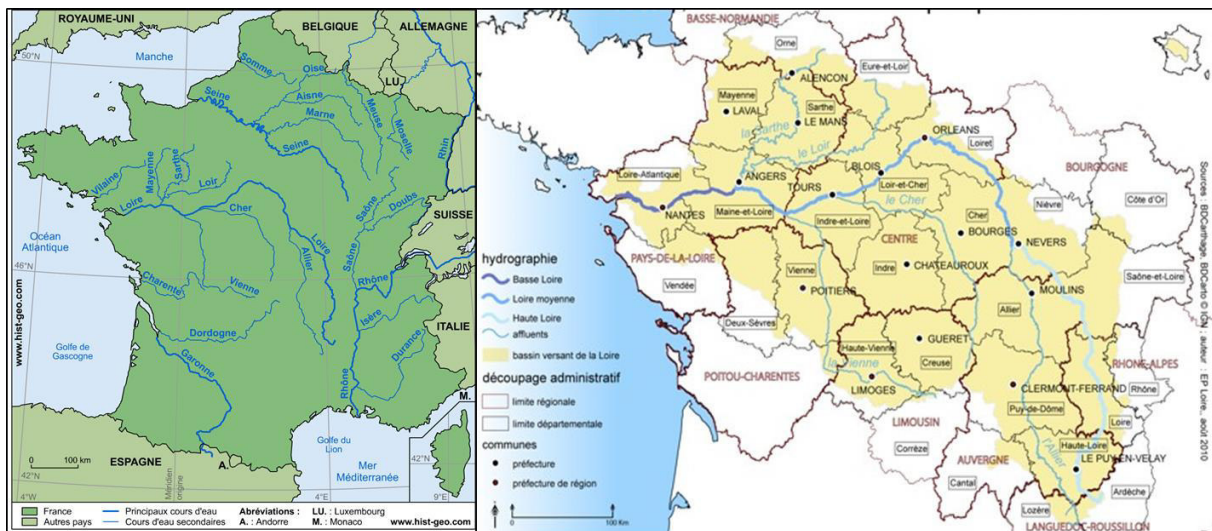


Figure 11 : Principaux cours d'eau fluviaux de France et bassin versant de la Loire

Une des particularités de la Loire est l'absence de barrières (digues, barrages, etc.) sur le cours principal, permettant ainsi la libre migration des poissons d'amont vers l'aval et inversement (Lasne and Laffaille, 2008). C'est une des raisons pour lesquelles, l'IUCN (International Union for Conservation of Nature) considère la Loire comme l'un des derniers fleuves sauvages d'Europe (<http://www.uicn.org>).

L'estuaire de la Loire s'étend sur 100 km de Saint Nazaire à Varades (limite de la marée dynamique) (Figure 12). Sa limite en amont étant sujette à controverse, on trouve parfois indiqué Ancenis. Le débit moyen de l'estuaire est de 850 m³/s (Dauvin, 2008), avec des maxima d'environ 5000 m³/s généralement en période hivernale. La crue la plus importante

connue est celle de 1910 durant laquelle un débit de 6400 m³/s a été enregistré. Le débit d'étiage est lui compris entre 80 et 300 m³/s (<http://www.loire-estuaire.org>).

Les pressions urbaines, agricoles, industrielles, portuaires et les phénomènes hydrodynamiques et biologiques dans l'estuaire (bouchon vaseux, marées, étiage) participent à l'apport mais aussi à la concentration des polluants.



Figure 12. L'estuaire de la Loire

1.4.2.2. Quelques caractéristiques physico-chimiques

La Loire est un des fleuves les plus eutrophes d'Europe (Moatar and Meybeck, 2005). Dans l'estuaire, l'influence des marées est faible comparé à l'estuaire de la Gironde ; le temps de résidence des eaux ainsi que les matières en suspension totales y sont également moins importants (Etcheber *et al.*, 2007). Le temps de résidence des eaux douces dans l'estuaire varie de 3 jours en période de fort débit à 30 jours durant les périodes de faible débit (Guillaud *et al.*, 2008). De plus, en période estivale, la réduction de l'oxygène y est rapide et particulièrement importante (Thouvenin *et al.*, 1994). La remise en suspension des vases anoxiques durant les marées de printemps, apparaît comme étant une des raisons principales de cette hypoxie (Abril *et al.*, 2003). La présence du bouchon vaseux est un phénomène naturel des grands estuaires macrotidaux. La masse de ce bouchon, qui peut représenter de 1 à 3 ans d'apports de sédiments par le fleuve (Romaña, 1994), varie entre 800 000 et 1 000 000 de tonnes. Il joue un rôle fondamental dans une éventuelle dégradation de la qualité du milieu aquatique notamment car les micropolluants adsorbés sur les sédiments viennent s'y accumuler (Romaña, 1994).

La structure de l'estuaire a été largement modifiée au cours des deux derniers siècles (drainage des marais, construction de digues, de chenal). Toutes ces modifications ont contribué à favoriser l'intrusion des marais nécessaires au chenalage des bateaux plus loin dans l'estuaire. Elles ont aussi favorisé la montée du front de salinité dans l'estuaire dont la limite se trouve actuellement quelques kilomètres en amont de Nantes. Les activités portuaires nécessitent des opérations de dragage régulières, nécessaires pour maintenir un tirant d'eau permettant la navigation dans l'estuaire. Ces dragages font l'objet de suivis environnementaux car ils participent à la remise en suspension des sédiments sur lesquels sont adsorbés des polluants.

1.4.2.3. Les activités humaines

L'estuaire est caractérisé par une forte pression anthropique. L'estuaire contribue au développement économique du territoire axé notamment autour de l'activité portuaire. Le port maritime de Nantes - Saint-Nazaire est ainsi le 4^{ème} port français et le premier de la façade atlantique en termes d'activités portuaires (27,7 Mt en 2013). Quelques kilomètres en amont après Saint-Nazaire et ses chantiers navals (STX France) sont implantés la deuxième plus grande raffinerie (Total) de France et des terminaux méthaniers (GDF-Suez). A proximité, se trouve le 3^{ème} pôle européen de l'avionneur EADS-Airbus. Entre Nantes et Saint-Nazaire, la centrale de Cordemais, plus gros site thermique à flamme (fioul/charbon) français d'EDF, produit environ 25 % de l'électricité de la région. Cet aperçu non exhaustif des activités majeures montre que tout un tissu économique est lié à l'estuaire.

L'attractivité de ce territoire le soumet également à une pression urbaine qui est relativement importante aux abords de l'estuaire puisque la population dépasse les 850 000 habitants, avec notamment deux agglomérations majeures, Nantes (554 000 habitants) et dans une moindre mesure Saint-Nazaire (115 000 habitants). Le gradient spatial de population et d'activités anthropogéniques est une des caractéristiques de la Loire. Celui-ci étant fort dans la partie ouest du fleuve, dont fait partie l'estuaire, mais aussi le long du cours principal (densité supérieure à 120 habitants/km²) et plutôt faible dans la partie aval du bassin (densité d'environ 20 habitants/km²) (Grosbois *et al.*, 2012). La proximité du littoral soumet également le territoire à de fortes pressions démographiques notamment durant la période estivale.

La présence de l'estuaire permet également la production d'eau potable. Plus de 30 millions de m³ sont ainsi prélevés chaque année rien que pour alimenter la métropole de Nantes et les communes environnantes.

Autres consommatrices d'eau, l'agriculture est très présente dans l'estuaire. L'élevage de bovins constitue l'essentiel des exploitations (93% des surfaces agricoles de l'estuaire). Une activité maraîchère intensive est également présente en amont de Nantes.

Enfin, les activités de pêches dans l'estuaire sont en diminution notamment à cause des contraintes sur la pêche à la civelle. Moins de 400 pêcheurs professionnels maritimes ou fluviaux (à temps complet ou partiel) exploitent les eaux de l'estuaire.

1.4.2.4. Des espaces naturels

L'estuaire est une zone humide majeure qui comprend une diversité importante de milieux (aquatique, roselière, prairie humide, bocage, etc) et d'espèces (faune et flore). Il constitue un axe migratoire, d'hivernage, ou de reproduction pour des milliers d'oiseaux. Il a également une fonction nourricière pour les poissons marins, contribuant ainsi à la richesse halieutique du golfe de Gascogne et il constitue un axe migratoire majeur pour les poissons amphihalins tel que les saumons, les lamproies, les aloses ou encore les anguilles. De nombreuses mesures de préservation du territoire et de la biodiversité sont en cours (zone Natura 2000, ZNIEFF, ZICO, etc.).

Dans le but de concilier développement économique, urbain, touristique, plusieurs organismes publics travaillent à une préservation et un aménagement durable de l'estuaire. Parmi eux, le groupement d'intérêt public (GIP) Loire Estuaire assure des missions d'observation et de communication (*e.g.* cahier indicateurs ou le réseau de mesures SYVEL (SYstème de Veille dans l'Estuaire de la Loire)) mais participe également à des actions de gestion et de suivi de l'estuaire et des zones environnantes (*e.g.* schéma d'aménagement et de gestion des eaux, maintien des vasières). Le GIP compile notamment un ensemble de données (*e.g.* physico-chimiques, hydrodynamiques, sociales et économiques) ouvert au public et accessible par le biais de leur site internet (<http://www.loire-estuaire.org>).

I.5. L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) : une espèce sentinelle

L'anguille a depuis des siècles fait l'objet d'une certaine fascination par les Hommes. Aristote (350 av. J-C.), dans son ouvrage intitulé *Historia animalium*, consigna ses premières observations concernant le mode de vie de ce poisson, en pointant notamment « ...*les anguilles n'ont pas de sexe et n'engendre pas...* ». Elles proviennent des vers, nommés entrailles de la terre qui eux-mêmes se forment dans la vase et la terre humide. Elles naissent également dans les mers et rivières, dans les lieux où la putréfaction est abondante. Objet de nombreuses légendes, l'anguille reste à ce jour encore mystérieuse notamment sur ces habitudes de reproduction puisque encore aujourd'hui aucun frai n'a pu être observé dans la nature.

I.5.1.1. Description de l'anguille européenne

Les anguilles sont des poissons téléostéens faisant partie de l'ordre des Anguilliformes, de la famille des Anguillidae qui ne comporte qu'un unique genre : *Anguilla* (Figure 13).

Nom latin :	<i>Anguilla anguilla</i>
Nom commun :	Anguille européenne ou anguille d'Europe
Age :	jusqu'à 25 ans (88 ans max)
Poids :	Jusqu'à 4kg (6,6kg max)
Taille :	jusqu'à 1m (1,33m max)
Régime alimentaire :	prédateur carnivore et nécrophage
Caractéristiques diverses :	amphihalin, thalassotoque
Classification biologique :	
Règne	<i>Animalia</i>
Embranchement	<i>Chordata</i>
Sous-embranchement	<i>Vertebrata</i>
Super-classe	<i>Osteichthyes</i>
Classe	<i>Actinopterygii</i>
Sous-classe	<i>Neopterygii</i>
Infra-classe	<i>Teleostei</i>
Super-ordre	<i>Elopomorpha</i>
Ordre	<i>Anguilliformes</i>
Sous-ordre	<i>Anguilloidei</i>
Genre	<i>Anguillidae</i>
Espèce	<i>Anguilla</i>

Figure 13. Caractéristiques et classification biologique de l'anguille européenne (fishbase.org et migrateur-loire.fr)

Le genre *Anguilla* compte 15 espèces dont la répartition s'étend dans tous les océans du monde, excepté l'atlantique sud (Ege, 1939; Tsukamoto and Aoyama, 1998) (Tableau 7). Parmi les 15 espèces d'anguilles, deux sont présentes dans l'atlantique nord : l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758) et l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*, Lesueur 1821). Bien que ces deux espèces soient extrêmement proches génétiquement, l'anguille américaine se distingue de sa cousine européenne par un nombre supérieur de vertèbres ainsi qu'un stade larvaire plus long.

Tableau 7. Les 15 espèces du genre *Anguilla*

Répartition	Nom latin	Auteur	Année
Régions tempérées et subtropicales	<i>Anguilla anguilla</i>	Linnaeus	1758
	<i>Anguilla rostrata</i>	Lesueur	1821
	<i>Anguilla japonica</i>	Temminck & Schlegel	1847
	<i>Anguilla Australis</i>	Richardson	1841
	<i>Anguilla dieffenbachii</i>	Gray	1842
Régions intertropicales	<i>Anguilla bengalensis bengalensis</i>	Gray	1831
	<i>Anguilla bengalensis labiata</i>	Peters	1852
	<i>Anguilla bicolor bicolor</i>	McClelland	1844
	<i>Anguilla bicolor pacifica</i>	Schmidt	1928
	<i>Anguilla celebesensis</i>	Kaup	1856
	<i>Anguilla interioris</i>	Whitley	1938
	<i>Anguilla malgumora</i>	Kaup	1856
	<i>Anguilla marmorata</i>	Quoy & Gaimard	1824
	<i>Anguilla megastoma</i>	Kaup	1856
	<i>Anguilla mossambica</i>	Peters	1852
	<i>Anguilla nebulosa</i>	McClelland	1844
	<i>Anguilla obscura</i>	Günther	1872
	<i>Anguilla reinhardtii</i>	Steindachner	1876

I.5.2. Cycle de vie de l'anguille européenne

L'anguille est un poisson thalassotoque à migration génésique catadrome. Le cycle de vie de l'anguille européenne est composé de différents stades au cours desquels elle effectue deux migrations transocéaniques évoluant donc alternativement en mer et en eau douce (Figure 14).

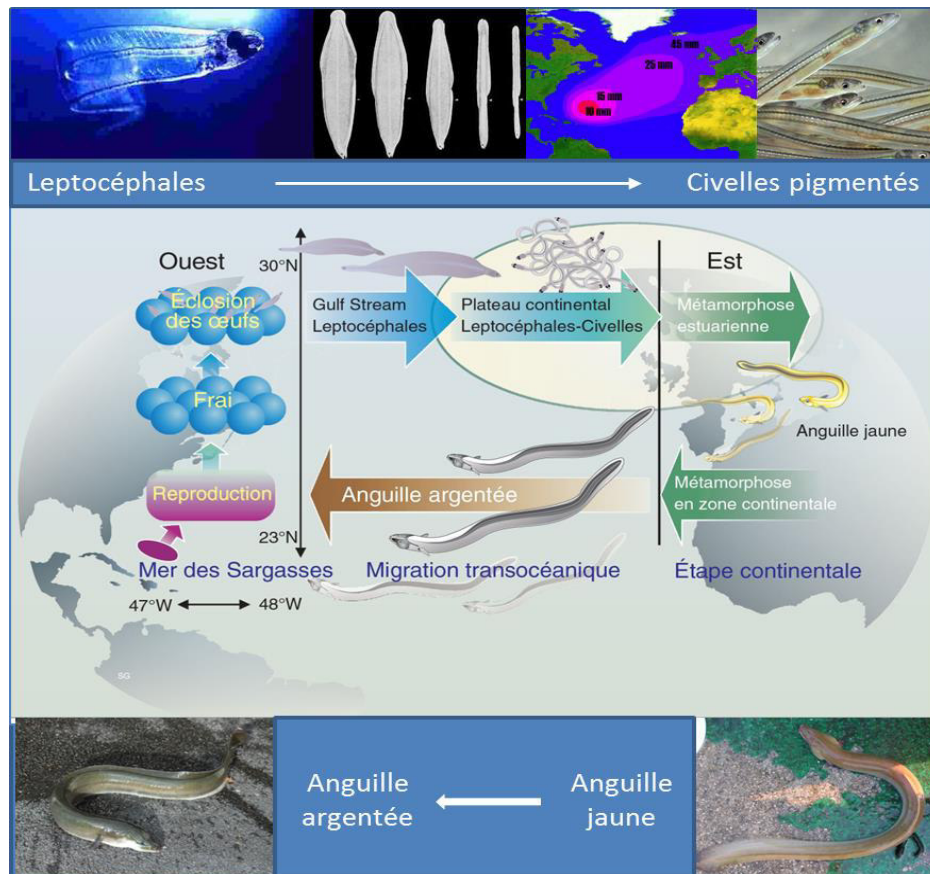


Figure 14. Cycle de vie de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*)

L'aire de ponte est localisée en mer des Sargasse dans le sud-est de la Floride (Schmidt, 1923). La ponte aurait lieu de mars à juillet dans ces eaux chaudes à une profondeur d'environ 400 mètres (Feunteun, 2002). A ce jour, aucune ponte n'a été observée et des incertitudes demeurent sur les conditions de reproduction des anguilles (lieux, profondeur, etc.). La fécondité des femelles serait comprise entre 0,7 et 2,6 millions d'œufs pour des femelles mesurant entre 630 mm et 790 mm, soit environ 1 million d'œufs par kg de reproducteur (Boëtius and Boëtius, 1980). Durant chacune de ces migrations, l'anguille peut parcourir de 6000 à 8000 km. L'anguille figure donc parmi les poissons amphihalins parcourant les plus grandes distances. Les larves nommées leptocéphales vivent des mois en mer avant de rejoindre le talus continental. Là, elles vont se métamorphoser en civelles. Ces dernières vont alors rejoindre les estuaires puis coloniser les cours d'eau où elles vont poursuivre leur

croissance pour devenir des anguilles jaunes (anguilles sexuellement immatures). Après des années passées en eau douce (entre 5 et 20 ans), les anguilles jaunes vont se métamorphoser en anguilles argentées ou dévalantes (anguilles sexuellement matures)(Tesch, 2003). Celles-ci vont retourner en mer (dévalaison), puis migrer vers le site de ponte tout en continuant la métamorphose. Une fois le site de ponte atteint, elles vont frayer puis mourir. Ce mode de reproduction est caractéristique des espèces qualifiées de sémelpares. Le cycle biologique de l'anguille est donc relativement long et complexe.

I.5.3. Aire de distribution de l'anguille européenne

L'anguille européenne possède une vaste aire de distribution (Figure 15). Elle est ainsi retrouvée sur une zone qui s'étend du cap Nord en Norvège septentrionale jusqu'au sud des côtes européennes mais également au nord du continent africain, dans tout le bassin méditerranéen mais aussi en Islande (van Ginneken and Maes, 2005). Les îles de Madère, des Açores et des Canaries sont également incluses dans cette distribution (Tesch, 2003).

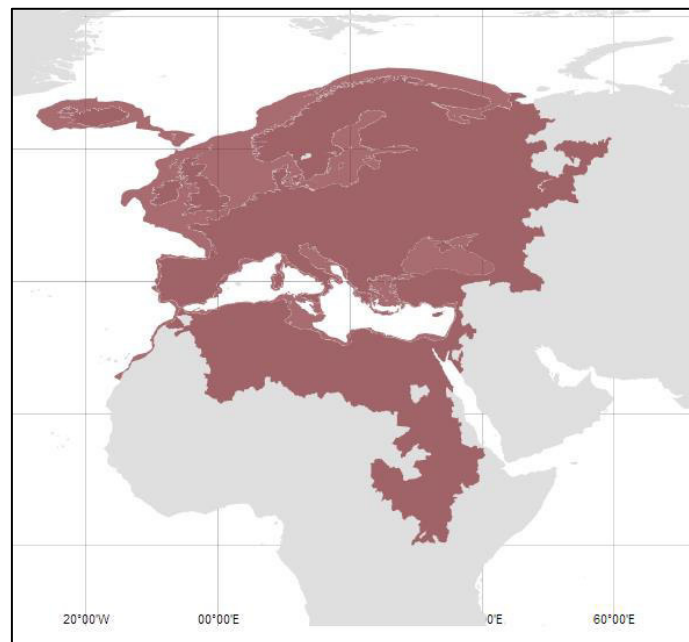


Figure 15 Aire de distribution de l'anguille européenne (FAO, 2014)

I.5.4. Intérêt écologique et économique de l'anguille européenne

Comme toutes les espèces au sein d'un écosystème, l'anguille est l'un des maillons essentiels. Vieille de plus de 100 millions d'année, date des plus anciens fossiles retrouvés au Liban et dans le sud de la France, elle a su évoluer et pourtant aujourd'hui se pose la question de sa potentielle disparition. La population d'anguilles chute depuis les dernières décennies et le recrutement des civelles en Europe montre lui aussi un fort déclin depuis les années 80 (ICES, 2013). Selon l'ICES (International Council for the Exploration of the Sea/Conseil international pour l'exploration de la mer), depuis les années 1950, la population d'anguilles est en forte diminution et continue de décliner même si depuis 2012, le recrutement des civelles a légèrement augmenté (ICES, 2013). L'anguille européenne est inscrite depuis juin 2007 dans la liste de l'Annexe II de la convention sur le commerce international des espèces de faune et de flore sauvages menacées d'extinction (Convention on International Trade of Endangered Species (CITES)). Depuis septembre 2008, elle figure également sur la liste rouge de l'UICN où elle est répertoriée comme espèce en danger critique. Des mesures de protection de l'espèce ont également été introduites en Europe comme le règlement CE N°1100/2007 qui fixe des directives pour la protection et l'utilisation durable des stocks d'anguille (European Union, 2007). Cette réglementation a conduit en 2010 en France à un plan de gestion de l'anguille (PGA). Cette réglementation impose entre autres des baisses des quotas de pêche d'anguilles argentées mais également des mesures de repeuplement des civelles.

Bien que la raison exacte de l'effondrement de plus de 95% du stock d'anguilles n'a pas encore été exactement identifiée (Szlinder-Richert *et al.*, 2014), plusieurs causes ont été avancées (Belpaire *et al.*, 2011; Belpaire and Goemans, 2007a; Bonhommeau *et al.*, 2008; Castonguay *et al.*, 1994; Dekker, 2008; Dekker, 2003; Feunteun, 2002; Lasne and Laffaille, 2008; Moriarty and Dekker, 1997; Palstra *et al.*, 2011; Palstra *et al.*, 2007; Robinet and Feunteun, 2002; Tesch, 2003; Van Den Thillart *et al.*, 2004; Van Ginneken *et al.*, 2009; van Ginneken and Maes, 2005; van Ginneken and van den Thillart, 2000) :

- Les changements climatiques : acidification des eaux, modification des courants océaniques (Gulf Stream), modification de la température des eaux.
- La surpêche et le braconnage : principalement des civelles en France, en Espagne, au Portugal et au Royaume-Uni mais également des anguilles argentées dans toute l'Europe.

- Le parasitisme et les maladies (virus et bactéries) : le parasite *Anguillicola crassus* qui est suspecté de nuire notamment à la capacité des anguilles d'atteindre les sites de pontes ou encore mais dans une moindre mesure les virus EVE (eel virus European), EVEX (eel virus European X) et HPA (herpesvirus anguillae).
- Les obstacles à la migration sur les cours d'eau : les digues et barrages bloquent les migrations des anguilles et causent également une forte mortalité chez les anguilles dévalentes (anguilles argentées), tuées par les turbines.
- La prédation : la hausse du nombre de prédateurs tels que les cormorans.
- L'exposition à divers contaminants : l'accumulation de contaminants pourrait être un facteur dans la baisse de qualité des géniteurs potentiels, ce qui affecterait le succès de reproduction de l'espèce.

La combinaison de ces multiples causes est probablement à l'origine du déclin de l'espèce mais leur importance relative n'est pas connue.

En plus de son intérêt écologique, l'anguille constitue une importante ressource économique. Elle occupe le premier rang économique de la pêche fluviale et dégage une balance commerciale positive, malgré l'absence de circuit de valorisation. C'est un poisson très prisé notamment pour sa chair lorsqu'elle est adulte. Son exploitation par la pêche touche à tous ses stades biologiques continentaux (*e.g.* civelle, anguille jaune, anguille argentée). En France, lors de la saison 2009-2010, 3,5 tonnes de civelles ont été capturées par les presque 200 pêcheurs professionnels en eau douce (ONEMA, 2010). Dans le même temps, 37,2 tonnes de civelles ont été capturées par les quelques 600 marins pêcheurs. Cette activité représente une part importante du chiffre d'affaire des pêcheurs puisque à titre d'exemple le prix moyen de vente en 2009 était de 322 euros par kg de civelles. Concernant la pêche de l'anguille jaune et de l'argentée, pour l'année 2009, environ 157 tonnes auraient été prélevées par environ 600 pêcheurs professionnels marins et fluviaux. A cela, il faut ajouter la pêche de loisir dont les prélèvements sont difficilement estimables. Actuellement, la pêche de l'anguille argentée est interdite sur toute la façade Atlantique (secteur fluvial et maritime) mais autorisée sur la façade Méditerranéenne. A noter que la pêche professionnelle est soumise à des périodes de pêches et à un régime d'autorisation. Dans l'estuaire de la Loire, selon les données du Plan de Gestion Anguille (PGA), pour l'année 2002, il y avait environ 100 pêcheurs professionnels de civelle, 220 d'anguille jaune et 3 d'anguille argentée, pour des captures annuelles estimées à environ 3 tonnes de civelle, 31 tonnes d'anguille jaune et 50 tonnes d'anguille argentée.

La diminution des stocks (Figure 16) et les mesures de restrictions de pêche ont eu un impact sur le nombre de pêcheurs de Loire.

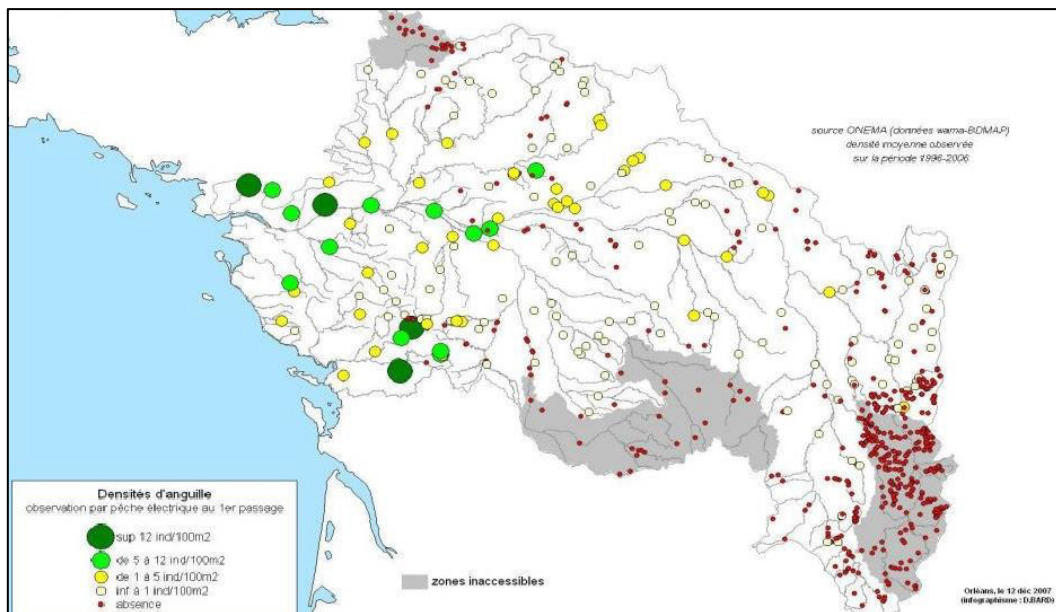


Figure 16. Répartition des densités d'anguilles sur le bassin de la Loire (source ONEMA, 2007)

I.5.5. Utilisation de l'anguille européenne en tant qu'espèce sentinelle

Dans les écosystèmes marins et d'eau douce, la contamination peut être surveillée en déterminant les contaminants présent dans l'eau, les sédiments ou dans le *biota*. Cependant, il est difficile d'analyser certains contaminants organiques (notamment les PCB, PBDE, PFAS, etc.) ayant des propriétés hydrophobes (log de Kow compris entre 5 et 7) présents dans la colonne d'eau (De Boer and Brinkman, 1994). Même si l'apport des capteurs passifs a amélioré ces estimations, la détermination des niveaux de contamination de ces composés dans les sédiments et le *biota* reste une approche intéressante. De plus, la surveillance du *biota* est une nouvelle exigence de la DCE (European Commission, 2013). L'apparition des normes de qualité environnementale spécifiques au *biota* ne fait que confirmer l'utilisation de celui-ci pour la surveillance de la qualité des eaux de surface. Des organismes bio-indicateurs tels que les crustacés (Munschy *et al.*, 2013; Ricciardi *et al.*, 2010), les bivalves (Covaci *et al.*, 2005) ou les poissons ((Bettinetti *et al.*, 2011; Blanchet-Letrouvé *et al.*, 2014; Bodin *et al.*, 2014; Macgregor *et al.*, 2010; Roosens *et al.*, 2010; Schuetze *et al.*, 2010; Tabouret *et al.*, 2011; Tapie *et al.*, 2011) étaient déjà utilisés. Parmi ces bio-indicateurs, l'utilisation de l'anguille européenne comme espèce de bio-surveillance de la pollution a été proposée il y a plus de 20 ans (De Boer and Brinkman, 1994; Larsson *et al.*, 1991). En effet, cette espèce

possède des caractéristiques comportementales et biologiques particulièrement intéressantes pour une espèce sentinelle. L'anguille, avec sa durée de vie relativement longue (jusqu'à une vingtaine d'années), son comportement plutôt sédentaire, son alimentation variée (à base de crustacés, vers, escargots, larves d'insectes et même de petits poissons), son mode de reproduction (sémelpare), sa distribution géographique importante, sa masse grasseuse importante et son faible taux d'épuration (élimination des contaminants de son organisme), constitue une espèce particulièrement appropriée notamment pour la surveillance de contaminants lipophiles par rapport aux autres espèces de poissons (De Boer and Brinkman, 1994; Larsson *et al.*, 1991; Tesch, 2003). L'utilisation de cette espèce est cependant limitée à un stade de développement, l'anguille jaune, qui présente toutes ces caractéristiques du fait de son caractère sexuel immature (Belpaire and Goemans, 2007b). De plus, l'utilisation des profils de contaminants chez l'anguille fournirait des indications précieuses sur la fraction biodisponible et sur la pression chimique d'un site, particulièrement dans le cas des contaminants lipophiles (Belpaire and Goemans, 2007b; Belpaire *et al.*, 2008). En outre, l'anguille est une source de nourriture, tant pour la faune (en particulier lors des premiers stades de développement), que pour l'Homme. L'analyse des contaminants dans ses tissus peut apporter des indications sur les apports et les menaces pour les consommateurs potentiels.

**Chapitre II : Etude du biotope estuarien :
contamination par des polluants
organiques persistants et toxicité
potentielle de la colonne d'eau et des
sédiments des vasières intertidales et
subtidales**

II.1. Introduction

L'étude du compartiment sédimentaire constitue une approche intégrative permettant une bonne représentativité de la pression de contamination du fait de l'accumulation de nombreux contaminants au sein des sédiments.

Ce chapitre intègre des analyses chimiques approfondies du compartiment sédimentaire de l'estuaire de la Loire ainsi que des tests *in vitro* permettant de mettre en évidence une activité hormonale liée aux mécanismes fondamentaux de la fonction thyroïdienne.

Afin de déterminer des différences spatiales de contamination, des prélèvements de sédiments ont été réalisés sur des sites répartis le long de l'estuaire de la Loire (de Saint Nazaire à Ancenis). Sur chacun des sites, des sédiments ont été prélevés en surface, sur les 5 premiers centimètres, dans la zone intertidale et/ou dans la zone subtidale afin de déterminer de possibles variations inter-zones. L'influence de la saison sur la contamination sédimentaire a également été étudiée en réalisant les prélèvements en zone subtidale durant une année, à chacune des 4 saisons. Enfin, dans le but d'appréhender la qualité de la colonne d'eau, des capteurs passifs ont été placés en trois points répartis le long de l'estuaire. Le principal avantage de ce type de dispositif, comparé à un prélèvement d'eau ponctuel, est de donner des valeurs de contamination de façon intégrée dans le temps. Les contaminants recherchés dans les sédiments étaient les 7 indicateurs de la contamination en PCB, 7 PBDE, 16 HAP, 5 AP et le BPA. L'analyse des HAP, AP et BPA a fait l'objet d'un développement de méthode d'analyse en UHPLC (Chromatographie Liquide Ultra Haute Performance) couplée à un détecteur de fluorescence. Ce développement analytique est présenté dans ce chapitre. En ce qui concerne les autres contaminants, les méthodes chromatographiques utilisées ont été mises au point et étaient utilisées en routine préalablement à ce travail.

Dans l'objectif de déterminer si la nature et les niveaux des contaminants présents dans les sédiments et la colonne d'eau pouvaient être associés à une altération du système thyroïdien, un test *in vitro* a été utilisé pour mettre en évidence une affinité spécifique des contaminants pour la transthyrétrine (TTR), protéine de transport de l'hormone T4 dans la circulation sanguine (Houtman *et al.*, 2004; Lans *et al.*, 1993). Ces tests ont été réalisés en collaboration avec l'Institute for Environmental Studies de l'Université Libre d'Amsterdam. La TTR est synthétisée dans le foie et le cerveau et joue un rôle essentiel, notamment dans le transport materno-fœtal des hormones thyroïdiennes, ainsi que dans le transport de la T4 au niveau de

la barrière hémato-encéphalique chez les vertébrés (Schreiber *et al.*, 1995). Le test *in vitro* de liaison à la TTR (TTR binding assay) permet de mettre en évidence l'affinité de xénobiotiques pour cette protéine de transport en compétition avec la T4. Les résultats d'activité perturbatrice (exprimés en équivalent T4) obtenus à partir d'extraits des sédiments et des capteurs passifs ont été utilisés dans le but de rechercher des corrélations éventuelles avec les concentrations en contaminants des sites étudiés dans ce travail.

II.2. Matériels et méthodes

II.2.1. Analytes, standards et solvants

Les 36 composés étudiés comprenant 7 congénères de PCB, 7 congénères de PBDE, 16 HAP, 5 AP et le BPA sont reportés dans le Tableau 8. Les solvants utilisés : l'acétone, l'hexane et le dichlorométhane, étaient de qualité HPLC (chromatographie liquide haute performance) ; l'acétonitrile était quant à lui de qualité LC-MS (chromatographie liquide-spectrométrie de masse). L'acétone, le dichlorométhane et l'hexane utilisés pour l'extraction provenaient de chez Biosolve (Dieuze, Lorraine, France) et l'acétonitrile de chez Scharlab (Barcelone, Catalogne, Espagne).

Les matériaux certifiés pour les PCB et les PBDE d'une part, et les HAP d'autre part étaient des sédiments de référence certifiés (CRM) provenant de chez RTC (Laramie, WY, USA).

Tableau 8. Analytes, formules brutes, N° CAS et masses molaires associés

Composé	Formule Brute	N° CAS	Masse (g/mol)	Composé	Formule Brute	N° CAS	Masse (g/mol)
PCB 28	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	7012-37-5	257,54	Fluorène (Fluo)	C ₁₃ H ₁₀	86-73-7	166,22
PCB 52	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	35693-99-3	291,99	Phénanthrène (Phe)	C ₁₄ H ₁₀	85-01-8	178,23
PCB 101	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	37680-73-2	326,43	Anthracène (Ant)	C ₁₄ H ₁₀	120-12-7	178,23
PCB 118	C ₁₂ H ₃ Cl ₅	31508-00-6	326,43	Fluoranthène (Fla)	C ₁₆ H ₁₀	206-44-0	202,25
PCB 138	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	35065-28-2	360,88	Pyrène (Pyr)	C ₁₆ H ₁₀	129-00-0	202,25
PCB 153	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	35065-27-1	360,88	Benzo(a)anthracène (B(a)ant)	C ₁₈ H ₁₂	56-55-3	228,29
PCB 180	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	35065-29-3	395,32	Chrysène (Chry)	C ₁₈ H ₁₂	218-01-9	228,29
BDE 28	C ₁₂ H ₇ Br ₃ O	41318-75-6	406,90	Benzo(b)fluoranthène (B(b)fla)	C ₂₀ H ₁₂	205-99-2	252,31
BDE 47	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	5436-43-1	485,79	Benzo(k)fluoranthène (B(k)fla)	C ₂₀ H ₁₂	207-08-9	252,31
BDE 99	C ₁₂ H ₅ Br ₃ O	60348-60-9	564,69	Benzo(a)pyrène (B(a)pyr)	C ₂₀ H ₁₂	50-32-8	252,31
BDE 100	C ₁₂ H ₅ Br ₃ O	189084-64-8	564,69	Benzo(ghi)peryène (B(ghi)per)	C ₂₂ H ₁₂	191-24-2	276,33
BDE 153	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	68631-49-2	643,58	Dibenz(o)anthracène (D(ah)ant)	C ₂₂ H ₁₄	53-70-3	278,35
BDE 154	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	207122-15-4	643,58	4-n-Butylphénol (BP)	C ₁₀ H ₁₄ O	1638-22-8	150,22
BDE 183	C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	189084-67-1	722,48	4-ter-Octylphénol (4-tOP)	C ₁₄ H ₂₂ O	140-66-9	206,32
Naphtalène (Nap)	C ₁₀ H ₈	91-20-3	128,17	4-n-Octylphénol (4-OP)	C ₁₄ H ₂₂ O	1806-26-4	206,32
1-méthylnaphtalène (1-méthy)	C ₁₁ H ₁₀	90-12-0	142,2	4-n-Nonylphénol (4-NP)	C ₁₅ H ₂₄ O	104-40-5	220,35
2-méthylnaphtalène (1-méthy)	C ₁₁ H ₁₀	91-57-6	142,2	4-Nonylphénol ramifié (NP-r)	C ₁₅ H ₂₄ O	90481-04-2	220,35
Acénaphène (Ace)	C ₁₂ H ₁₀	83-32-9	154,21	Bisphénol A (BPA)	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	80-05-7	228,29

II.2.2. Échantillonnage

La Figure 17 et le Tableau 9 présentent la localisation et la période de prélèvement des différents échantillons étudiés. Des prélèvements de sédiments ont été réalisés en zone intertidale d'avril 2011 à février 2012, aux 4 saisons et en zone subtidale en septembre 2012 et avril 2013. Les sites choisis sont des sites ateliers de l'estuaire de la Loire s'échelonnant sur une centaine de kilomètres (de Saint Nazaire à Ancenis). Le choix a été fait en fonction des caractéristiques des différentes STEP (station d'épuration des eaux usées) identifiées (quantité et qualité des effluents, vétusté des installations, respect des normes européennes, capacité en équivalent/habitant) (<http://www.loire-estuaire.org>). Sur chaque site, les sédiments ont été prélevés en surface (5 premiers cm) en zone intertidale et/ou subtidale. Le site d'Ancenis n'a pas été échantillonné en zone subtidale par manque de moyens de navigation pour permettre le prélèvement. Une majeure partie des prélèvements réalisés en zone subtidale ont été effectués lors d'une mission d'échantillonnage en septembre 2012. La contamination de la colonne d'eau a été appréhendée par l'utilisation de capteurs passifs placés en triplicat sur trois sites, durant 21 jours : Paimboeuf, Haute Indre et Champtoceaux. Ces capteurs étaient composés de 200 mg de phase stationnaire Oasis HLB. La Loire ayant connu des crues durant la période de déploiement, les capteurs passifs des sites Paimboeuf et Champtoceaux ont malheureusement été détériorés.

Tableau 9. Date et localisation des sites de prélèvement des sédiments et des capteurs passifs en estuaire de la Loire

Zone	Date	1	2	3	4	5	6	7	8	9
		Saint-Nazaire	Mindin	Donges	Paimboeuf	Haute Indre	Rezé	Bellevue Sud	Champtoceaux	Ancenis
Vasière intertidale	▲ Avril 2011		x	x		x	x	x		x
	● Août 2011		x	x		x	x	x		x
	● Décembre 2011		x	x		x	x	x		x
	● Février 2012		x	x		x	x	x		x
Vasière subtidale	× Septembre 2012	x	x	x	x	x	x	x		
	● Avril 2013				x					
Capteurs passifs	● Avril 2013				x	x			x	

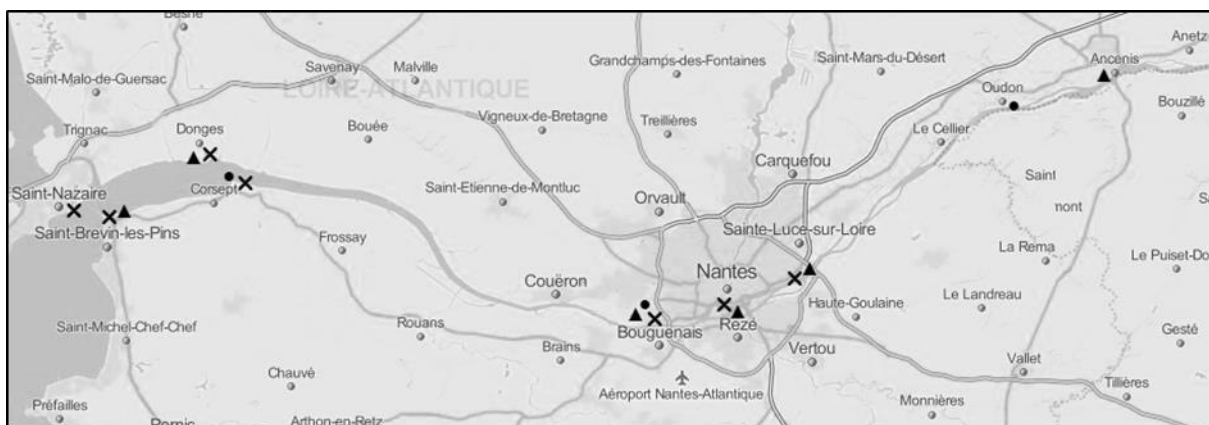


Figure 17. Carte des points de prélèvement des sédiments et des capteurs passifs. De l'amont vers l'aval : Ancenis, Champtoceaux, Bellevue Sud, Rezé, Haute-Indre, Paimboeuf, Donges, Mindin, Saint-Nazaire. Les points correspondent aux sites de déploiement des capteurs passifs, les triangles aux sites de prélèvement des sédiments dans la zone intertidale et les croix aux prélèvements des sédiments dans la zone subtidale.

II.2.3. Extraction

II.2.3.1. Extraction sédimentaire des PCB et PBDE

Les PCB et PBDE ont été extraits des sédiments par fluide pressurisé de façon automatique grâce à un appareillage spécifique (ASE ; Accelerated Solvent Extraction) puis purifiés à l'aide d'une étape d'extraction sur phase solide (SPE). L'extracteur automatisé haute température et haute pression est un modèle ASE 350 de chez Dionex (Sunnyvale, CA, USA). Les conditions opératoires de l'extraction par ASE sont décrites dans le Tableau 10.

Tableau 10. Conditions opératoires pour l'extraction des PCB et PBDE par ASE

Préchauffage	Phase statique	Purge du solvant	Temps de purge	Nombre de cycles	Pression	Solvant	Température
5 min	7 min	60%	60 sec	3	1500 Psi	Hexane/DCM (1:1)	100°C

Avant extraction, le sédiment a été lyophilisé, broyé et tamisé à 2 mm. Les cellules d'ASE, le sable de Fontainebleau, l'alumine et le cuivre utilisés lors de l'extraction ont été lavés au préalable à l'ASE avec les mêmes cycles que ceux réalisés pour l'extraction afin d'éliminer toute trace potentielle de contaminants cibles de l'analyse. L'alumine désactivée a été utilisée afin de réaliser une première purification de l'échantillon et le cuivre activé a été mélangé avec le sédiment lyophilisé afin d'éliminer le soufre qui pourrait perturber l'analyse. Les cellules d'ASE de 33 mL ont été remplies de la manière suivante du bas vers le haut : un filtre en fibre de verre et de cellulose de 30 mm, 3 g d'alumine désactivée et un mélange contenant

10 g de sédiments lyophilisés pesés à l'aide d'une balance précise au dixième de milligramme, du sable de Fontainebleau et 3 g de cuivre activé. Du sable de Fontainebleau a été ajouté de manière à compléter le volume de la cellule. L'extrait obtenu a ensuite été évaporé à l'aide d'une station de concentration par évaporation automatisée Turbovap II de chez Caliper LifeSciences (Hopkinton, MA, USA) avant d'être purifié par SPE. Les cartouches de SPE qui ont été utilisées pour la purification ont été obtenues chez Phenomenex (Torrance, CA, USA). La phase stationnaire est une Strata Florisil (FL-PR, 170 μm , 80 \AA) de 1 000 mg pour 6 mL constituée d'oxydes de silicium et de magnésium dans un rapport 85/15 (m:m). Le conditionnement de la cartouche de SPE a été réalisé avec 6 mL d'hexane. Les PCB et les PBDE ont été élués par 4 mL d'hexane et une seconde fraction contenant des paraffines chlorées à chaîne courte (SCCP) a été entraînée par 6 mL d'un mélange Hexane/Dichlorométhane (1:1, v/v). Cette seconde fraction a été isolée de manière conservatoire pour une analyse ultérieure éventuelle. La première fraction recueillie après élution a été évaporée sous flux d'azote jusqu'à un volume d'environ 200 μL à l'aide d'un évaporateur de chez Bioblock Scientific (Charvieu-Chavagneux, Rhône-Alpes, France). Ce volume a ensuite été repris dans du dichlorométhane (DCM) et ajusté à 1 mL précisément. Puis les échantillons ont été envoyés au Laboratoire de Chimie de l'Environnement (LCE) de l'Université d'Aix-Marseille pour l'analyse des congénères de PCB et PBDE.

II.2.3.2. Extraction sédimentaire des HAP, des AP et du BPA

L'extraction des HAP, des AP et du BPA a été conduite grâce à un système ASE en triplicat. Ces extractions ont été réalisées en deux étapes et avec le même appareillage que celui utilisé pour la préparation des échantillons en vue de l'analyse des PCB et PBDE. Une première extraction avec un mélange Hexane/Dichlorométhane (1:1, v/v) a été appliquée aux échantillons de sédiments, suivie d'une seconde avec un mélange Dichlorométhane/Acétone (1:1, v/v) selon les mêmes conditions opératoires décrites dans le Tableau 11.

Tableau 11. Conditions opératoires pour l'extraction des HAP, AP et du BPA par ASE

Préchauffage	Phase statique	Purge du solvant	Temps de purge	Nombre de cycles	Pression	Solvant	Température
/	5 min	60%	200 sec	3	1500 Psi	Hexane/DCM (1:1)	100°C
/	5 min	60%	200 sec	3	1500 Psi	DCM/Acétone (1:1)	100°C

Les cellules d'ASE qui ont été utilisées avaient un volume de 22 mL. La prise d'essai des échantillons de sédiments lyophilisés était d'environ 1 g. Les cellules d'ASE et les billes de verre utilisées lors de l'extraction ont été lavées à l'ASE selon le même protocole que celui de l'extraction. Le remplissage des cellules a été réalisé du bas vers le haut avec : un filtre en fibre de verre et de cellulose de 27 mm et un mélange de sédiments et de billes de verre afin de réduire au maximum l'espace vide dans la cellule. Les extraits ont ensuite été évaporés à l'aide d'une station de concentration par évaporation automatisée décrite précédemment. Deux cents microlitres de diméthylformamide (DMF) ont ensuite été ajoutés aux extraits afin de prévenir la volatilisation des HAP les plus légers lors de l'évaporation de l'hexane, du DCM et de l'acétone sous flux d'azote. Le volume d'environ 200 µL de DMF non évaporés a été ajusté à 1 mL précisément d'acétonitrile. Les échantillons ont ensuite été filtrés sur un filtre en polytétrafluoroéthylène (téflon PTFE) de porosité de 0,22 µm obtenu chez Phenomenex (Torrance, CA, USA) avant analyse.

II.2.3.3. Extraction des contaminants adsorbés sur la phase stationnaire des capteurs passifs

Des cellules d'ASE de 5 mL ont été utilisées pour l'extraction des 200 mg de phase stationnaire Oasis HLB (Waters Corporation (Milford, MA, USA), séquestrés dans chacun des dispositifs de capteurs passifs. Cette extraction a été réalisée avec le même matériel que les extractions précédentes. L'extraction avec l'ASE n'a cependant pas été réalisée sous pression, mais comme une extraction en phase solide classique selon les conditions opératoires décrites dans le Tableau 12. L'ASE a été utilisée en mode « volume fixe », ainsi, 10 mL de DCM et de méthanol ont été utilisés pour l'extraction.

Tableau 12. Conditions opératoires pour l'extraction à l'ASE des contaminants adsorbés sur la phase stationnaire des capteurs passifs

Préchauffage	Phase statique	Purge du solvant	Temps de purge	Nombre de cycles	Pression	Solvant	Température
1 min	5 min	60%	60 sec	1	/	DCM	75°C
1 min	5 min	60%	60 sec	1	/	Méthanol	75°C

Les extraits ont été évaporés à l'aide d'une station de concentration par évaporation automatisée, puis sous flux d'azote à l'aide d'un évaporateur d'échantillon avant d'être repris précisément dans le solvant adéquat à l'analyse des contaminants cibles. Ils ont ensuite été filtrés de la même manière que les extraits de sédiments réalisés pour les analyses de HAP, AP et BPA.

II.2.4. Analyse du carbone organique total (COT) dans les sédiments

II.2.4.1. Préparation des échantillons

Une masse de 2,5 à 3 mg de sédiments a été introduite dans des capsules en argent. Ces dernières ont ensuite été placées pendant 1h15 dans un dessiccateur sous vide contenant une coupelle d'acide chlorhydrique à 37%. L'acide chlorhydrique a permis la décarbonatation de la fraction inorganique des échantillons, transformant ainsi le calcaire CaCO_3 en chlorure de calcium CaCl_2 , en eau et en dioxyde de carbone. Après décarbonatation, les capsules ont été refermées sur elles-mêmes afin de former des boulettes. Ces boulettes ont ensuite été placées à l'étuve pendant 1h afin d'éliminer l'acide chlorhydrique résiduel. Puis, elles ont été directement introduites dans le passeur d'échantillons de l'analyseur.

II.2.4.2. Instrument

La mesure du COT a été réalisée à l'aide d'un analyseur élémentaire CHNS (carbone, hydrogène, azote, soufre). L'échantillon contenu dans la capsule a été introduit dans un réacteur constitué par un tube vertical en quartz maintenu à $1\ 020^\circ\text{C}$ et traversé par un courant constant d'hélium. Lors de l'introduction de l'échantillon, le courant d'hélium a été enrichi par une quantité déterminée d'oxygène pur, provoquant ainsi une combustion éclair (ou combustion flash à une température d'environ $1\ 800^\circ\text{C}$) de la capsule et de l'échantillon. Ainsi, toutes les substances organiques et inorganiques, même les plus résistantes ont été détruites. Les gaz de combustion, entraînés par le courant d'hélium, ont traversé un catalyseur d'oxydation qui conduit à la formation d'oxydes de type CO_2 , H_2O , SO_3 et N_xO_y . Ces gaz ont traversé un deuxième catalyseur constitué de cuivre qui a réduit les oxydes d'azote en azote élémentaire, le SO_3 en SO_2 et piégé l'excès d'oxygène. Les gaz N_2 , CO_2 , H_2O et SO_2 se retrouvent à la sortie du tube en plus du gaz vecteur. Les gaz ainsi obtenus ont alors été séparés par chromatographie et quantifiés par un détecteur à conductibilité thermique. Le signal obtenu a été détecté par un catharomètre, amplifié, puis envoyé à une carte interface qui a converti le signal analogique en une série de valeurs numériques (Figure 18).

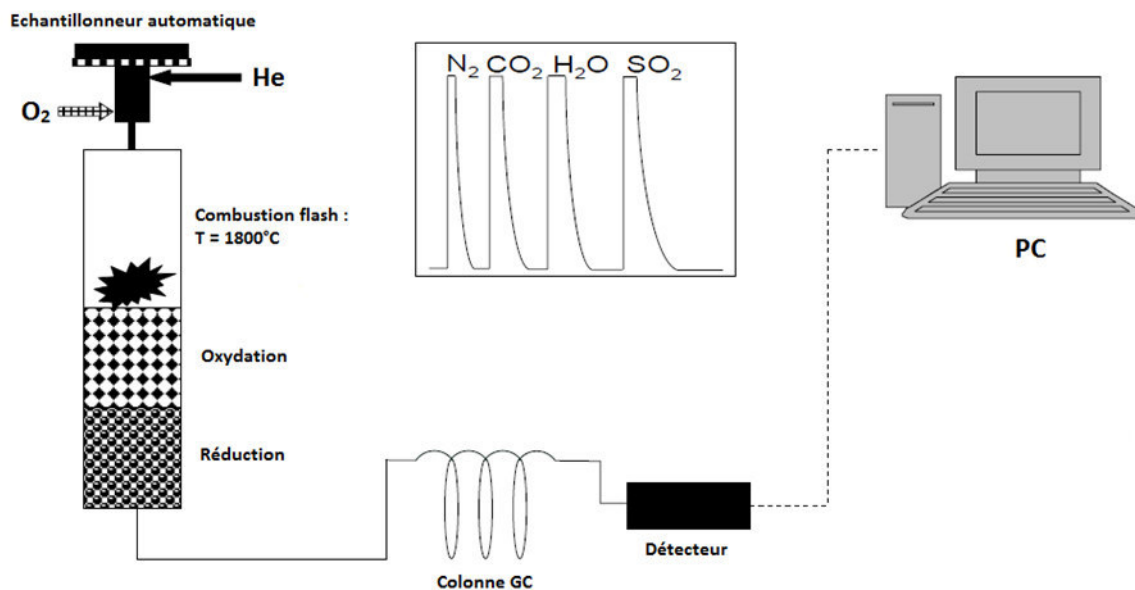


Figure 18. Schéma de fonctionnement d'un analyseur élémentaire CHNS

II.2.4.3. Assurance et contrôle qualité

L'étalonnage a été réalisé dans une capsule en étain à l'aide d'un standard de 2,5-(bis(5-tert-butyl-2-benzo-oxazol-2-yl) thiophène (BBOT) qui a été obtenu chez ThermoElectron France SA (Courtabœuf, Île de France, France). L'étalonnage a été réalisé avant analyse et à plusieurs reprises lors de l'analyse des échantillons afin de suivre l'évolution de la linéarité de la réponse du détecteur. Un modèle linéaire a été appliqué à l'étalonnage correspondant à l'aire des pics chromatographiques correspondants au CO₂ en fonction de la concentration. Ainsi, un coefficient de corrélation de 0,999 était attendu ainsi qu'une pente et une ordonnée à l'origine constantes dans le temps. Deux sédiments de référence ont également été utilisés pour la quantification du COT et la vérification de la justesse de la mesure. Le premier sédiment certifié, le B2152, a été obtenu chez Elemental Microanalysis Ltd (Okehampton, Devon, UK). Le second, le MS68, est un échantillon de sédiment de référence interne pour l'étape de décarbonatation. Il provient d'un exercice d'inter calibration et sa teneur en carbone est connue (mais non certifiée) et est prise comme référence pour vérifier que l'étape de décarbonatation s'est bien déroulée. Le B2152 a été analysé dans une capsule en étain et n'a pas subi de décarbonatation acide, le second quant à lui a été analysé dans une capsule en argent et a subi une décarbonatation acide comme les échantillons sédimentaires. Les valeurs

obtenues ainsi que les valeurs certifiées ont été reportées dans le Tableau 13. Différents blancs dans des capsules en étain et en argent ont été réalisés au cours des analyses. La moyenne des aires des blancs a directement été soustraite aux valeurs des étalons ou des échantillons selon le type de capsule.

Tableau 13. Moyenne et écart-type des valeurs obtenues et des valeurs certifiées (% , poids sec) des échantillons de référence B2152 et MS68

	B2152	MS68
Valeurs certifiées	1,65 ± 0,02	2,23
Valeurs obtenues	1,69 ± 0,05	2,12 ± 0,12

II.2.5. Test de liaison à la TTR (TTR-binding assay)

II.2.5.1. Extraction

Les extraits de sédiments ont été obtenus au moyen de l'ASE. Les cellules de 33 mL ont été remplies de la manière suivante : un filtre en fibre de verre et de cellulose de 30 mm et 10 g de sédiments lyophilisés et tamisés (2 mm). Le volume restant de la cellule a été complété par du sable de Fontainebleau. Préalablement à l'extraction, les cellules d'ASE et le sable de Fontainebleau ont été lavés à l'ASE selon les mêmes conditions opératoires que celles de l'extraction. La méthode est présentée dans le Tableau 14.

Tableau 14. Conditions opératoires d'extraction par ASE des sédiments pour le test de liaison à la TTR

Préchauffage	Phase statique	Purge du solvant	Temps de purge	Nombre de cycles	Pression	Solvant	Température
1 min	5 min	60%	60 sec	3	1500 Psi	DCM/Acétone (1:1)	75°C

Les 2/3 de chaque extrait ont été utilisés pour le test TTR-binding et le restant (1/3) a servi aux analyses chimiques.

Les extraits obtenus à partir des sédiments et des capteurs passifs ont ensuite été évaporés à sec sous azote puis repris dans environ 1,5 mL de DCM.

II.2.5.2. Purification

Chaque extrait de sédiment a été nettoyé au moyen d'une chromatographie par perméation de gel (GPC) selon la méthode décrite par Weiss *et al.* (2009). Seule la fraction obtenue entre 16,5 min et 24 min a été conservée, puis évaporée sous flux d'azote. Avant évaporation totale, 100 µL de diméthylsulfoxyde (DMSO) étaient ajoutés puis les résidus de solvants de la GPC étaient éliminés en évaporant à nouveau sous flux d'azote. L'extrait obtenu était utilisé dans le test.

II.2.5.3. Test de liaison à la TTR (TTR binding assay)

Pour évaluer la compétition entre les composés perturbateurs des HT dans les extraits et la référence T4 pour la liaison à la protéine de transport TTR, les extraits ont été testés au moyen du test de liaison à la TTR (« TTR-binding assay ») décrit par Lans *et al.* (1993) avec des modifications telles que décrites par Hamers *et al.* (2006) et Weiss *et al.* (2009). Brièvement, ce test *in vitro* (TTR binding assay) permet de mettre en évidence l'affinité de xénobiotiques pour la TTR. Des concentrations croissantes de compétiteurs potentiels (composés ou extraits), une quantité connue de T4 radiomarquée (^{125}I) et de T4 non marquée sont mélangées avec la TTR humaine purifiée (Figure 19). Après incubation pendant 1 nuit, les fractions de ^{125}I -T4 liées ou non à la TTR sont séparées par chromatographie d'exclusion stérique et la radioactivité est mesurée dans l'éluat contenant la ^{125}I -T4 liée. La comparaison des résultats obtenus avec un standard de T4 permet d'évaluer l'activité des composés ou de l'extrait testé.

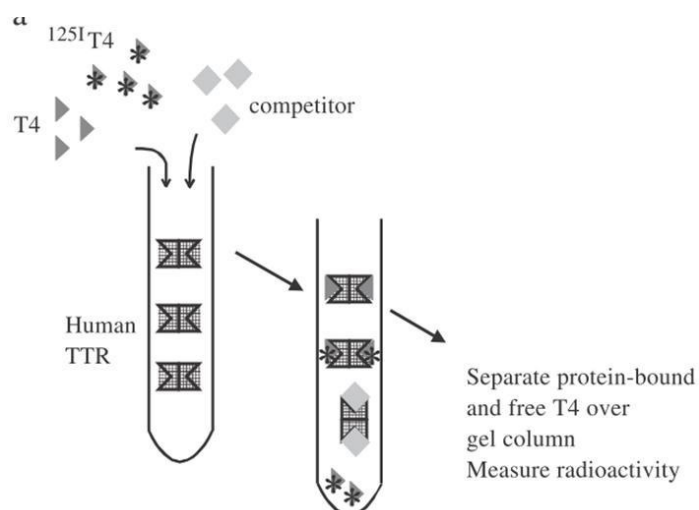


Figure 19. Principe du test "TTR-binding assay", d'après Legler *et al.* 2002.

II.2.6. Analyse des PCB et des PBDE

II.2.6.1. Instrumentation

L'analyse des PCB a été réalisée par un système GC 7890A couplé à un système 7000 MS triple quadripôle de chez Agilent Technologies Inc. (Santa Clara, CA, USA). Un microlitre a été injecté en mode split/splitless (1 min splitless) en multimode inlet (MMI) programmé comme décrit ci-après : une température initiale de 60°C pendant 0,1 min augmente ensuite jusqu'à 250°C pendant 10 min et à une vitesse de 200°C/min. La séparation des analytes a été réalisée sur une colonne HP-5 MS (30 m x 0,25 mm) de chez Agilent Technologies Inc., sous un flux d'hélium à 99,9 % (Air Liquide, Paris, Île de France, France) amené à un débit constant de 1 mL/min. Le programme du four a été réglé comme décrit ci-après : la température initiale était de 50°C et a été maintenue pendant 5 min, puis augmentée jusqu'à 300°C à une vitesse de 10°C/min et maintenue pendant 10 min. La durée totale de l'analyse était de 35 min. L'ionisation a été réalisée par impact électronique (70 eV). Les autres paramètres du spectromètre de masse étaient : température de la ligne de transfert (300°C), température de la source (250°C) et température du quadripôle (150°C). La détection a été réalisée en mode Single Ion Monitoring (SIM) selon les conditions indiquées dans le Tableau 15.

Tableau 15. Temps de rétention et ions cibles pour l'analyse des 7 PCB

Analyte	Temps de rétention (min)	Quantificateur (m/z)	Qualificateur 1 (m/z)	Qualificateur 2 (m/z)
PCB 28	21,8	256	186	258
PCB 52	22,47	292	220	290
PCB 101	24,15	326	256	328
PCB 112 (IS)*	24,37	326	256	328
PCB 118	25,33	326	256	328
PCB 153	25,72	360	290	362
PCB 138	26,22	360	290	362
PCB 180	27,43	394	326	396

* Étalon Interne

L'analyse des PBDE a été conduite par le système de chromatographie couplé au même système de spectrométrie de masse. Un microlitre a été injecté en mode split/splitless (1 min splitless) en MMI programmé comme décrit ci-après : une température initiale de 120°C pendant 0,1 min augmente ensuite jusqu'à 250°C pendant 10 min et à une vitesse de 200°C/min. La séparation des analytes a été réalisée sur une colonne HP-5 MS (30 m x 0,25 mm), sous un flux d'hélium à 99,9 % amené à un débit constant de 1 mL/min. Le

programme du four a été réglé comme décrit ci-après : la température initiale était de 110°C et a été maintenue pendant 1 min, puis augmentée jusqu'à 180°C et maintenue pendant 1 min, puis augmentée une nouvelle fois jusqu'à 240°C à 2°C/min et maintenue pendant 5 min, puis augmentée jusqu'à 265°C et maintenue pendant 6 min avant d'être augmentée une dernière fois jusqu'à 300°C à 5°C/min et maintenue pendant 15 min. La durée totale de l'analyse était de 84,5 min. L'ionisation a été réalisée par impact électronique (70 eV). Les autres paramètres du spectromètre de masse étaient : température de la ligne de transfert (300°C), température de la source (250°C) et température du quadripôle (150°C). La détection a été réalisée en mode Single Ion Monitoring (SIM) selon les conditions indiquées dans le Tableau 16.

Tableau 16. Temps de rétention et ions cibles pour l'analyse des 7 PBDE

Analyte	Temps de rétention (min)	Quantificateur (m/z)	Qualificateur 1 (m/z)	Qualificateur 2 (m/z)
PCB 112 (IS)*	20,82	326	254	328
BDE 28	24,48	406	246	326
BDE 47	32,97	486	326	484
BDE 100	39,65	564	404	406
BDE 99	42,14	564	404	406
BDE 154	49,07	484	482	486 (644)
BDE 153	52,77	484	482	486 (644)
BDE 183	62,7	566	562	564 (723)

* Étalon Interne

Pour les deux familles de composés, les données ont été traitées avec le logiciel MassHunter Qualitative Analysis B.05.00 de chez Agilent Technologies Inc.

II.2.6.2. Contrôle qualité

Cinq à sept niveaux de supplémentation ont été utilisés pour construire les courbes de calibration ; le PCB 112 a été retenu comme étalon interne. Pour chaque série d'analyse (4 échantillons), les standards de contrôle qualité de concentrations connues ont été analysés. Les CRM PCB/PBDE ont été inclus dans les séries d'analyse afin de vérifier l'exactitude et la précision de l'extraction par solvant pressurisée ainsi que des procédures subséquentes. Les limites de détection et de quantification (LOD et LOQ) obtenues ont été reportées dans le Tableau 17.

Tableau 17. Limites de détection (LOD) en pg/g sédiment sec et de quantification (LOQ) en pg/g de sédiment sec des congénères de PCB et PBDE

	PCB							PBDE						
	28	52	101	118	138	153	180	28	47	99	100	153	154	183
LOQ (pg/g sédiment sec)	3	3	6	6	6	6	13	13	25	63	63	63	63	625
LOD (pg/g de sédiments sec)	1	1	2	2	2	2	4	4	8	21	21	21	21	208

II.2.7. Analyse des HAP, des AP et du BPA

L'analyse des HAP, AP et BPA a été réalisée à l'aide d'un système UHPLC couplé à un détecteur de fluorescence. La méthode analytique existante au laboratoire utilisait au préalable une colonne HPLC impliquant un temps d'analyse de 71 min. Dans le cadre de ce travail, un transfert de méthode vers de l'UHPLC a été réalisé en utilisant une colonne dont la phase stationnaire était caractérisée par une faible granulométrie afin de diminuer ce temps d'analyse à seulement 14 min.

II.2.7.1. Instrumentation

L'analyse des AP, HAP et du BPA a été conduite par un système UHPLC Ultimate 3000 (Dionex – Thermo Scientific) équipé d'une pompe quaternaire (DGP 3600RS), un échantillonneur automatique à régulation thermique (fixé à 10°C) (WPS 300TSL), un four à colonne (TCC 3000SD) et un détecteur par fluorescence programmable (FLD 3400RS, Dionex – Thermo Scientific). La séparation chromatographique a été réalisée à l'aide d'une colonne Kinetex C18, 1,7 µm, 100 x 2,1 mm (Phenomenex, Le Pecq, Île de France, France) protégée par une pré-colonne (SecurityGuard ULTRA Cartridges UHPLC C18 for 2,1 mm ID Columns, Phenomenex) et maintenue à 40°C. Le volume d'injection était de 1,8 µL et le débit de 0,735 mL/min. La phase mobile était constituée d'eau (A) et d'acétonitrile (B) selon les gradients suivants : 40 % de B de t = 0 à t = 2,2 min, 70 % de B de t = 6,1 min à t = 9,7 min et enfin 40 % de B de t = 10,0 min à t = 14,0 min. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission des différents analytes ont été reportées dans le Tableau 18. Les données ont été récupérées et traitées en utilisant le logiciel Chromeleon 7 (Thermo Scientific).

Tableau 18. Couple de longueurs d'ondes de fluorescence pour chaque analyte

Analyte	λ (excitation) (nm)	λ (émission) (nm)	Canal
Nap	271	334	2
1-méthy	271	334	2
2-méthy	270	324	2
Ace	225	313	1
Fluo	270	324	2
Phe	245	380	2
Ant	245	380	2
Fla	225	313	1
Pyr	270	385	2
B(a)ant	270	385	2
Chry	270	385	2
B(b)fla	290	430	2
B(k)flua	290	430	2
B(a)pyr	290	430	2
B(ghi)per	290	430	2
D(ah)ant	290	430	2
BP	225	313	1
4-tOP	280	462	1
4-OP	225	313	1
4-NP	225	313	1
NP-r	225	313	1
BPA	225	313	1

II.2.7.2. Transposition HPLC vers UHPLC

L'avantage que possède l'UHPLC par rapport à l'HPLC réside dans son temps d'analyse réduit sans perte de qualité de séparation, grâce à l'accélération de la cinétique d'adsorption des analytes sur la phase stationnaire de la colonne chromatographique, grâce à une augmentation conséquente de la pression. La réduction du temps d'analyse se traduit également par une réduction des quantités de solvant utilisées. L'optimisation analytique a été réalisée pour 24 analytes incluant 16 HAP, 5 AP et le BPA.

✓ Transposition matérielle

La transposition de l'HPLC vers l'UHPLC demande des changements matériels pour que la montée en pression soit effective et pour que l'ensemble des constituants du système chromatographique supportent les nouveaux paramètres. Le système chromatographique était utilisé à l'origine pour travailler en HPLC, mais pouvait supporter une montée en pression progressive jusqu'à 1 000 bars. La transposition matérielle se résume donc en deux changements. Les tubulures ont été changées, passant de Vipers™ de 0,18 mm à des Vipers™ de 0,13 mm de diamètre interne, afin de limiter au maximum les délais de gradient. La colonne chromatographique a également été changée, passant d'une Supelcosil LC PAH, 5 μ m, 250 x 3,0 mm (Supelco Analytical, Bellafonte, PA, USA) à une Kinetex C18, 1,7 μ m,

100 x 2,1 mm (Phenomenex, Le Pecq, Île de France, France). La taille des particules de cette nouvelle colonne (1,7 μm) permet une résolution chromatographique améliorée caractéristique de l'analyse en ultra-haute performance.

✓ Transposition de la méthode analytique

La transposition de la méthode analytique a été réalisée à l'aide du programme HPLC Calculator 3.0 développé sous Microsoft Excel par Davy GUILLARME du Laboratoire de Chimie Analytique et Pharmaceutique de Genève. En entrant les paramètres connus du système chromatographique (géométrie des colonnes, volume mort du système avant et après transposition matérielle, débit, gradient, et volume d'injection de la méthode initiale) le programme calcule le nouveau débit, le nouveau volume d'injection, le nouveau gradient de solvant ainsi que le temps de reconditionnement recommandé pour la nouvelle méthode. Pour des raisons sans doute liées à l'absence de la phase stationnaire utilisée dans le programme HPLC Calculator 3.0, le transfert de la méthode n'a pas été concluant. En effet, le chromatogramme ne permettait pas une identification correcte des composés après l'entrée des nouveaux paramètres. La séparation des 24 analytes était de mauvaise qualité, et la transposition sur les quatre canaux du détecteur par fluorescence rendait impossible l'identification des analytes. Une optimisation analytique a donc été nécessaire.

✓ Optimisation analytique

L'optimisation analytique de l'analyse en UHPLC a été réalisée en plusieurs étapes. À partir de standards concentrés préalablement préparés, chaque analyte a été identifié individuellement grâce à son temps de rétention obtenu en UHPLC. Les standards utilisés ont été les mêmes que ceux utilisés pour réaliser la gamme étalon. Contrairement à la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse où les différents composés sont séparés par chromatographie grâce à leur différence de polarité et identifiés par spectrométrie grâce à leur masse, les seules informations sur l'analyte en chromatographie couplée à un détecteur par fluorescence reposent sur son temps de rétention et son couple de longueur d'onde (excitation/émission). Cette première étape est donc la plus importante du point de vue qualitatif. Lors de cette phase de qualification des analytes, une optimisation a également été réalisée sur les longueurs d'onde d'excitation et d'émission qui n'étaient pas optimales pour plusieurs composés : le BPA, l'acénaphène, le naphthalène, le 1- et le 2-méthyl-naphthalènes et le phénanthrène. Le nombre des canaux utilisés a été diminué de quatre à deux. En fonction des couples de longueurs d'ondes spécifiques des composés, différentes fenêtres de détections

ont été définies sur la durée de l'analyse. Une fois les composés identifiés, un mélange étalon composé de tous les analytes a été préparé afin de séparer chaque composé les uns des autres. Par la suite, il a été indispensable de placer sur des canaux différents des composés dont la séparation était difficile et dont les longueurs d'onde d'excitation et d'émission étaient différentes. C'était le cas notamment pour la séparation d'analytes appartenant aux HAP et aux AP. Les HAP concernés ne fluoresçaient pas aux longueurs d'onde des AP, et inversement. L'optimisation de la séparation du mélange étalon comportant l'ensemble des analytes a été réalisée en faisant varier le gradient des solvants, mais des essais ont également été réalisés en modifiant la température de la colonne, sans résultat concluant. Les chromatogrammes obtenus en HPLC, après transposition vers l'UHPLC et après optimisation de l'analyse UHPLC sont présentés respectivement en Annexes 2, 3 et 4. Le temps d'analyse a été réduit de 71 min à seulement 14 min. La résolution des différents analytes a été reportée dans le Tableau 19. Une résolution inférieure à 1,5 indique que la séparation n'est pas optimale. C'est le cas notamment du B(a)ant avec le Chry, du B(b)fla avec le B(k)fla et du B(k)fla avec le B(a)pyr. Ces résolutions n'ont par la suite pas pu être améliorées, mais n'étant pas inférieures à 0,75 (mauvaise séparation des analytes), elles n'ont pas empêché la quantification des analytes dans les échantillons.

Tableau 19. Résolution entre chaque analyte, après optimisation UHPLC

Canal 1					Canal 2				
R _s	Analyte A	Analyte B	t _R (A)	t _R (B)	R _s	Analyte A	Analyte B	t _R (A)	t _R (B)
3,7	BPA	b-oestr	1,06	1,34	16,4	Nap	1-méthy	3,31	4,82
4,8	b-oestr	17aEE	1,34	1,75	2,1	1-méthy	2-méthy	4,82	4,99
1,1	17aEE	BP	1,75	1,84	3,7	2-méthy	Ace	4,99	5,26
58,5	BP	4-tOP	1,84	6,17	2,3	Ace	Fluo	5,26	5,42
5,5	4-tOP	Fla	6,17	6,56	5,7	Fluo	Phe	5,42	5,84
5,5	Fla	NP-r	6,56	7,07	2,8	Phe	Ant	5,84	6,05
1,5	NP-r	4-OP	7,07	7,21	8,7	Ant	Pyr	6,05	6,69
10,0	4-OP	4-NP	7,21	7,90	9,2	Pyr	B(a)ant	6,69	7,35
					1,1	B(a)ant	Chry	7,35	7,44
					7,6	Chry	B(b)fla	7,44	8,04
					1,1	B(b)fla	B(k)fla	8,04	8,13
					0,8	B(k)fla	B(a)pyr	8,13	8,21
					6,8	B(a)pyr	D(ah)ant	8,21	8,88
					1,6	D(ah)ant	B(ghi)per	8,88	9,06

II.2.7.3. Contrôle qualité

a) Étalonnage externe

Pour la quantification des analytes, un étalonnage externe a été réalisé sur douze niveaux de concentrations d'un mélange étalon, avec six replicats par niveau. Les étalons ont été préparés à partir de standards de BPA, BP, 4 tOP, 4 OP, 4 NP et d'un mélange de NP-r qui ont été obtenus chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, Rhône Alpes, France). Le standard pour les HAP était un mélange de 18 HAP obtenu chez Supelco Analytical (Sigma Aldrich). Il a ainsi été déterminé la gamme de linéarité des analytes pour une détection par fluorescence. Suite aux premiers résultats d'analyse des échantillons obtenus, une dilution par 10, 100, 1 000 et 10 000 (un seul échantillon) a été nécessaire. Le calcul des moyennes, des écarts-types et des coefficients de variation au sein des différents replicats a servi de base aux calculs des limites de détection et de quantification qui seront détaillés dans la partie suivante. Les niveaux de concentration utilisés pour réaliser la quantification comprennent les points strictement supérieurs à la limite de quantification. Les différentes données relatives à l'étalonnage ont été reportées dans le Tableau 20.

Tableau 20. Données de quantification : équation de droite, gamme de linéarité et coefficient de corrélation en fonction des analytes

Analyte	Équation de droite	Gamme de linéarité (ng/mL)	R ²
Nap	$y = 4333,9 x + 541,71$	7,30 - 0,45	0,9967
1-méthy	$y = 5416,4 x + 1493,2$	3,88 - 0,48	0,9925
2-méthy	$y = 6158,6 x + 1340,1$	7,68 - 0,47	0,9956
Ace	$y = 10234 x + 1484,2$	3,86 - 0,09	0,9947
Fluo	$y = 23840 x + 789,86$	1,56 - 0,09	0,9994
Phe	$y = 7755,5 x + 70,051$	1,13 - 0,18	0,9975
Ant	$y = 32390 x + 627,07$	0,39 - 0,02	0,9950
Fla	$y = 3366,8 x + 166,66$	1,16 - 0,19	1,0000
Pyr	$y = 19101 x + 273,52$	1,11 - 0,09	0,9979
B(a)ant	$y = 13370 x + 316,39$	1,16 - 0,19	0,9970
Chry	$y = 13131 x + 2734,8$	6,21 - 0,38	0,9996
B(b)fla	$y = 3535,8 x + 830,06$	6,19 - 0,19	0,9967
B(k)fla	$y = 26098 x - 23,408$	1,14 - 0,04	0,9982
B(a)pyr	$y = 20825 x + 704,4$	1,16 - 0,19	0,9925
D(ah)ant	$y = 7989,2 x - 478,69$	2,25 - 0,37	0,9880
B(ghi)per	$y = 6072,9 x + 3669,7$	12,34 - 0,38	0,9904
BPA	$y = 827,42 x + 103,48$	8,23 - 1,02	0,9992
BP	$y = 947,17 x + 161,57$	17,86 - 1,11	0,9992
4-tOP	$y = 1141,2 x + 541,58$	18,91 - 1,18	0,9991
NP-r	$y = 444,85 x + 703,52$	78,13 - 2,44	0,9911

b) Calculs des limites de détection et de quantification

Le calcul des limites de détection et de quantification a été réalisé selon la méthode publiée par Vial et Jardy (1999). Brièvement, une droite d'étalonnage a été tracée (moyenne de l'aire sous le pic de l'analyte en fonction de la concentration de l'analyte). A partir des valeurs de la moyenne de l'aire sous le pic en fonction du coefficient de variation, une courbe de tendance à régression logarithmique a ainsi été tracée. La LOQ a été déterminée en rapportant sur la droite d'étalonnage l'aire correspondant à 10% de coefficient de variation déterminée sur la courbe logarithmique. La LOD a été obtenue en divisant ce résultat par 3,3. Les limites obtenues ont été reportées dans le Tableau 21.

Tableau 21. Limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) par analyte exprimées en ng/mL et ng/g de sédiment sec.

Analyte	LOQ		LOD	
	ng/mL	ng/g de séd sec	ng/mL	ng/g de séd sec
Nap	0,2999	0,2987	0,0909	0,0905
1-méthyl	0,2552	0,2542	0,0773	0,0770
2-méthyl	0,3448	0,3433	0,1045	0,1040
Ace	0,0312	0,0310	0,0094	0,0094
Fluo	0,0706	0,0703	0,0214	0,0213
Phe	0,1050	0,1045	0,0318	0,0317
Ant	0,0112	0,0112	0,0034	0,0034
Fla	0,1063	0,1059	0,0322	0,0321
Pyr	0,0889	0,0885	0,0269	0,0268
B(a)ant	0,1155	0,1151	0,0350	0,0349
Chry	0,2496	0,2486	0,0756	0,0753
B(b)fla	0,1693	0,1686	0,0513	0,0511
B(k)fla	0,0179	0,0178	0,0054	0,0054
B(a)pyr	0,1190	0,1186	0,0361	0,0359
D(ah)ant	0,1999	0,1990	0,0606	0,0603
B(ghi)per	0,3776	0,3761	0,1144	0,1140
BPA	0,7056	0,7027	0,2138	0,2129
BP	0,7151	0,7121	0,2167	0,2158
4-tOP	0,9335	0,9297	0,2829	0,2817
NP-r	1,9120	1,9042	0,5794	0,5770

c) Corrections apportées aux résultats

Différentes corrections ont été apportées aux résultats. Une correction a été appliquée pour tenir compte des blancs. Les valeurs des blancs étaient assez élevées pour les composés les plus polaires (BAP et AP) alors qu'elles étaient faibles ou nulles pour les moins polaires (HAP). Pour expliquer ces valeurs, il a été supposé une contamination par les solvants recyclés utilisés principalement après le lavage manuel du matériel (verrerie et cellules) pour

éliminer les résidus potentiels de produits de lavage et d'eau. Une correction a également été apportée pour tenir compte des rendements d'extraction des différents analytes (Tableau 22). Ces rendements d'extraction ont été estimés à l'aide de l'analyse d'un CRM pour les HAP et à l'aide de sédiments dopés pour les AP et le BPA. Enfin, une dernière correction a été apportée pour tenir compte de la filtration réalisée avant analyse. Pour ce faire, deux niveaux de concentration d'étalons ont été filtrés et comparés avant filtration. La perte était d'environ 10% pour l'ensemble des analytes (Tableau 22).

Tableau 22. Rendements (%) de filtration et d'extraction par analyte

Analyte	Rendements (%)	
	Filtration	Extraction
Nap	92	40
1-méthyl	92	55
2-méthyl	92	73
Ace	92	42
Fluo	91	54
Phe	93	58
Ant	92	10
Fla	92	65
Pyr	97	47
B(a)ant	93	34
Chry	93	125
B(b)fla	96	48
B(k)fla	94	69
B(a)pyr	97	28
D(ah)ant	99	59
B(ghi)per	98	82
BPA	91	54
BP	90	267
4-tOP	91	47
NP-r	86	60

II.2.8. Analyses statistiques

La normalité des données a été soumise au test de normalité de Shapiro Wilk et l'hypothèse de normalité a été rejetée au seuil de significativité de 5%. Il a ainsi été réalisé des tests non paramétriques de Kruskal Wallis (KW) avec test *post hoc* de la comparaison multiple afin de tester les différences entre les saisons, les sites et les zones d'échantillonnage. La différence a été considérée significative au seuil de significativité de 5% ($p < 0,05$). La corrélation entre l'activité TTR et les différents contaminants a été réalisée par une Analyse en Composantes Principales (ACP) selon la méthode de Pearson (1901). L'ensemble des analyses statistiques ont été effectuées au moyen du logiciel Statistica 7 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

II.3. Résultats et discussion

II.3.1. Profils et concentrations des HAP dans les échantillons

II.3.1.1. Étude des profils des HAP

Concernant les extraits sédimentaires, l'ensemble des HAP ont été détectés, sur tous les sites et à toutes les saisons, aussi bien en zone intertidale qu'en zone subtidale. L'étude du profil des HAP sur les prélèvements sédimentaires a permis de faire ressortir deux groupes de composés (Figure 20 et Figure 21) : les 7 HAP les plus légers comprenant le Nap, le 1 méthy, le 2 méthy, le Ace, le Fluo, le Phe et le Ant d'une part, et les 9 HAP les plus lourds comprenant le Fla, le Pyr, le B(a)ant, le Chry, le B(b)fla, le B(k)fla, le B(a)pyr, le D(ah) et le B(ghi)per d'autre part. Quel que soit le site, la saison ou la zone de vase, les HAP les plus légers (2 à 3 cycles) sont les moins représentés (moyenne de 16,5%) tandis que les HAP les plus lourds (4 à 6 cycles) représentent en moyenne 83,5% des HAP totaux. La proportion des HAP les plus légers variait de 0,6% pour l'Ace à 6,7% pour le Phe, tandis que celle pour les plus lourds variait de 4% pour le D(ah)ant à 12,9% pour le B(a)pyr. Néanmoins, ces observations entre HAP lourds et légers doivent être modérées. Du fait notamment de la volatilité de ces derniers, des pertes lors du protocole de préparation des échantillons ne sont pas à exclure. Il est cependant observé que le B(a)ant était plus représenté en vase subtidale qu'en vase intertidale en variant de 9,3% à 15,3%. Pour le B(ghi)per le contraire a été observé avec des taux variant de 10,4% à 4,3%. Une distribution tendant vers les HAP les plus lourds a également été observée par Vane *et al.* (2007) dans l'estuaire Mersey (Royaume Unis). Parmi les HAP lourds, des taux plus faibles en B(k)fla et en D(ah)ant ont été constatés par ces auteurs, comme observé dans la présente étude (respectivement 5,3% et 4,0% des HAP totaux).

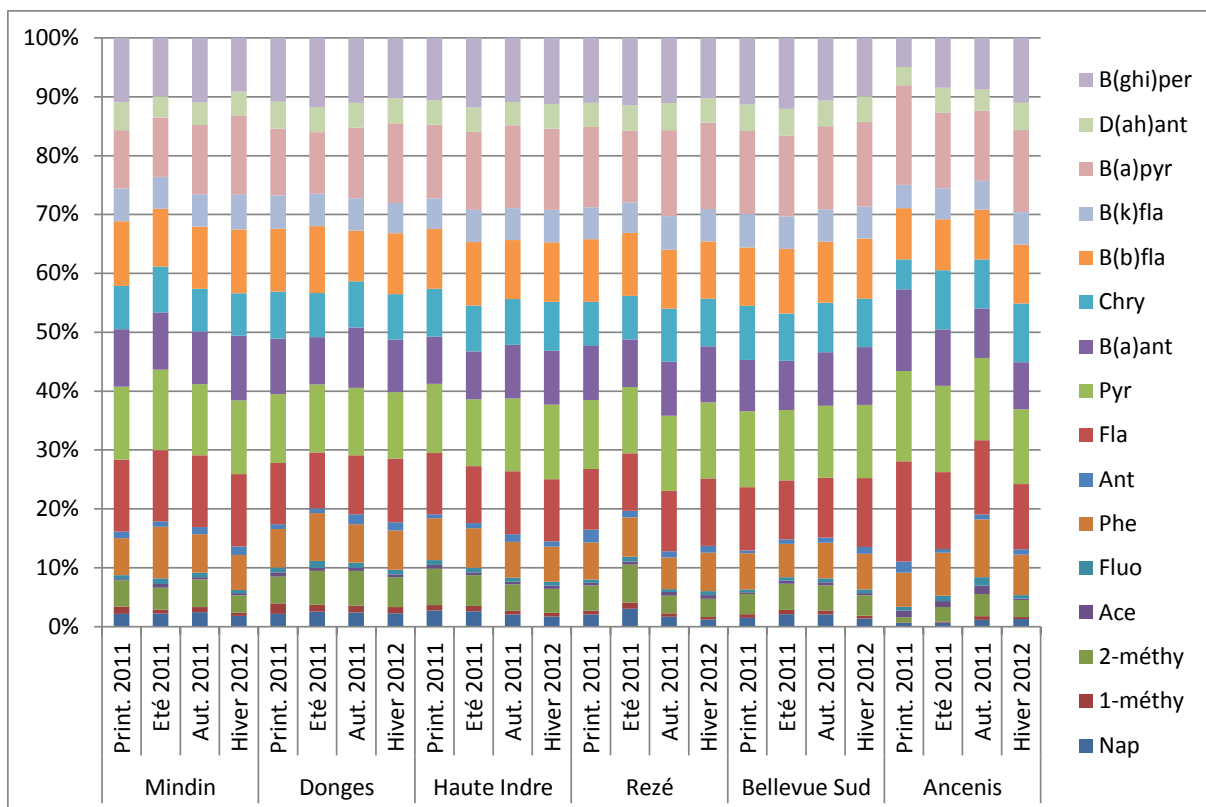


Figure 20. Profils de contamination en HAP des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison

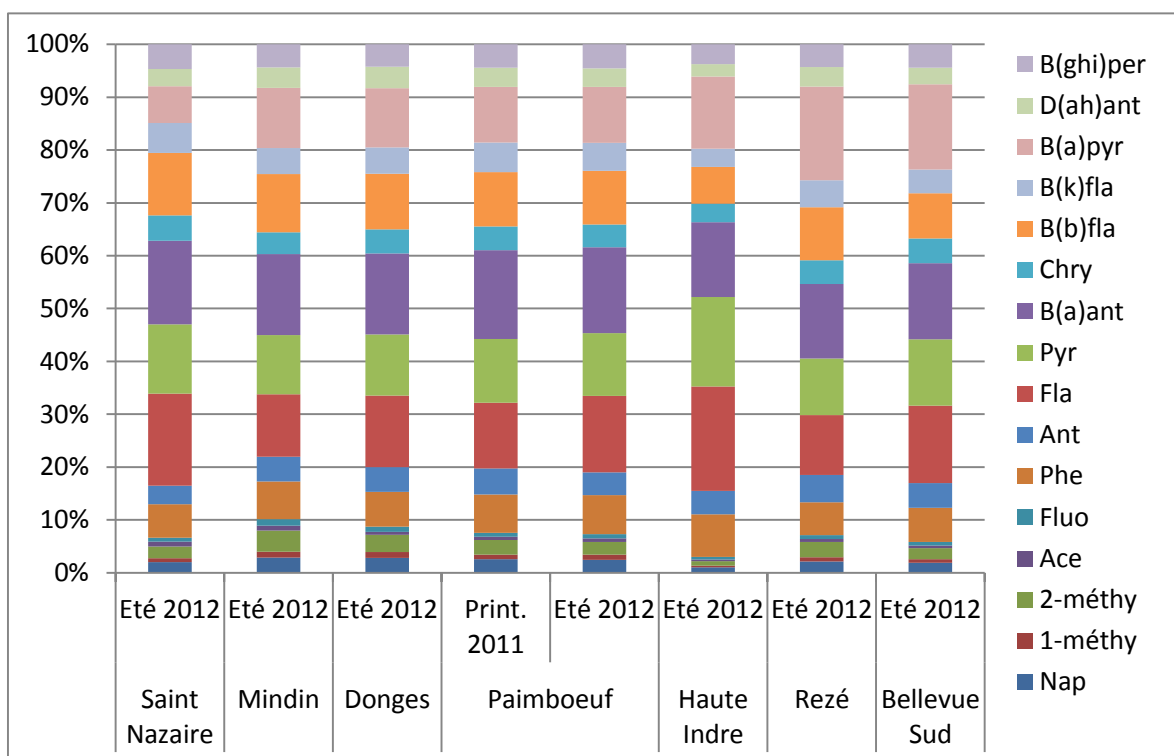


Figure 21. Profils de contamination en HAP des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison

Concernant les capteurs passifs (Tableau 23), quatre HAP ont été détectés, le Nap, le Phe, l'Ant et le Pyr. Il est à rappeler que les capteurs passifs ont subi des évaporations à sec, ce qui n'assure pas d'avoir la totalité des HAP les plus légers.

Tableau 23. Concentrations en HAP par ng/g de phase stationnaire séquestrée dans les capteurs passifs

Site	Haute Indre	
Saison	Printemps 2013	
Unité	ng/g de phase stationnaire	
∑ HAP	10,88	± 16,25
Nap	4,17	± 7,22
1-méthy	0,00	± 0,00
2-méthy	0,00	± 0,00
Ace	0,00	± 0,00
Fluo	0,00	± 0,00
Phe	2,26	± 1,33
Ant	0,14	± 0,24
Fla	0,00	± 0,00
Pyr	4,32	± 7,48
B(a)ant	0,00	± 0,00
Chry	0,00	± 0,00
B(b)fla	0,00	± 0,00
B(k)fla	0,00	± 0,00
B(a)pyr	0,00	± 0,00
D(ah)ant	0,00	± 0,00
B(ghi)per	0,00	± 0,00

Les propriétés physico-chimiques des HAP expliquent plutôt bien ces observations. En effet, leur solubilité est faible et est inversement proportionnelle au nombre de cycles qu'ils possèdent. Ces propriétés peuvent expliquer la proportion plus importante des HAP lourds (5/6 cycles) et intermédiaires (4 cycles) par rapport aux HAP les plus légers (2/3 cycles) dans les sédiments. De plus, le coefficient de partage octanol/eau (logP) varie de 3 à 7 pour la majorité des HAP, ce qui leur confère un fort caractère lipophile. Cette propriété leur donne ainsi une forte affinité avec la matière organique. Concernant les capteurs passifs, une rétention plus marquée des HAP légers aurait été attendue (hydrosolubilité plus importante que pour les HAP plus lourds). Une forte proportion du Nap (38,3%), du Phe (20,8%) et du Pyr (39,7%) ont été retrouvées dans les extraits des capteurs passifs. Dans une précédente étude, Cailleaud *et al.* (2007) ont également retrouvé des proportions majoritaires en Phe (15%) et en Pyr (27%) dans l'estuaire de la Seine. Le nombre restreint de données sur les capteurs passifs rend cependant l'interprétation difficile. Aucun HAP lourd n'ayant été détecté dans les capteurs passifs, les résultats obtenus restent cohérents avec les résultats attendus (c'est-à-dire une proportion plus importante des HAP légers par rapport aux HAP lourds).

L'évaporation à sec lors de la préparation des échantillons a sans doute mené à une perte des HAP les plus légers mais malgré cela les proportions des HAP les plus légers retrouvés dans les extraits des capteurs passifs sont les plus élevées (sauf le Pyr classé parmi les HAP intermédiaires).

Il a été montré, notamment par Manodori *et al.* (2006), que les ratios Phe/Ant et Fluo/Pyr permettaient de caractériser l'origine pétrogénique ou pyrogénique des HAP (Manodori *et al.*, 2006). Une source d'HAP d'origine pyrogénique est ainsi caractérisée par un ratio Phe/Ant < 10 et un ratio Fluo/Pyr > 1 tandis que des ratios Phe/Ant > 10 et Fluo/Pyr < 1 reflètent une source de HAP d'origine pétrogénique. Dans la présente étude, ces ratios indiquent une source pétrogénique des HAP en phase dissoute, et un mélange entre source pétrogénique et pyrogénique dans les sédiments sur la moyenne des sites. Compte tenu des informations limitées sur les capteurs passifs et des diverses évaporations à sec qu'ont subi les extraits, ces interprétations restent conditionnelles. Concernant les sédiments des sites analysés individuellement, Haute Indre (printemps), Bellevue Sud (printemps) et Ancenis (été et automne) semblent être contaminés par des HAP provenant essentiellement de sources pétrogéniques, alors que les autres sites (Rezé, Donges et Mindin) sont marqués par la présence de HAP provenant de sources diverses (Tableau 24).

Tableau 24. Ratio Phénanthrene/Antracène Fluorène/Pyrène et sources potentielles de contamination en HAP associées par site de prélèvements et en fonction de la saison

Zone	Site	Saison	Ratio Phe/Ant	Ratio Fluo/Pyr	Sources
Intertidale	Mindin	Printemps 2011	5,75	0,05	Variées
		Été 2011	9,75	0,07	Variées
		Automne 2011	5,40	0,06	Variées
		Hiver 2012	4,20	0,04	Variées
	Donges	Printemps 2011	8,25	0,07	Variées
		Été 2011	9,83	0,10	Variées
		Automne 2011	3,85	0,08	Variées
		Hiver 2012	4,74	0,07	Variées
	Haute Indre	Printemps 2011	10,57	0,07	Pétrogéniques
		Été 2011	7,81	0,06	Variées
		Automne 2011	4,72	0,05	Variées
		Hiver 2012	6,53	0,05	Variées
	Rezé	Printemps 2011	2,92	0,05	Variées
		Été 2011	6,00	0,07	Variées
		Automne 2011	5,10	0,04	Variées
		Hiver 2012	5,59	0,05	Variées
	Bellevue Sud	Printemps 2011	13,38	0,04	Pétrogéniques
		Été 2011	7,26	0,05	Variées
		Automne 2011	6,96	0,06	Variées
		Hiver 2012	5,29	0,05	Variées
Ancenis	Printemps 2011	3,11	0,04	Variées	
	Été 2011	11,10	0,06	Pétrogéniques	
	Automne 2011	12,01	0,10	Pétrogéniques	
	Hiver 2012	7,78	0,05	Variées	
Subtidale	Saint Nazaire	Été 2012	1,83	0,06	Variées
	Mindin	Été 2012	1,54	0,11	Variées
	Donges	Été 2012	1,42	0,08	Variées
	Paimboeuf	Printemps 2012	1,47	0,06	Variées
		Été 2012	1,69	0,07	Variées
	Haute Indre	Été 2012	1,82	0,03	Variées
	Rezé	Été 2012	1,20	0,07	Variées
	Bellevue Sud	Été 2012	1,38	0,06	Variées

II.3.1.2. Étude des variations saisonnières et de l'effet site en vasière intertidale

L'ensemble des résultats sur l'étude des variations saisonnières et de l'effet « site » en vasière intertidale ont été reportés en Tableau 25. En vasière intertidale et pour la somme des HAP, aucune différence significative n'a été observée entre les saisons (Kruskal Wallis, $p < 0,05$). Il a cependant été identifié des différences pour le Nap et le 1-méthy pour le site de Rezé entre les sédiments prélevés en été, significativement plus contaminés (respectivement $25,03 \pm 8,16$ et $8,80 \pm 3,45$ ng/g de sédiment sec) que ceux prélevés durant l'hiver (respectivement $12,16 \pm 2,21$ et $4,37 \pm 0,29$ ng/g de sédiment sec). Ces différences ne sont plus significatives lorsque les concentrations sont normalisées à l'aide du COT. Des différences ont également été observées pour l'Ace, le Fluo, le Fla et le B(a)ant pour le site d'Ancenis où les sédiments prélevés au printemps étaient significativement plus contaminés que ceux prélevés durant l'hiver avec pour l'Ace $284,4 \pm 204,0$ contre $3,00 \pm 0,60$ ng/g de sédiment sec (8032 ± 5765

contre $42,06 \pm 8,38$ ng/g de COT), pour le Fluo $148,90 \pm 106,90$ contre $7,22 \pm 0,62$ ng/g de sédiment sec (4205 ± 3022 contre $101,1 \pm 8,72$ ng/g de COT), pour le Fla 4177 ± 3795 contre $137,3 \pm 9,29$ ng/g de sédiment sec (117959 ± 107235 contre $1922 \pm 130,1$ ng/g de COT) et pour le B(a)ant 3408 ± 3502 contre $98,45 \pm 24,11$ ng/g de sédiment sec (362458 ± 98947 contre $1379 \pm 337,7$ ng/g de COT). Ces différences ont été constatées indifféremment pour des concentrations normalisées ou non sauf dans le cas du B(a)ant où seuls les résultats exprimés en fonction du COT étaient significativement différents. Enfin, il a été observé une autre différence pour le Fla sur le site de Bellevue Sud où les sédiments prélevés au printemps ($2322 \pm 396,6$ ng/g de COT) étaient significativement moins contaminés que ceux prélevés en hiver (4786 ± 1192 ng/g de COT). On remarque ainsi des différences significatives en amont de l'estuaire entre le printemps/été où les concentrations sont plus élevées que pendant l'hiver, excepté pour le Fla à Bellevue Sud pour les concentrations rapportées au COT où l'inverse est observé.

Ces résultats saisonniers sont certainement liés aux forts débits hivernaux (crues) qui peuvent participer à une importante remise en suspension des sédiments et une dilution importante des contaminants (Brinkmann *et al.*, 2013). Selon les années, la période de crue de la Loire s'étend de novembre à février, et peut se prolonger jusqu'au mois d'avril.

En vasière intertidale, aucune différence significative dans les concentrations en somme de HAP ou de chaque analyte n'a été constatée entre les sites sur la moyenne annuelle (Kruskal Wallis, $p < 0,05$). Pour la somme des HAP, aucune différence significative n'a été observée entre les sites au sein d'une même saison. Des différences ont malgré tout été observées pour trois analytes, entre les sites de Mindin/Donges (aval) et d'Ancenis (amont). Il a ainsi été observé des différences significatives pour le 1-méthyl pendant l'hiver avec des concentrations plus élevées à Donges qu'à Ancenis ($378,8 \pm 159,5$ ng/g de COT contre $61,36 \pm 15,81$ ng/g de COT), pour l'Ace pendant le printemps et l'automne avec des concentrations significativement plus faibles à Mindin qu'à Ancenis (printemps : $1,29 \pm 0,58$ et $284,4 \pm 204,0$ ng/g de sédiment sec ; automne : $2,53 \pm 1,07$ et $30,09 \pm 26,71$ ng/g de sédiment sec, respectivement) et pour le Fla pendant l'hiver avec des concentrations plus élevées à Mindin qu'à Ancenis ($6475 \pm 612,9$ ng/g de COT contre $1922 \pm 130,1$ ng/g de COT). On remarque ainsi un effet « site » entre l'amont et l'aval de l'estuaire pendant l'hiver où Donges et Mindin sont significativement plus contaminés qu'Ancenis pour le 1-méthyl et le Fla. Pour l'Ace, pendant l'automne et le printemps, Ancenis est significativement plus contaminé que Mindin.

Les concentrations de 1-méthy et de Fla plus élevées dans les sites de Mindin/Donges par rapport à Ancenis pourraient s'expliquer par la proximité de la raffinerie de Donges. Une étude des effluents industriels dans cette zone pourrait confirmer cette hypothèse. Concernant l'Ace, le site d'Ancenis semble plus contaminé que les sites plus en aval. Ces résultats s'expliquent notamment par le fort taux de carbone organique total (COT) dans les sédiments d'Ancenis.

Tableau 25. Résultats des contaminations par les HAP en zone intertidale exprimés en ng/g de sédiment sec et en ng/g de COT: comparaison entre les saisons et les sites

Zone	Site	Saison	Unité	Σ HAP	Nap	1-méthyl	2-méthyl	Ace	Fluo	Phe	Ant	Fla	
Intertidale	Ancenis	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	1239,9 ± 348,5 a d	16,0 ± 4,3 a d	4,4 ± 1,1 a d	35,5 ± 20,0 a d	3,0 ± 0,6 b d	7,2 ± 0,6 b d	85,6 ± 37,4 a d	11,0 ± 11,7 a d	137,3 ± 9,3 b d	
			[C] (n/g COT)	17365,1 ± 4880,4 a d	224,2 ± 59,7 a d	61,4 ± 15,8 a e	497,1 ± 280,4 a d	42,1 ± 8,4 b d	101,1 ± 8,7 b d	1199,2 ± 523,4 a d	154,1 ± 164,3 a d	1922,3 ± 130,1 b e	
		Automne 2011	[C] (ng/g séd)	2131,8 ± 1276,7 a d	24,8 ± 6,0 a d	12,8 ± 9,8 a d	80,0 ± 56,0 a d	30,1 ± 26,7 ab e	31,3 ± 24,0 ab d	209,5 ± 148,2 a d	17,4 ± 11,2 a d	268,8 ± 134,0 ab d	
			[C] (n/g COT)	25947,4 ± 15544,9 a d	302,3 ± 73,0 a d	156,2 ± 119,9 a d	974,2 ± 681,4 a d	366,2 ± 325,2 ab d	380,4 ± 291,7 ab d	2549,6 ± 1804,7 a d	212,2 ± 136,3 a d	3271,3 ± 1631,1 ab d	
		Été 2011	[C] (ng/g séd)	1661,2 ± 716,6 a d	10,6 ± 4,1 a d	3,9 ± 2,3 a d	40,7 ± 27,6 a d	17,0 ± 16,2 ab d	15,4 ± 9,8 ab d	120,7 ± 64,0 a d	10,9 ± 10,1 a d	216,5 ± 85,4 ab d	
			[C] (n/g COT)	41947,3 ± 18094,7 a d	268,3 ± 103,1 a d	98,1 ± 59,1 a d	1028,7 ± 696,5 a d	430,0 ± 408,7 ab d	388,1 ± 247,1 ab d	3046,7 ± 1615,2 a d	274,4 ± 254,1 a d	5466,6 ± 2156,2 ab d	
		Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	16380,6 ± 19309,3 a d	147,7 ± 90,2 a d	32,2 ± 10,9 a d	208,7 ± 13,7 a d	284,4 ± 204,0 a e	148,9 ± 106,9 a d	1435,8 ± 636,7 a d	461,5 ± 583,5 a d	4176,7 ± 3794,8 a d	
			[C] (n/g COT)	462589,5 ± 545512,4 a d	4170,4 ± 2549,9 a d	907,8 ± 308,4 a d	5890,8 ± 380,8 a d	8032,6 ± 5765,5 a d	4205,0 ± 3021,5 a d	40541,7 ± 18012,0 a d	13036,5 ± 16483,6 a d	117959,2 ± 107235,9 a d	
		Bellevue Sud	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	960,4 ± 103,7 a d	13,2 ± 1,8 a d	4,8 ± 1,5 a d	32,7 ± 19,9 a d	3,8 ± 1,2 a d	6,3 ± 1,2 a d	57,9 ± 15,7 a d	10,9 ± 17,7 a d	112,4 ± 28,1 a d
				[C] (n/g COT)	40902,7 ± 4445,3 a d	563,0 ± 78,6 a d	204,9 ± 63,7 a de	1393,6 ± 850,3 a d	162,5 ± 52,8 a d	269,0 ± 52,8 a d	2465,7 ± 672,0 a d	465,3 ± 753,5 a d	4786,4 ± 1192,1 b de
			Automne 2011	[C] (ng/g séd)	1068,1 ± 353,4 a d	21,9 ± 8,6 a d	7,3 ± 2,5 a d	45,4 ± 29,1 a d	5,6 ± 2,4 a de	7,5 ± 4,3 a d	64,5 ± 22,0 a d	9,3 ± 11,6 a d	108,6 ± 12,9 a d
				[C] (n/g COT)	36302,6 ± 11994,1 a d	745,7 ± 290,8 a d	249,6 ± 86,1 a d	1541,3 ± 989,0 a d	189,0 ± 80,1 a d	255,2 ± 145,9 a d	2193,7 ± 747,8 a d	315,3 ± 395,3 a d	3690,9 ± 437,3 ab d
	Été 2011		[C] (ng/g séd)	848,2 ± 250,3 a d	17,7 ± 2,6 a d	6,3 ± 0,7 a d	37,8 ± 13,8 a d	4,5 ± 1,9 a d	5,0 ± 1,5 a d	48,0 ± 18,2 a d	6,6 ± 8,7 a d	85,0 ± 12,1 a d	
			[C] (n/g COT)	26663,3 ± 7860,2 a d	557,4 ± 82,8 a d	198,7 ± 21,0 a d	1187,2 ± 435,1 a d	141,8 ± 59,4 a d	158,3 ± 46,7 a d	1508,0 ± 571,3 a d	207,7 ± 273,2 a d	2670,7 ± 380,2 ab d	
	Printemps 2011		[C] (ng/g séd)	829,8 ± 312,7 a d	12,3 ± 2,8 a d	5,1 ± 1,4 a d	28,7 ± 15,6 a d	2,6 ± 0,5 a de	3,8 ± 0,8 a d	51,2 ± 15,4 a d	3,8 ± 4,4 a d	89,2 ± 15,3 a d	
			[C] (n/g COT)	21600,4 ± 8136,0 a d	319,4 ± 73,3 a d	132,8 ± 36,5 a d	746,3 ± 406,6 a d	66,5 ± 14,1 a d	97,7 ± 22,1 a d	1333,7 ± 401,5 a d	99,7 ± 115,7 a d	2321,7 ± 396,6 a d	
	Rezé		Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	1004,1 ± 266,6 a d	12,2 ± 2,2 b d	4,4 ± 0,3 b d	30,9 ± 18,6 a d	6,5 ± 3,6 a d	6,4 ± 3,3 a d	65,5 ± 29,5 a d	11,7 ± 13,5 a d	115,4 ± 21,3 a d
				[C] (n/g COT)	43662,7 ± 11596,0 a d	528,7 ± 96,2 a d	190,0 ± 12,7 a de	1345,0 ± 807,5 a d	283,0 ± 158,3 a d	279,9 ± 143,6 a d	2848,3 ± 1285,0 a d	509,4 ± 586,1 a d	5017,4 ± 926,6 a de
			Automne 2011	[C] (ng/g séd)	1032,8 ± 445,8 a d	17,5 ± 3,0 ab d	5,7 ± 0,6 ab d	31,1 ± 15,0 a d	6,4 ± 3,1 a de	5,1 ± 2,0 a d	55,5 ± 21,1 a d	10,9 ± 11,5 a d	105,9 ± 32,9 a d
				[C] (n/g COT)	55147,5 ± 23768,9 a d	934,1 ± 157,9 a d	303,6 ± 30,1 a d	1663,0 ± 797,3 a d	344,4 ± 165,6 a d	274,2 ± 104,0 a d	2963,7 ± 1125,3 a d	581,4 ± 613,4 a d	5655,7 ± 1750,4 a d
		Été 2011	[C] (ng/g séd)	824,1 ± 204,0 a d	25,0 ± 8,2 a d	8,8 ± 3,4 a d	53,0 ± 31,9 a d	4,4 ± 0,9 a d	6,8 ± 2,0 a d	54,9 ± 14,3 a d	9,2 ± 7,1 a d	80,5 ± 5,1 a d	
			[C] (n/g COT)	26352,7 ± 6536,5 a d	800,5 ± 261,3 a d	281,4 ± 110,4 a d	1694,6 ± 1021,0 a d	139,9 ± 28,5 a d	216,5 ± 64,2 a d	1755,4 ± 458,1 a d	292,5 ± 228,2 a d	2574,7 ± 162,2 a d	
		Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	902,0 ± 134,1 a d	18,6 ± 3,1 ab d	6,1 ± 0,9 ab d	38,4 ± 20,3 a d	3,9 ± 0,8 a de	5,2 ± 1,1 a d	56,8 ± 8,7 a d	19,5 ± 16,6 a d	93,0 ± 13,8 a d	
			[C] (n/g COT)	28207,9 ± 4207,4 a d	581,9 ± 96,0 a d	190,5 ± 29,4 a d	1202,0 ± 635,3 a d	122,9 ± 25,4 a d	163,9 ± 33,0 a d	1777,8 ± 271,6 a d	609,6 ± 518,9 a d	2906,9 ± 429,6 a d	
		Haute Indre	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	1168,6 ± 441,8 a d	20,0 ± 3,6 a d	7,3 ± 1,9 a d	47,7 ± 23,7 a d	6,1 ± 2,5 a d	7,7 ± 2,6 a d	69,7 ± 27,5 a d	10,7 ± 11,1 a d	123,5 ± 18,4 a d
				[C] (n/g COT)	38952,4 ± 14725,2 a d	668,2 ± 119,6 a d	244,3 ± 64,4 a de	1591,4 ± 788,6 a d	203,0 ± 83,0 a d	258,2 ± 85,9 a d	2322,9 ± 917,3 a d	355,9 ± 370,9 a d	4116,6 ± 614,0 a de
			Automne 2011	[C] (ng/g séd)	931,9 ± 186,9 a d	19,2 ± 6,2 a d	6,4 ± 1,7 a d	41,4 ± 21,1 a d	4,2 ± 0,1 a de	6,1 ± 2,0 a d	57,1 ± 14,9 a d	12,1 ± 14,0 a d	99,4 ± 9,8 a d
				[C] (n/g COT)	39428,7 ± 7868,9 a d	814,0 ± 261,1 a d	271,2 ± 72,6 a d	1749,9 ± 893,3 a d	178,0 ± 4,9 a d	256,2 ± 84,9 a d	2415,6 ± 629,2 a d	512,1 ± 592,7 a d	4204,5 ± 419,2 a d
	Été 2011		[C] (ng/g séd)	867,9 ± 269,4 a d	22,5 ± 3,6 a d	8,1 ± 1,7 a d	45,4 ± 22,5 a d	4,2 ± 1,1 a d	6,4 ± 2,5 a d	58,4 ± 17,2 a d	7,5 ± 6,6 a d	84,1 ± 14,5 a d	
			[C] (n/g COT)	27373,5 ± 8494,7 a d	710,2 ± 114,4 a d	254,7 ± 53,7 a d	1431,0 ± 710,2 a d	133,5 ± 33,9 a d	202,2 ± 79,3 a d	1841,7 ± 542,0 a d	235,8 ± 207,8 a d	2653,1 ± 458,7 a d	
	Printemps 2011		[C] (ng/g séd)	1000,0 ± 353,6 a d	27,3 ± 12,9 a d	9,1 ± 4,4 a d	62,3 ± 43,0 a d	6,2 ± 4,2 a de	8,3 ± 5,1 a d	70,8 ± 36,7 a d	6,7 ± 7,1 a d	104,2 ± 19,0 a d	
			[C] (n/g COT)	28254,3 ± 9992,0 a d	771,6 ± 364,9 a d	256,4 ± 123,9 a d	1761,3 ± 1214,9 a d	175,3 ± 119,5 a d	233,8 ± 144,5 a d	1999,0 ± 1036,6 a d	189,1 ± 200,5 a d	2942,9 ± 537,7 a d	
	Donges		Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	949,4 ± 144,7 a d	21,5 ± 8,3 a d	9,9 ± 4,2 a d	48,3 ± 28,8 a d	4,8 ± 2,0 a d	7,4 ± 2,4 a d	63,2 ± 12,7 a d	13,3 ± 14,9 a d	102,3 ± 36,8 a d
				[C] (n/g COT)	36490,5 ± 5545,9 a d	825,8 ± 320,5 a d	378,8 ± 159,5 a d	1856,5 ± 1106,4 a d	185,4 ± 75,4 a d	283,9 ± 93,0 a d	2430,5 ± 488,2 a d	512,9 ± 572,6 a d	3933,4 ± 1417,9 a de
			Automne 2011	[C] (ng/g séd)	798,3 ± 214,9 a d	19,3 ± 6,5 a d	9,2 ± 4,6 a d	47,2 ± 31,5 a d	4,3 ± 3,2 a de	6,9 ± 3,8 a d	52,0 ± 15,8 a d	13,5 ± 19,4 a d	80,1 ± 12,7 a d
				[C] (n/g COT)	35767,3 ± 9612,8 a d	866,7 ± 292,9 a d	410,4 ± 206,7 a d	2113,7 ± 1410,6 a d	191,9 ± 145,0 a d	307,2 ± 168,9 a d	2331,4 ± 706,2 a d	605,5 ± 870,0 a d	3588,3 ± 570,5 a d
		Été 2011	[C] (ng/g séd)	778,5 ± 339,8 a d	19,8 ± 3,3 a d	9,2 ± 3,2 a d	44,8 ± 23,4 a d	3,9 ± 2,2 a d	9,1 ± 6,1 a d	63,2 ± 35,7 a d	6,4 ± 2,6 a d	73,8 ± 22,4 a d	
			[C] (n/g COT)	31033,6 ± 13553,6 a d	790,9 ± 130,4 a d	366,5 ± 125,9 a d	1785,0 ± 934,1 a d	155,9 ± 87,9 a d	362,4 ± 243,4 a d	2519,8 ± 1423,6 a d	256,4 ± 103,5 a d	2941,6 ± 893,3 a d	
		Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	837,1 ± 300,4 a d	18,0 ± 4,0 a d	15,0 ± 9,1 a d	38,3 ± 21,8 a d	6,1 ± 4,6 a de	6,6 ± 3,0 a d	55,0 ± 24,1 a d	6,7 ± 6,4 a d	87,0 ± 18,5 a d	
			[C] (n/g COT)	31715,8 ± 11386,0 a d	680,9 ± 152,1 a d	366,7 ± 346,2 a d	1451,9 ± 825,0 a d	230,3 ± 174,9 a d	249,3 ± 113,7 a d	2082,7 ± 913,0 a d	252,4 ± 242,8 a d	3297,9 ± 702,3 a d	
		Mindin	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	475,5 ± 344,2 a d	12,2 ± 4,2 a d	3,4 ± 1,1 a d	19,7 ± 11,1 a d	2,8 ± 1,1 a d	3,6 ± 1,1 a d	39,7 ± 15,3 a d	9,4 ± 9,9 a d	82,2 ± 7,8 a d
				[C] (n/g COT)	37464,3 ± 27124,0 a d	962,1 ± 330,6 a d	265,2 ± 86,5 a de	1555,6 ± 876,4 a d	219,3 ± 85,6 a d	282,4 ± 85,0 a d	3129,3 ± 1205,3 a d	744,2 ± 780,8 a d	6474,8 ± 612,9 a d
			Automne 2011	[C] (ng/g séd)	699,5 ± 99,9 a d	17,2 ± 3,8 a d	6,2 ± 2,0 a d	32,8 ± 17,9 a d	2,5 ± 1,1 a d	5,3 ± 2,1 a d	45,9 ± 4,9 a d	8,5 ± 9,6 a d	85,3 ± 30,7 a d
				[C] (n/g COT)	33189,7 ± 4760,8 a d	815,0 ± 182,9 a d	293,5 ± 96,4 a d	1556,6 ± 849,5 a d	120,2 ± 51,0 a d	251,9 ± 99,9 a d	2177,3 ± 234,7 a d	402,9 ± 455,7 a d	4044,4 ± 1453,6 a d
	Été 2011		[C] (ng/g séd)	786,2 ± 277,4 a d	17,2 ± 7,1 a d	5,4 ± 2,1 a d	29,4 ± 18,1 a d	4,9 ± 3,0 a d	7,4 ± 2,6 a d	69,0 ± 21,2 a d	7,1 ± 3,6 a d	95,2 ± 11,5 a d	
			[C] (n/g COT)	50429,0 ± 17809,4 a d	1102,9 ± 457,0 a d	346,6 ± 131,9 a d	1888,2 ± 1159,3 a d	316,7 ± 192,6 a d	476,6 ± 168,8 a d	4425,8 ± 1358,3 a d	453,6 ± 228,3 a d	6103,2 ± 741,7 a d	
	Printemps 2011		[C] (ng/g séd)	763,8 ± 110,3 a d	16,5 ± 7,8 a d	9,6 ± 6,0 a d	34,1 ± 21,8 a d	1,3 ± 0,6 a d	5,2 ± 1,7 a d	48,2 ± 4,2 a d	8,4 ± 8,7 a d	93,3 ± 36,5 a d	
			[C] (n/g COT)	35237,7 ± 5113,9 a d	762,0 ± 362,0 a d	444,8 ± 276,5 a d	1572,5 ± 1005,1 a d	59,4 ± 26,8 a d	238,5 ± 77,1 a d	2223,7 ± 193,6 a d	386,5 ± 399,3 a d	4301,9 ± 1677,2 a d	

Zone	Site	Saison	Unité	Pyr	B(a)ant	Chry	B(b)fla	B(k)fla	B(a)pyr	D(ah)ant	B(ghi)per
Intertidale	Ancenis	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	158,2 ± 46,1 a d	98,4 ± 24,1 a d	123,8 ± 78,7 a d	124,4 ± 17,8 a d	67,9 ± 23,0 a d	173,4 ± 40,7 a d	57,1 ± 26,0 a d	136,6 ± 82,0 a d
		Automne 2011	[C] (n/g COT)	2215,1 ± 644,9 a d	1378,8 ± 337,7 b d	1734,5 ± 1101,9 a d	1742,0 ± 249,6 a d	951,4 ± 321,7 a d	2428,3 ± 570,6 a d	800,2 ± 363,4 a d	1913,3 ± 1148,0 a d
			[C] (ng/g séd)	298,1 ± 199,8 a d	179,3 ± 74,6 a d	177,3 ± 141,5 a d	181,0 ± 82,4 a d	104,1 ± 61,0 a d	253,1 ± 149,0 a d	77,4 ± 52,8 a d	186,8 ± 140,9 a d
			[C] (n/g COT)	3628,0 ± 2433,1 a d	2182,1 ± 908,0 ab d	2158,3 ± 1722,6 a d	2203,4 ± 1003,5 a d	1266,8 ± 743,0 a d	3080,2 ± 1814,6 a d	942,2 ± 642,5 a d	2273,8 ± 1715,8 a d
	Été 2011	[C] (ng/g séd)	243,6 ± 139,1 a d	159,3 ± 40,2 a d	167,2 ± 119,0 a d	143,6 ± 41,4 a d	87,5 ± 37,8 a d	213,9 ± 65,3 a d	69,4 ± 35,0 a d	140,9 ± 92,0 a d	
		[C] (n/g COT)	6151,0 ± 3512,9 a d	4023,2 ± 1014,2 ab d	4222,6 ± 3003,6 a d	3627,0 ± 1046,3 a d	2209,5 ± 954,3 a d	5402,4 ± 1648,4 a d	1751,9 ± 883,8 a d	3558,8 ± 2322,1 a d	
	Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	3772,3 ± 2749,0 a d	3407,7 ± 3501,9 a d	1250,5 ± 457,9 a d	2133,2 ± 1605,1 a d	982,9 ± 515,1 a d	4161,5 ± 3780,4 a d	752,4 ± 418,2 a d	1214,6 ± 85,1 a d	
		[C] (n/g COT)	106528,1 ± 77700,9 a d	96245,1 ± 98947,9 a d	35307,4 ± 12958,5 a d	60241,9 ± 45368,2 a d	27753,5 ± 14567,3 a d	117528,5 ± 106828,4 a d	21246,0 ± 11824,8 a d	34289,5 ± 2433,6 a d	
	Bellevue Sud	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	119,4 ± 10,7 a d	94,5 ± 33,5 a d	79,0 ± 32,3 a d	98,0 ± 19,3 a d	52,6 ± 10,3 a d	137,9 ± 7,8 a d	41,5 ± 12,3 a d	95,3 ± 54,8 a d
		Automne 2011	[C] (n/g COT)	5083,9 ± 457,8 a d	4024,3 ± 1425,2 a d	3365,6 ± 1378,5 a d	4174,4 ± 826,3 a d	2242,3 ± 441,0 a d	5872,8 ± 331,6 a d	1769,1 ± 526,0 a d	4060,0 ± 2337,1 a d
			[C] (ng/g séd)	130,5 ± 40,6 a d	97,3 ± 0,3 a d	89,6 ± 51,7 a d	110,5 ± 44,0 a d	59,0 ± 23,0 a d	151,2 ± 37,8 a d	46,1 ± 21,2 a d	113,8 ± 72,4 a d
			[C] (n/g COT)	4436,1 ± 1377,5 a d	3308,6 ± 12,9 a d	3044,1 ± 1757,7 a d	3755,7 ± 1493,6 a d	2006,5 ± 780,6 a d	5138,5 ± 1281,0 a d	1565,3 ± 719,1 a d	3867,0 ± 2458,4 a d
	Été 2011	[C] (ng/g séd)	101,0 ± 35,3 a d	71,2 ± 17,8 a d	67,9 ± 38,0 a d	93,3 ± 30,8 a d	46,4 ± 16,1 a d	116,7 ± 30,2 a d	38,6 ± 16,5 a d	102,1 ± 64,0 a d	
		[C] (n/g COT)	3174,6 ± 1108,3 a d	2239,7 ± 561,0 a d	2135,5 ± 1194,8 a d	2933,5 ± 967,4 a d	1459,3 ± 505,5 a d	3669,2 ± 947,4 a d	1212,0 ± 517,5 a d	3209,5 ± 2010,6 a d	
	Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	107,2 ± 46,5 a d	72,3 ± 10,8 a d	76,0 ± 51,4 a d	82,4 ± 34,5 a d	46,9 ± 19,1 a d	117,3 ± 45,4 a d	37,3 ± 19,0 a d	93,8 ± 61,7 a d	
		[C] (n/g COT)	2791,7 ± 1208,6 a d	1881,1 ± 280,4 a d	1977,1 ± 1337,9 a d	2145,7 ± 896,4 a d	1220,7 ± 497,3 a d	3053,8 ± 1180,1 a d	972,1 ± 493,7 a d	2440,4 ± 1605,8 a d	
	Rezé	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	129,3 ± 44,6 a d	95,7 ± 23,7 a d	81,2 ± 44,5 a d	97,9 ± 20,3 a d	55,1 ± 16,5 a d	147,0 ± 25,4 a d	42,0 ± 14,5 a d	102,9 ± 59,2 a d
		Automne 2011	[C] (n/g COT)	5623,8 ± 1941,2 a d	4159,8 ± 1031,2 a d	3529,3 ± 1934,2 a d	4259,2 ± 884,3 a d	2396,8 ± 716,0 a d	6391,5 ± 1104,0 a d	1825,8 ± 630,9 a d	4475,0 ± 2574,8 a d
			[C] (ng/g séd)	131,9 ± 62,6 a d	94,9 ± 16,7 a d	92,7 ± 59,8 a d	103,5 ± 48,4 a d	59,0 ± 31,2 a d	150,7 ± 60,9 a d	47,7 ± 26,4 a d	114,3 ± 81,6 a d
			[C] (n/g COT)	7040,2 ± 3338,9 a d	5069,3 ± 885,4 a d	4948,8 ± 3190,0 a d	5525,4 ± 2579,3 a d	3150,8 ± 1661,7 a d	8045,8 ± 3248,1 a d	2547,3 ± 1407,5 a d	6099,9 ± 4355,3 a d
	Été 2011	[C] (ng/g séd)	93,1 ± 21,9 a d	66,6 ± 18,1 a d	61,0 ± 31,0 a d	88,0 ± 23,5 a d	42,5 ± 12,6 a d	100,3 ± 22,4 a d	35,4 ± 12,8 a d	94,6 ± 52,8 a d	
		[C] (n/g COT)	2976,4 ± 703,0 a d	2129,6 ± 575,9 a d	1950,2 ± 992,9 a d	2814,6 ± 752,9 a d	1360,2 ± 403,9 a d	3208,1 ± 719,5 a d	1133,5 ± 411,0 a d	3024,7 ± 1690,4 a d	
	Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	105,6 ± 18,1 a d	82,6 ± 37,1 a d	67,7 ± 32,1 a d	96,1 ± 18,2 a d	48,9 ± 8,5 a d	123,0 ± 5,4 a d	37,0 ± 12,0 a d	99,5 ± 56,3 a d	
		[C] (n/g COT)	3303,5 ± 566,9 a d	2581,2 ± 1157,1 a d	2118,1 ± 1005,6 a d	3006,8 ± 570,8 a d	1528,3 ± 267,6 a d	3845,7 ± 170,6 a d	1158,0 ± 376,7 a d	3110,8 ± 1761,2 a d	
	Haute Indre	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	148,0 ± 59,1 a d	106,9 ± 24,1 a d	96,8 ± 60,1 a d	118,3 ± 49,3 a d	64,5 ± 32,1 a d	161,3 ± 57,3 a d	49,0 ± 24,8 a d	131,1 ± 90,1 a d
		Automne 2011	[C] (n/g COT)	4933,8 ± 1969,5 a d	3563,2 ± 803,8 a d	3227,9 ± 2002,6 a d	3942,2 ± 1643,5 a d	2148,5 ± 1068,6 a d	5375,6 ± 1911,2 a d	1631,7 ± 825,7 a d	4368,9 ± 3003,2 a d
			[C] (ng/g séd)	115,3 ± 29,4 a d	85,1 ± 22,8 a d	72,2 ± 33,4 a d	93,3 ± 23,1 a d	50,6 ± 11,9 a d	131,2 ± 14,5 a d	37,0 ± 11,0 a d	101,3 ± 61,4 a d
			[C] (n/g COT)	4879,8 ± 1239,6 a d	3602,0 ± 970,5 a d	3052,7 ± 1412,8 a d	3948,3 ± 973,1 a d	2141,5 ± 503,0 a d	5549,9 ± 606,2 a d	1567,0 ± 465,6 a d	4286,0 ± 2594,1 a d
	Été 2011	[C] (ng/g séd)	98,9 ± 39,2 a d	70,1 ± 16,0 a d	67,7 ± 38,6 a d	93,5 ± 33,5 a d	47,6 ± 16,1 a d	115,0 ± 25,1 a d	35,9 ± 12,6 a d	102,6 ± 63,8 a d	
		[C] (n/g COT)	3118,1 ± 1235,8 a d	2212,6 ± 503,5 a d	2134,6 ± 1216,9 a d	2948,3 ± 1055,1 a d	1501,1 ± 507,3 a d	3627,1 ± 792,6 a d	1133,7 ± 397,4 a d	3235,7 ± 2013,1 a d	
	Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	117,8 ± 42,8 a d	80,1 ± 21,6 a d	81,5 ± 47,7 a d	101,4 ± 32,4 a d	51,6 ± 17,3 a d	125,5 ± 35,0 a d	41,6 ± 18,3 a d	105,7 ± 66,1 a d	
		[C] (n/g COT)	3327,6 ± 1209,8 a d	2262,8 ± 609,8 a d	2302,6 ± 1348,9 a d	2864,6 ± 916,4 a d	1458,6 ± 488,7 a d	3547,1 ± 989,0 a d	1175,8 ± 517,3 a d	2986,0 ± 1869,0 a d	
	Donges	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	107,2 ± 15,6 a d	84,8 ± 38,1 a d	73,2 ± 33,2 a d	98,6 ± 18,6 a d	48,4 ± 10,6 a d	128,5 ± 17,1 a d	40,6 ± 12,0 a d	97,2 ± 58,8 a d
		Automne 2011	[C] (n/g COT)	4121,0 ± 598,1 a d	3260,8 ± 1466,6 a d	2813,1 ± 1276,7 a d	3791,6 ± 714,5 a d	1861,3 ± 408,3 a d	4940,5 ± 654,3 a d	1560,5 ± 460,9 a d	3734,5 ± 2258,5 a d
			[C] (ng/g séd)	91,2 ± 22,7 a d	82,1 ± 52,3 a d	62,3 ± 26,9 a d	68,7 ± 53,2 a d	44,3 ± 10,0 a d	95,7 ± 30,6 a d	33,6 ± 10,4 a d	87,9 ± 56,0 a d
			[C] (n/g COT)	4088,0 ± 1015,1 a d	3681,2 ± 2348,4 a d	2790,4 ± 1205,6 a d	3078,8 ± 2384,0 a d	1982,7 ± 449,2 a d	4288,1 ± 1367,5 a d	1504,1 ± 465,1 a d	3938,9 ± 2508,0 a d
Été 2011	[C] (ng/g séd)	90,2 ± 35,4 a d	62,3 ± 12,5 a d	58,6 ± 38,1 a d	88,3 ± 26,5 a d	42,8 ± 14,2 a d	81,4 ± 66,7 a d	33,2 ± 15,2 a d	91,4 ± 62,5 a d		
	[C] (n/g COT)	3595,9 ± 1411,6 a d	2482,4 ± 499,1 a d	2335,3 ± 1518,9 a d	3521,0 ± 1057,8 a d	1706,7 ± 565,8 a d	3243,9 ± 2657,3 a d	1324,9 ± 605,4 a d	3644,9 ± 2491,7 a d		
Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	97,9 ± 39,0 a d	79,1 ± 28,5 a d	66,8 ± 35,1 a d	89,4 ± 24,4 a d	47,6 ± 15,7 a d	94,5 ± 61,2 a d	38,7 ± 14,7 a d	90,5 ± 61,6 a d		
	[C] (n/g COT)	3710,3 ± 1479,1 a d	2994,8 ± 1080,6 a d	2532,0 ± 1331,7 a d	3385,6 ± 923,9 a d	1805,0 ± 594,2 a d	3581,0 ± 2320,6 a d	1465,6 ± 557,3 a d	3429,6 ± 2333,1 a d		
Mûrdin	Hiver 2012	[C] (ng/g séd)	83,8 ± 32,2 a d	73,2 ± 15,9 a d	48,2 ± 31,6 a d	72,3 ± 20,0 a d	39,4 ± 14,1 a d	90,0 ± 37,1 a d	27,3 ± 13,9 a d	60,6 ± 58,9 a d	
	Automne 2011	[C] (n/g COT)	6601,3 ± 2544,8 a d	5768,9 ± 1248,6 a d	3798,5 ± 2489,6 a d	5693,7 ± 1581,3 a d	3105,6 ± 1111,5 a d	7092,3 ± 2929,7 a d	2151,2 ± 1096,0 a d	4772,8 ± 4639,8 a d	
		[C] (ng/g séd)	84,4 ± 10,4 a d	62,9 ± 36,2 a d	50,7 ± 23,5 a d	73,6 ± 19,1 a d	38,5 ± 8,3 a d	82,5 ± 15,6 a d	26,7 ± 8,2 a d	76,8 ± 46,5 a d	
		[C] (n/g COT)	4003,2 ± 495,7 a d	2981,2 ± 1713,8 a d	2404,0 ± 1115,1 a d	3490,4 ± 906,6 a d	1828,4 ± 394,6 a d	3912,3 ± 744,6 a d	1264,9 ± 390,9 a d	3643,5 ± 2209,0 a d	
Été 2011	[C] (ng/g séd)	107,5 ± 36,3 a d	76,6 ± 12,2 a d	61,1 ± 36,0 a d	77,2 ± 19,5 a d	42,6 ± 14,5 a d	78,9 ± 60,4 a d	28,6 ± 13,2 a d	78,0 ± 52,8 a d		
	[C] (n/g COT)	6897,4 ± 2328,3 a d	4915,6 ± 781,0 a d	3921,4 ± 2312,5 a d	4954,7 ± 1251,9 a d	2730,4 ± 933,9 a d	5061,6 ± 3874,4 a d	1832,8 ± 845,8 a d	5001,5 ± 3386,1 a d		
Printemps 2011	[C] (ng/g séd)	94,9 ± 5,7 a d	74,4 ± 41,1 a d	56,1 ± 23,5 a d	84,1 ± 10,4 a d	42,4 ± 6,8 a d	75,6 ± 49,3 a d	36,2 ± 13,6 a d	83,6 ± 51,6 a d		
	[C] (n/g COT)	4377,4 ± 260,2 a d	3430,1 ± 1892,8 a d	2587,7 ± 1085,9 a d	3881,8 ± 481,6 a d	1955,3 ± 313,5 a d	3487,7 ± 2276,7 a d	1670,9 ± 626,2 a d	3857,4 ± 2384,4 a d		

a, b, c : indices tenant compte des différences intersaisonniers. d, e, f : indices tenant compte des différences intersites

II.3.1.3. Étude des variations saisonnières et de l'effet site en vasière subtidale

L'ensemble des résultats sur l'étude des variations saisonnières et de l'effet site en vasière subtidale ont été reportés sur le Tableau 26. Les échantillons sédimentaires prélevés en zone subtidale ayant été essentiellement réalisés en été, la comparaison inter saisonnière n'a été possible qu'au sein du site Paimboeuf où la contamination était significativement moins importante sur les sédiments prélevés durant le printemps que ceux de l'été (Kruskal Wallis, $p < 0,05$) pour le D(ah)ant ($15,25 \pm 1,64$ contre $18,02 \pm 0,79$ ng/g de sédiment sec ; $571,6 \pm 58,97$ contre $674,9 \pm 29,64$ ng/g de COT) et le B(ghi)per ($18,71 \pm 2,14$ contre $23,55 \pm 1,52$ ng/g de sédiment sec ; $701,4 \pm 76,66$ contre $882,1 \pm 56,90$ ng/g de COT, respectivement). De la même manière qu'en zone intertidale, cette fluctuation des niveaux de contamination peut être liée aux crues hivernales, favorisant la remise en suspension des contaminants ainsi que leur dilution.

Pour la somme des HAP, contrairement aux résultats observés en zone intertidale entre les différents sites durant l'été, des différences significatives (Kruskal Wallis, $p < 0,05$) ont été constatées entre le site de Haute Indre (2004 ± 1122 ng/g de sédiment sec) et ceux de Mindin et Donges (respectivement $317,3 \pm 69,47$ et $322,8 \pm 44,63$ ng/g de sédiment sec). Sur les 16 HAP, 12 possédaient des concentrations plus élevées sur le site de Haute Indre comparativement aux sites de Mindin et de Donges, avec des facteurs multiplicatifs variant de 2,3 à 10,5. Ces différences ne sont dans l'ensemble plus observées lorsque les concentrations sont normalisées au COT. Ainsi, ces différences étaient liées au COT plus élevé pour le site de Haute Indre (2,45%) par comparaison aux sites de Mindin (1,65%) et Donges (1,82%).

Tableau 26. Résultats des contaminations par les HAP en zone subtidale exprimés en ng/g de sédiment sec et en ng/g de COT: comparaison entre les saisons et les sites

Zone	Site	Saison	Unité	Σ HAP	Nap	1-méthy	2-méthy	Ace	Fluo	Phe	Ant	Fla
Subtidale	Bellevue Sud	Été 2012	[C] (ng/g séd)	654,9 ± 52,1 * def	12,6 ± 2,2 * def	4,1 ± 1,0 * d	13,8 ± 2,9 * d	3,3 ± 1,1 * d	4,6 ± 0,9 * de	42,1 ± 1,8 * def	30,6 ± 6,6 * de	96,1 ± 18,8 * de
			[C] (n/g COT)	22051,3 ± 1755,0 * d	424,0 ± 75,3 * e	138,3 ± 34,2 * d	463,8 ± 99,0 * d	110,2 ± 38,6 * d	156,2 ± 30,5 * d	1416,9 ± 60,3 * de	1028,6 ± 220,9 * d	3235,9 ± 633,1 * d
	Rezé	Été 2012	[C] (ng/g séd)	622,9 ± 85,5 * def	13,4 ± 0,7 * def	4,9 ± 0,3 * d	18,1 ± 2,5 * d	3,4 ± 1,1 * d	4,7 ± 0,5 * de	38,6 ± 8,4 * def	32,2 ± 8,9 * de	70,5 ± 7,7 * de
			[C] (n/g COT)	23864,9 ± 3274,9 * d	513,7 ± 28,3 * de	189,3 ± 10,5 * d	693,1 ± 97,3 * d	132,1 ± 41,5 * d	180,1 ± 21,0 * d	1477,6 ± 321,3 * de	1235,6 ± 339,5 * d	2701,1 ± 293,6 * d
	Haute Indre	Été 2012	[C] (ng/g séd)	2004,5 ± 1122,2 * d	21,1 ± 3,0 * d	5,6 ± 0,9 * d	18,1 ± 2,1 * d	5,9 ± 3,8 * d	9,7 ± 2,2 * e	161,8 ± 72,2 * d	88,8 ± 41,8 * e	396,2 ± 316,0 * e
			[C] (n/g COT)	81814,5 ± 45804,7 * d	859,4 ± 124,4 * d	229,2 ± 36,9 * d	737,7 ± 85,9 * d	240,2 ± 154,8 * d	395,7 ± 90,2 * d	6604,0 ± 2948 * e	3625 ± 1708,0 * d	16172,3 ± 12896 * d
	Paimboeuf	Été 2012	[C] (ng/g séd)	516,9 ± 93,9 a def	12,8 ± 2,0 a def	4,9 ± 1,0 a d	12,6 ± 3,0 a d	3,4 ± 2,0 a d	4,1 ± 0,9 a de	38,1 ± 12,4 a def	22,5 ± 2,8 a de	74,8 ± 21,5 a de
			[C] (n/g COT)	19359,9 ± 3518,3 a d	480,7 ± 74,0 a de	182,0 ± 36,3 a d	470,2 ± 112,4 a d	128,6 ± 76,1 a d	153,9 ± 34,6 a d	1425,9 ± 464,5 a de	841,8 ± 106,0 a d	2802,6 ± 806,8 a d
		Printemps 2012	[C] (ng/g séd)	421,1 ± 79,9 a *	10,7 ± 0,8 a *	3,8 ± 0,3 a *	11,7 ± 0,8 a *	2,5 ± 0,8 a *	3,3 ± 1,0 a *	30,6 ± 6,8 a *	20,7 ± 11,9 a *	52,4 ± 8,5 a *
			[C] (n/g COT)	15781,1 ± 2918,1 a *	402,7 ± 29,1 a *	141,6 ± 10,4 a *	437,2 ± 29,2 a *	92,3 ± 30,1 a *	121,9 ± 37,8 a *	1145,9 ± 248,9 a *	776,3 ± 440,6 a *	1964,9 ± 312,2 a *
	Donges	Été 2012	[C] (ng/g séd)	322,8 ± 44,6 * ef	9,1 ± 1,4 * ef	3,6 ± 0,7 * d	10,6 ± 1,2 * d	1,7 ± 0,6 * d	3,1 ± 0,8 * d	21,4 ± 0,6 * ef	15,1 ± 7,6 * de	43,7 ± 2,6 * de
			[C] (n/g COT)	17736,5 ± 2452,2 * d	498,9 ± 78,7 * de	197,5 ± 35,9 * d	584,0 ± 64,0 * d	95,2 ± 32,9 * d	170,6 ± 46,1 * d	1175,0 ± 32,6 * d	827,1 ± 414,9 * d	2403,3 ± 141,7 * d
	Mindin	Été 2012	[C] (ng/g séd)	317,3 ± 69,5 * ef	9,2 ± 1,4 * cf	3,4 ± 0,6 * d	12,7 ± 4,8 * d	2,9 ± 2,7 * d	3,9 ± 1,6 * de	22,7 ± 5,3 * ef	14,7 ± 6,5 * d	37,6 ± 6,2 * d
			[C] (n/g COT)	19232,4 ± 4210,0 * d	560,6 ± 87,1 * de	207,7 ± 37,7 * d	771,5 ± 291,1 * d	176,1 ± 164,2 * d	233,4 ± 97,5 * d	1378,4 ± 319,9 * de	892,6 ± 393,3 * d	2277,5 ± 377,6 * d
Saint Nazaire	Été 2012	[C] (ng/g séd)	697,7 ± 46,4 * def	14,1 ± 2,1 * def	5,1 ± 0,3 * d	15,5 ± 0,5 * d	6,3 ± 1,7 * d	5,3 ± 0,5 * de	44,4 ± 7,7 * def	24,2 ± 1,6 * de	121,7 ± 10,6 * de	
		[C] (n/g COT)	26429,4 ± 1757,9 * d	532,9 ± 78,5 * de	193,5 ± 12,0 * d	588,4 ± 17,7 * d	239,5 ± 62,8 * d	199,3 ± 17,3 * d	1681,5 ± 292,6 * de	918,5 ± 61,9 * d	4608,5 ± 403,3 * d	

Zone	Site	Saison	Unité	Pyr	B(a)ant	Chry	B(b)fla	B(k)fla	B(a)pyr	D(ah)ant	B(ghi)per
Subitdale	Bellevue Sud	Été 2012	[C] (ng/g séd)	82,2 ± 9,7 * def	94,5 ± 10,7 * def	30,3 ± 3,3 * def	56,2 ± 3,3 * de	29,5 ± 2,1 * de	105,7 ± 17,0 * d	20,5 ± 1,3 * def	28,9 ± 3,2 * def
			[C] (n/g COT)	2767,6 ± 328,2 * de	3182,0 ± 360,4 * d	1021,6 ± 109,8 * d	1890,7 ± 111,1 * d	994,3 ± 70,9 * de	3558,5 ± 571,0 * d	689,1 ± 45,4 * d	973,5 ± 108,0 * de
	Rezé	Été 2012	[C] (ng/g séd)	66,6 ± 5,9 * def	88,0 ± 13,6 * def	27,9 ± 4,8 * def	62,6 ± 21,4 * de	31,6 ± 9,5 * de	110,5 ± 27,8 * d	23,0 ± 5,6 * def	26,8 ± 6,1 * def
			[C] (n/g COT)	2551,6 ± 225,5 * de	3370,5 ± 520,8 * d	1070,5 ± 183,5 * d	2397,0 ± 821,8 * d	1211,5 ± 363,9 * de	4234,3 ± 1064,4 * d	880,6 ± 216,3 * d	1026,0 ± 233,9 * de
	Haute Indre	Été 2012	[C] (ng/g séd)	338,6 ± 184,4 * d	283,7 ± 179,8 * d	70,6 ± 38,0 * d	138,9 ± 81,1 * e	69,8 ± 29,4 * e	274,0 ± 135,8 * d	46,9 ± 20,7 * d	74,8 ± 44,4 * d
			[C] (n/g COT)	13818,7 ± 7528,1 * e	11579,0 ± 7338,0 * d	2879,7 ± 1549,3 * d	5670,1 ± 3311,7 * d	2850,8 ± 1200,2 * e	11185,1 ± 5544,2 * d	1916,2 ± 846,7 * d	3051,2 ± 1811,6 * e
	Palmboeuf	Été 2012	[C] (ng/g séd)	61,4 ± 12,3 a def	83,8 ± 18,8 a def	22,3 ± 1,5 a def	52,6 ± 7,2 a de	27,2 ± 3,9 a de	54,8 ± 7,4 a d	18,0 ± 0,8 b def	23,6 ± 1,5 b def
			[C] (n/g COT)	2299,9 ± 462,2 a de	3138,2 ± 705,3 a d	835,9 ± 54,7 a d	1970,0 ± 270,6 a d	1019,9 ± 147,6 a de	2053,4 ± 278,4 a d	674,9 ± 29,6 b d	882,1 ± 56,9 b de
		Printemps 2012	[C] (ng/g séd)	50,7 ± 8,0 a *	70,6 ± 9,3 a *	19,2 ± 3,1 a *	43,1 ± 1,4 a *	23,5 ± 0,3 a *	44,4 ± 27,5 a *	15,2 ± 1,6 a *	18,7 ± 2,1 a *
			[C] (n/g COT)	1900,6 ± 290,3 a *	2646,4 ± 335,0 a *	718,3 ± 112,5 a *	1617,1 ± 49,0 a *	882,4 ± 9,6 a *	1660,6 ± 1022,5 a *	571,6 ± 59,0 a *	701,4 ± 76,7 a *
	Donges	Été 2012	[C] (ng/g séd)	37,2 ± 0,5 * ef	49,5 ± 4,9 * ef	14,7 ± 2,6 * ef	34,1 ± 2,3 * d	16,1 ± 0,2 * de	36,1 ± 25,0 * d	13,1 ± 1,8 * ef	13,6 ± 0,2 * ef
			[C] (n/g COT)	2043,6 ± 28,1 * d	2719,9 ± 268,7 * d	806,3 ± 140,2 * d	1875,6 ± 126,5 * d	883,3 ± 8,6 * d	1984,1 ± 1374,1 * d	722,1 ± 100,8 * d	749,9 ± 8,8 * d
	Mindin	Été 2012	[C] (ng/g séd)	35,4 ± 4,2 * ef	48,8 ± 8,5 * ef	13,1 ± 2,0 * ef	35,0 ± 1,3 * de	15,5 ± 0,8 * d	36,1 ± 23,3 * d	12,4 ± 1,3 * ef	13,9 ± 1,9 * ef
			[C] (n/g COT)	2147,9 ± 252,6 * de	2955,6 ± 515,8 * d	791,2 ± 119,7 * d	2120,7 ± 81,1 * d	939,5 ± 51,2 * de	2189,7 ± 1411,8 * d	748,8 ± 78,9 * d	841,0 ± 117,2 * de
	Saint Nazaire	Été 2012	[C] (ng/g séd)	91,5 ± 14,9 * def	110,4 ± 11,9 * def	33,2 ± 3,3 * def	82,8 ± 7,0 * de	39,1 ± 4,6 * de	48,7 ± 17,9 * d	23,0 ± 0,6 * def	32,4 ± 4,4 * def
			[C] (n/g COT)	3467,3 ± 566,2 * de	4183,2 ± 451,3 * d	1257,6 ± 123,3 * d	3135,6 ± 265,3 * d	1482,6 ± 173,7 * de	1843,8 ± 678,6 * d	870,4 ± 21,9 * d	1226,7 ± 167,3 * de

a, b, c : indices tenant compte des différences intersaisonnières

d, e, f : indices tenant compte des différences intersites

II.3.1.4. Étude des variations entre les vasières intertidales et subtidales

L'ensemble des résultats sur l'étude des variations entre les vasières subtidales et intertidales ont été reportés en Annexe 5. L'étude des variations entre les vasières intertidales et subtidales a été conduite sur les sites de Mindin, Donges, Haute Indre, Rezé et Bellevue Sud pour la saison été. Il a ainsi été relevé des concentrations plus élevées en zone intertidale pour tous les sites excepté pour Haute Indre où le contraire était clairement mis en évidence (Kruskal Wallis, $p < 0,05$).

Les concentrations en HAP plus faibles en zones subtidales peuvent être expliquées par les prélèvements qui ont été plus profonds. Ainsi, une contamination plus ancienne moins importante peut expliquer cette différence. Dans l'étude de Mitra *et al.* (1999) au niveau de l'estuaire du fleuve Elizabeth (États-Unis), des prélèvements à différentes profondeurs ont révélé des niveaux de contamination en HAP plus faibles à des niveaux de profondeur moins importants. Ces niveaux de contamination peuvent être dus à des apports en HAP moins importants par le passé (Mitra *et al.*, 1999). Les valeurs des concentrations en HAP plus élevées sur le site de Haute Indre en zone subtidale peuvent être dues à une pollution plus ancienne et d'origine ponctuelle. Des analyses complémentaires à des profondeurs différentes sont à envisager pour valider cette hypothèse. Une autre explication peut venir enrichir l'interprétation des précédents résultats. Il a été observé par Commendatore *et al.* (2012) une corrélation positive entre les concentrations en HAP dans les sédiments et la faible gravimétrie du milieu ($R = 0,731$, $p < 0,05$, $n = 7$). Il peut ainsi être supposé que la taille des sédiments soit différente en fonction de la profondeur et influence ainsi les niveaux de contamination entre les vasières intertidales et subtidales. Des analyses gravimétriques pourraient venir compléter ces résultats.

II.3.2. Profils et concentrations des AP, des PCB et des PBDE dans les échantillons

II.3.2.1. Étude des profils des AP

Les histogrammes représentant les profils des AP ont été reportés sur la Figure 22 et la Figure 23 pour les vasières intertidales et subtidales, respectivement. Parmi les 5 AP analysés, 3 ont été détectés : le BP, le 4-tOP et le NP-r. Le 4-OP et le 4-NP n'ont été détectés dans aucun échantillon et aucun blanc, que ce soit pour les échantillons sédimentaires ou les capteurs

passifs. Dans ce dernier cas, l'absence du 4-OP et du 4-NP pourrait s'expliquer par leur non-adsorption sur la phase stationnaire comme déjà constaté par Harman *et al.* (2008) et/ou leur présence en faibles quantités dans la colonne d'eau. L'absence de détection du NP-r dans les capteurs passifs pourrait également être expliquée par un manque d'affinité de ce composé pour la phase stationnaire. En ce qui concerne les sédiments, le 4-tOP représente 77,9% des AP totaux (91,7 à 193,0 ng/g de sédiment sec), et a été détecté sur l'ensemble des sites intertidaux et subtidaux. Le NP-r représente 14,1% du total (23,2 à 47,2 ng/g de sédiment sec) et le BP en représente 8,0% (0 à 56,1 ng/g). Pour les capteurs passifs, le BP est majoritaire avec une proportion de 92,3% des AP (101,1 ng/g) tandis que le pourcentage du 4-tOP est de 7,7% (8,5 ng/g).

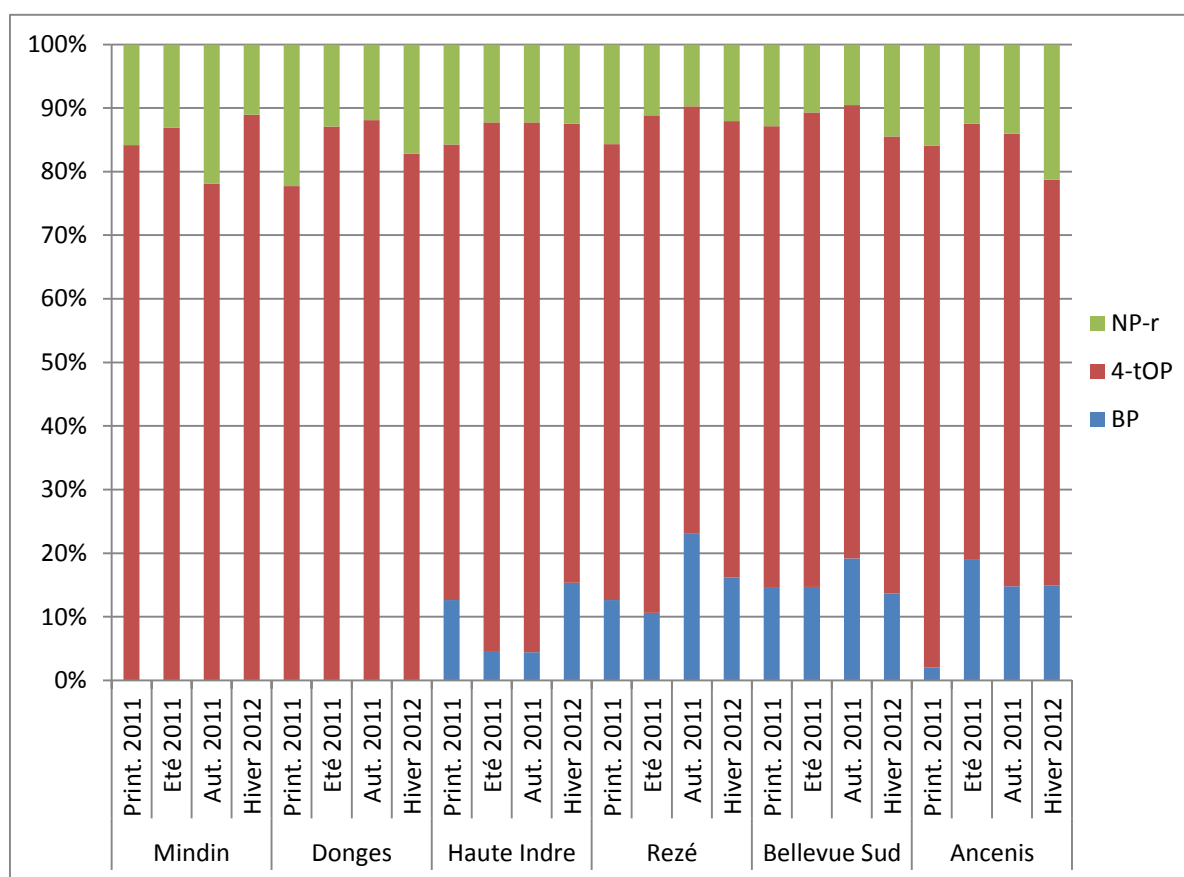


Figure 22. Profils de contamination en AP des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison

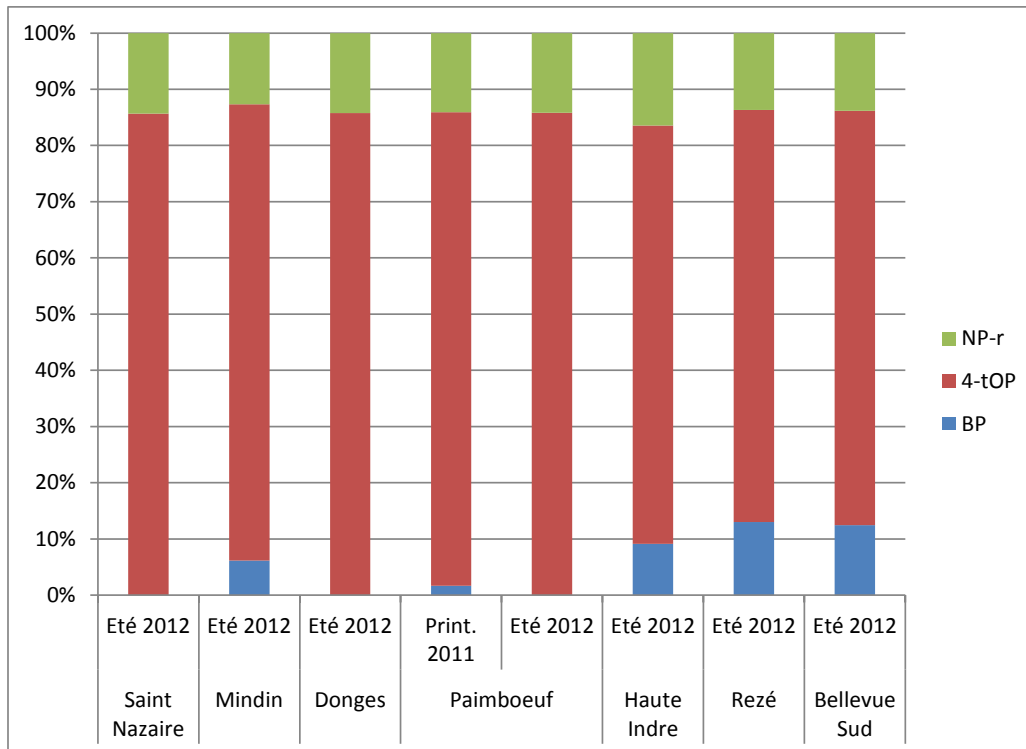


Figure 23. Profils de contamination en AP des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison

Dans le cas des capteurs passifs, la nature de la phase stationnaire Oasis HLB peut expliquer la distribution obtenue. Il a en effet été montré une affinité décroissante de cette phase pour les polluants avec un coefficient de partage allant de 0 à 5,6 (Greenwood *et al.*, 2007). L'affinité est relativement faible à partir d'un coefficient de partage de 4 et devient nulle après une valeur de 5,6. Le coefficient de partage du BP étant de 3,5 et celui du 4-tOP de 4,9, l'adsorption préférentielle du BP sur les capteurs passifs peut être expliquée. Dans le sédiment, compte tenu des coefficients de partage et des niveaux de concentration, il peut être suggéré une forte représentativité du 4-tOP dans l'environnement par comparaison au BP et au NP-r.

II.3.2.2. Étude des profils des PCB

Les histogrammes des profils de contamination en PCB dans les sédiments en fonction du site et de la saison sont présentés sur la Figure 24 et la Figure 25 pour les vasières intertidales et subtidales, respectivement. Dans les sédiments, l'ensemble des PCB a été détecté, excepté le PCB 28 en zone subtidale sur le site de Paimboeuf pour l'été 2012. Concernant les capteurs passifs, les PCB 28 et 52 n'ont pas été détectés. Mise à part l'absence de détection des PCB 28 et 52 dans les capteurs passifs, les proportions des PCB au niveau des échantillons sédimentaires et des capteurs passifs sont relativement semblables. Ainsi, il semblerait que la proportion des PCB augmente avec leur nombre d'atomes de chlore. Les PCB tri- et tétra-chlorés (PCB 28 et 52) représentent entre 5 et 5,5%, les PCB penta-substitués (PCB 101 et 118) entre 9,9 et 11,4% et les PCB hexa- et hepta-substitués (PCB 138, 153 et 180) entre 19,9 et 33,2% de la somme totale des PCB.

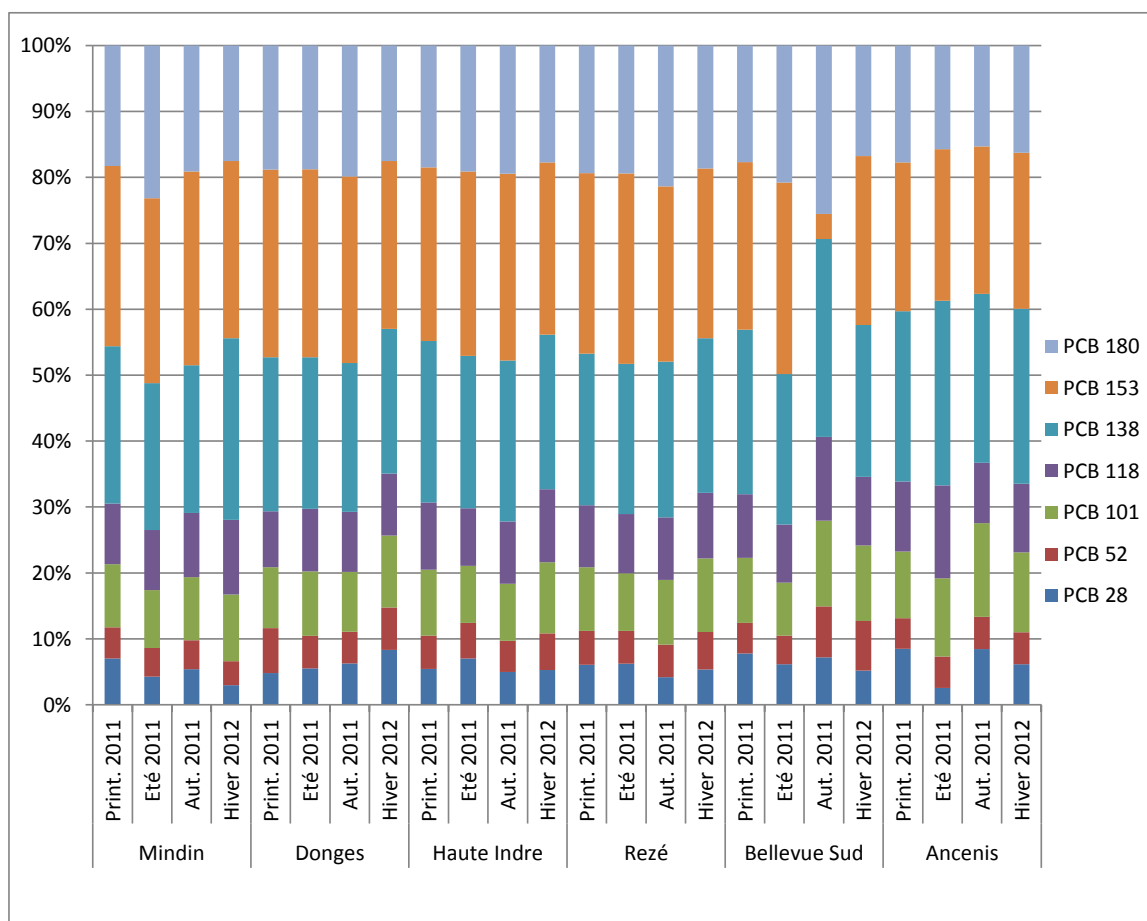


Figure 24. Profils de contamination en PCB des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison

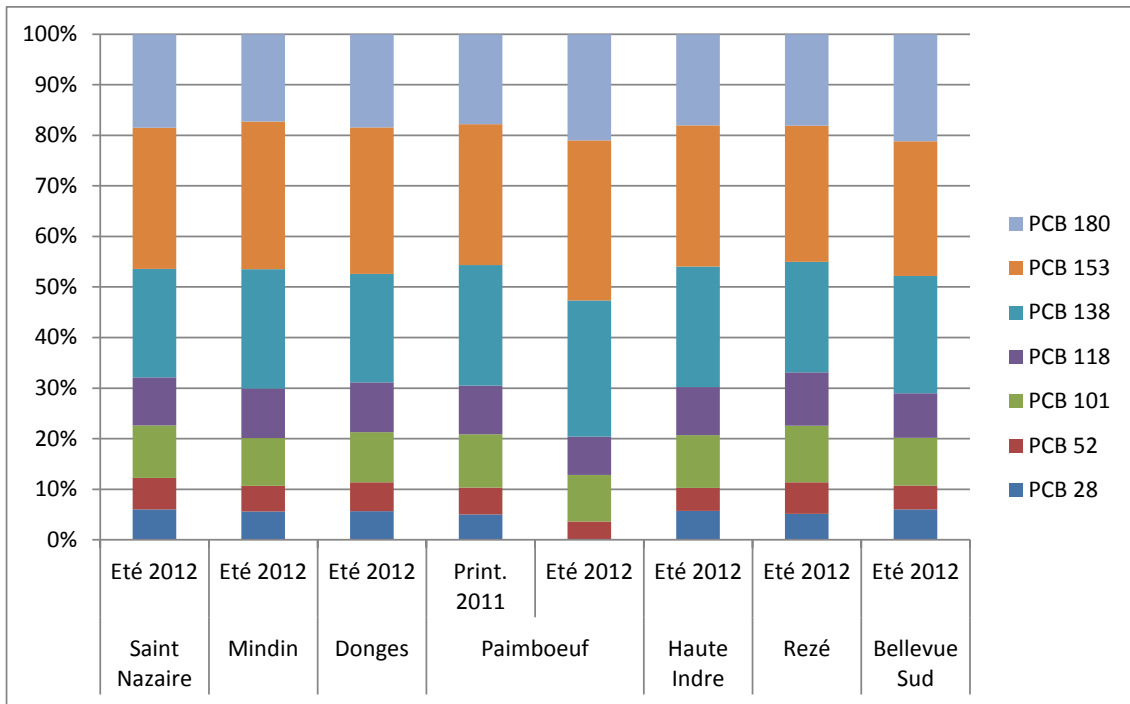


Figure 25. Profils de contamination en PCB des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison

Une hypothèse pourrait être avancée pour expliquer ces profils. Les PCB les moins substitués ont un faible temps de demi-vie dans le milieu aquatique, compris entre 17 et 210 jours (Faroon and Olson, 2000; Gouzy, 2011) contre 2 à 6 années pour les PCB plus substitués (Dagnat and Fisson, 2010; Gouzy, 2011; Mackay *et al.*, 1992). La biodégradation aérobie des PCB faiblement chlorés diminue en effet rapidement avec l'augmentation du degré de chloration dans l'eau et les sédiments (Gouzy, 2011; Lachambre and Fisson, 2007). Cela entraîne ainsi une accumulation des PCB les plus substitués, notamment dans les sédiments. Il est également à noter qu'il est fréquent que les PCB soient associés à d'autres molécules organiques telles que les huiles, les graisses ou des solvants. Ces co-substances, lorsqu'elles sont en quantité importante, peuvent inhiber le processus de déchloration des PCB par biodégradation (Gouzy, 2011; Tiedje *et al.*, 1993). La non détection des PCB 28 et 52 dans les extraits des capteurs passifs est difficile à expliquer. Ces composés sont présents dans les sédiments et, selon les faibles valeurs de logP, ils devraient également se retrouver dans la colonne d'eau. De plus, d'après ces valeurs de logP, ils sont sensés être adsorbés sur la phase stationnaire Oasis HLB. Une erreur analytique n'est pas à exclure.

II.3.2.3. Étude des profils des PBDE

Les histogrammes représentant les profils des PBDE des sédiments en fonction du site et de la saison ont été reportés sur la Figure 26 et la Figure 27 pour les vasières intertidales et subtidales, respectivement. Globalement dans les extraits sédimentaires, ce sont les PBDE 28, 47 et 99 (respectivement tri-, tétra- et penta-substitués) qui ont été les plus souvent détectés. Seul le PBDE 183 (hepta-substitué) n'a jamais été détecté et il est difficile d'apporter une explication à cela. Une erreur analytique n'est pas à exclure. Le PBDE 28 a été quantifié dans tous les sites excepté en automne 2011 au site de Haute Indre en zone intertidale, et en été 2012 aux sites de Saint-Nazaire et Paimboeuf en zone subtidale (< LOQ). Le PBDE 47 a été détecté dans tous les sites sauf à Paimboeuf en été 2012 en zone subtidale. Le PBDE 99 a été quantifié dans 60% des sites. Les PBDE 100, 153 et 154 ont quant à eux été quantifiés sur Ancenis en zone intertidale uniquement, générant un profil légèrement différent des autres. Cette spécificité observée à Ancenis est difficile à expliquer sachant qu'il n'y a pas de sources de PBDE identifiées à proximité du site de prélèvement. D'une manière générale, il a été observé une proportion majoritaire des congénères les moins substitués : le congénère 47 (65,9%), le congénère 99 (23,3%) et le congénère 28 (8,6%).

Dans les extraits des capteurs passifs, aucun PBDE n'a été détecté. Cette absence de détection dans la colonne d'eau peut s'expliquer par leur caractère hydrophobe. Leur faible solubilité traduite par un logP élevé permet de pressentir une accumulation dans la matrice sédimentaire plutôt qu'une présence dans la colonne d'eau. Des proportions élevées des PBDE 47 et 99 ont également été retrouvées dans l'étude menée par Zhao *et al.* (2011) dans l'estuaire de Daliao (Chine) et seraient associées au mélange technique penta-PBDE dont ils sont les principaux composés.

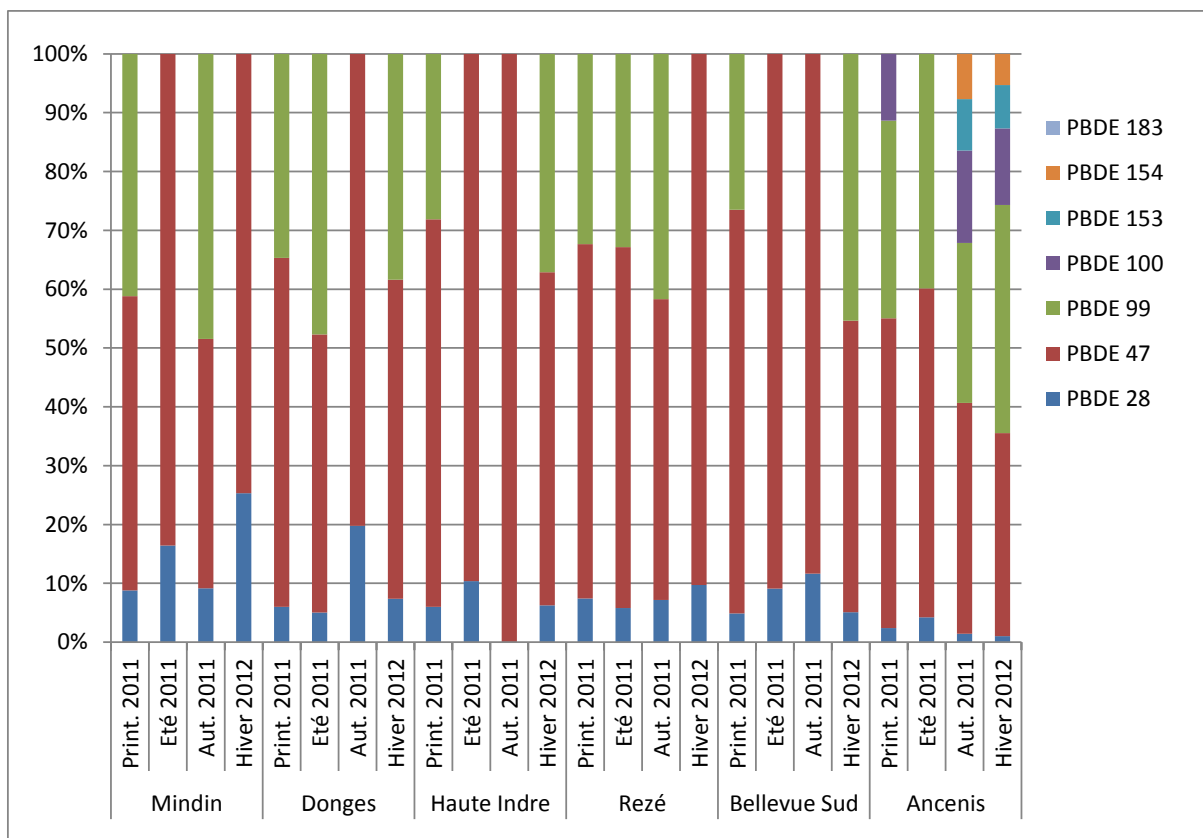


Figure 26. Profils de contamination en PBDE des sédiments prélevés en zone intertidale en fonction du site et de la saison

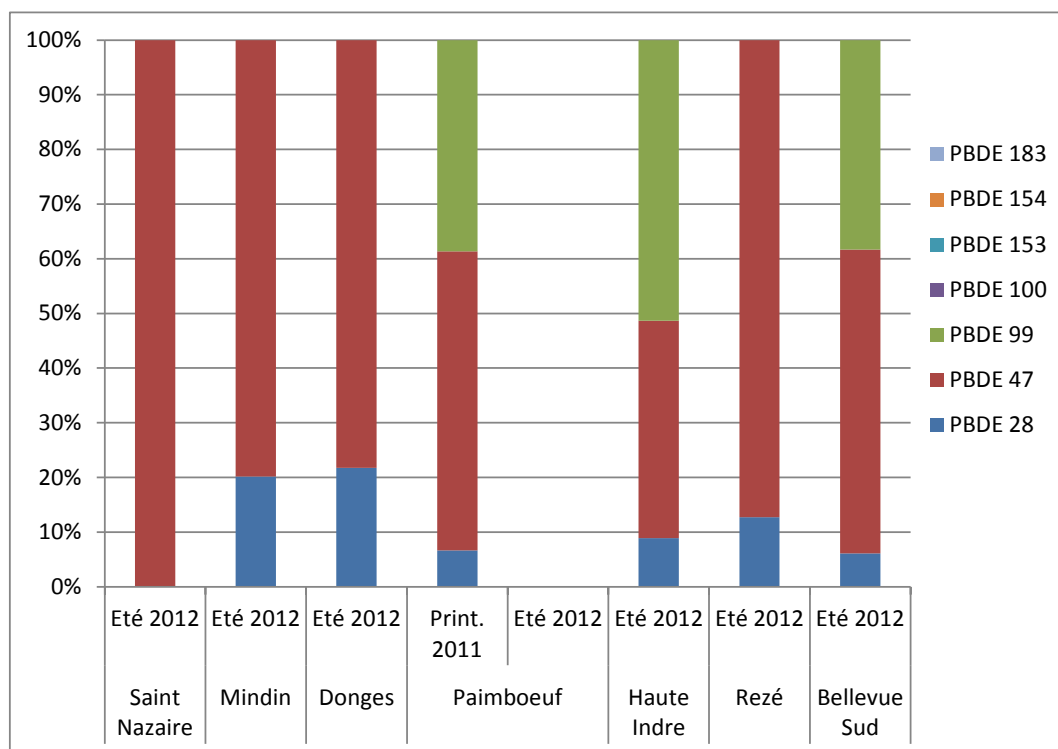


Figure 27. Profils de contamination en PBDE des sédiments prélevés en zone subtidale en fonction du site et de la saison

II.3.2.4. Étude de l'effet site sur la contamination en AP, PCB et PBDE en vasière intertidale

L'ensemble des résultats de l'étude des variations intersites ont été reportés dans le Tableau 27, le Tableau 28 et le Tableau 29 pour les extraits sédimentaires, et dans le Tableau 30 pour les capteurs passifs. Entre les sites, des différences significatives ont été observées en termes de contamination en AP, PCB et PBDE (Kruskal Wallis, $p < 0,05$). Ces différences ont notamment été observées entre Mindin et Ancenis où la contamination en amont était plus marquée. Concernant les sommes des AP déterminées à Mindin et Ancenis, les concentrations atteignent respectivement 153,9 et 802,2 ng/g de sédiment sec. Pour les PCB, les valeurs trouvées sont de 5,33 et 9,24 ng/g de sédiment sec et pour les PBDE de 0,13 et 1,15 ng/g de sédiment sec. Concernant les analytes étudiés individuellement, ces différences ont été constatées pour le BP, le PCB 101, le PCB 118, le PCB 138 et le PBDE 47. Les niveaux de contamination suivants ont été observés pour Mindin et Ancenis respectivement: BP : 0 et 48,17 ng/g de sédiment sec ; PCB 101 : 0,51 et 1,13 ng/g de sédiment sec ; PCB 118 : 0,53 et 0,99 ng/g de sédiment sec ; PCB 138 : 1,28 et 2,44 ng/g de sédiment sec ; et PBDE 47 : 0,07 et 0,48 ng/g de sédiment sec.

Tableau 27. Résultats des contaminations en AP des sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec: comparaison intersites

Zone	Intertidale											
Saison	Moyenne des saisons											
Site	Mindin		Donges		Haute Indre		Rezé		Bellevue Sud		Ancenis	
Unité	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)
∑ AP	8752,25 a	153,88 a	8887,23 a	221,43 ab	8209,60 a	246,74 ab	9260,35 a	233,92 ab	7767,50 a	235,64 ab	19606,46 a	802,21 b
BP	n.d. a	n.d. bc	n.d. a	n.d. bc	783,37 a	24,42 abc	1540,20 a	36,28 abc	1212,07 a	36,81 abc	901,73 a	48,17 a
4-tOP	7393,25 a	128,86 a	7471,97 a	185,72 a	6345,25 a	189,45 a	6622,00 a	169,00 a	5635,30 a	171,14 a	15587,88 a	625,85 a
NP-r	1359,01 a	25,02 a	1415,25 a	35,71 a	1080,98 a	32,87 a	1098,14 a	28,64 a	920,13 a	27,69 a	3116,84 a	128,18 a

a, b, c : indices tenant compte des différences intersites

Tableau 28. Résultats des contaminations en PCB des sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec: comparaison intersites

Zone	Intertidale											
Saison	Moyenne des saisons											
Site	Mindin		Donges		Haute Indre		Rezé		Bellevue Sud		Ancenis	
Unité	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)
∑ PCB	314,10 a	5,33 a	252,77 a	6,33 ab	233,37 a	7,09 ab	302,41 a	7,72 ab	212,26 a	6,42 ab	173,41 a	9,24 b
PCB 28	14,36 a	0,26 a	15,82 a	0,40 a	13,43 a	0,41 a	16,06 a	0,42 a	13,66 a	0,42 a	11,41 a	0,62 a
PCB 52	13,09 a	0,23 a	14,54 a	0,37 a	12,16 a	0,37 a	15,57 a	0,40 a	12,90 a	0,38 a	8,29 a	0,44 a
PCB 101	30,07 a	0,51 a	24,75 a	0,62 ab	22,18 a	0,68 ab	29,68 a	0,75 ab	22,28 a	0,67 ab	20,32 a	1,13 b
PCB 118	31,61 a	0,53 bc	23,10 a	0,58 bc	22,92 a	0,70 abc	28,53 a	0,73 abc	21,85 a	0,66 abc	19,23 a	0,99 a
PCB 138	76,75 a	1,28 a	57,43 a	1,44 ab	55,58 a	1,69 ab	70,34 a	1,79 ab	52,98 a	1,61 ab	45,89 a	2,44 b
PCB 153	87,34 a	1,49 a	69,89 ab	1,75 a	63,48 ab	1,92 a	82,03 ab	2,11 a	45,91 ab	1,40 a	39,68 b	2,12 a
PCB 180	60,88 a	1,03 a	47,24 a	1,18 a	43,61 a	1,32 a	60,19 a	1,52 a	42,69 a	1,30 a	28,59 a	1,50 a

a, b, c : indices tenant compte des différences intersites

Tableau 29. Résultats des contaminations en PBDE des sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec: comparaison intersites

Zone	Intertidale											
Saison	Moyenne des saisons											
Site	Mindin		Donges		Haute Indre		Rezé		Bellevue Sud		Ancenis	
Unité	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)
∑ PBDE	6,73 ab	0,13 a	8,93 ab	0,23 ab	6,00 a	0,19 ab	8,20 ab	0,21 ab	7,39 ab	0,22 ab	19,82 b	1,15 b
PBDE 28	0,86 a	0,02 a	0,65 abc	0,02 a	0,37 bc	0,01 a	0,60 abc	0,02 a	0,49 abc	0,01 a	0,40 bc	0,02 a
PBDE 47	3,86 a	0,07 a	4,94 ab	0,12 ab	4,39 ab	0,13 ab	5,14 ab	0,13 ab	5,00 ab	0,15 ab	8,79 b	0,48 b
PBDE 99	2,01 a	0,04 a	3,34 a	0,09 a	1,23 a	0,04 a	2,45 a	0,06 a	1,90 a	0,05 a	6,89 a	0,39 a
PBDE 100	n.d. a	n.d. a	n.q. a	n.q. a	n.q. a	n.q. a	n.q. a	n.q. a	n.q. a	n.q. a	2,20 a	0,14 a
PBDE 153	n.d. a	n.d. a	n.q. a	n.q. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	0,85 a	0,07 a
PBDE 154	n.d. a	n.d. a	n.q. a	n.q. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	0,68 a	0,05 a
PBDE 183	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a	n.d. a

Tableau 30. Résultats des concentrations en AP, PCB et PBDE exprimés en ng/g de phase stationnaire séquestrée dans les capteurs passifs

Site	Haute Indre		Site	Haute Indre		Site	Haute Indre	
Saison	Printemps 2013		Saison	Printemps 2013		Saison	Printemps 2013	
Unité	ng/g de phase stationnaire		Unité	ng/g de phase stationnaire		Unité	ng/g de phase stationnaire	
∑ AP	109,99	± 120,77	∑ PCB	9,36		∑ PBDE	n.d.	
BP	101,48	± 106,17	PCB 28	n.d.		PBDE 28	n.d.	
4-tOP	8,51	± 14,75	PCB 52	n.d.		PBDE 47	n.d.	
NP-r	0,00	± 0,00	PCB 101	0,72		PBDE 99	n.d.	
			PCB 118	0,82		PBDE 100	n.d.	
			PCB 138	2,38		PBDE 153	n.d.	
			PCB 153	3,86		PBDE 154	n.d.	
			PCB 180	1,57		PBDE 183	n.d.	

Les voies d'apport de contaminants aux eaux estuariennes sont multiples : apports atmosphériques, rejets de STEP et rejets urbains par temps de pluie (RUTP), auxquels s'ajoutent en milieu rural le lessivage ou l'érosion de sols contaminés (par voie atmosphérique ou suite à l'épandage de boues urbaines). Pour les AP, les PCB et les PBDE, le gradient de contamination observé dans cette étude peut résulter d'apports en contaminants associés à diverses sources. Il a ainsi été constaté une décroissance globale des concentrations en polluants d'amont en aval, avec des augmentations locales autour des principales STEP (Figure 28). La STEP de Rezé peut expliquer « l'apex » local observé juste en aval de Nantes. Le manque de données plus en amont d'Ancenis ne permet pas de conclure davantage sur les rejets potentiels près de ce site mais il peut être supposé que cette contamination soit liée aux apports des STEP d'Angers et de Saint Géréon (les capacités de cette dernière étant faibles par rapport à la population) qui représentent respectivement 21% et 3% des rejets de STEP dans la Loire entre Angers et Saint-Nazaire (Groupe d'Intérêt Public (GIP), n.d.). Les conditions hydrodynamiques (débit, salinité, matières en suspension,...) peuvent également influencer fortement sur les flux de contaminants au sein de l'estuaire (Brinkmann *et al.*, 2013; Commendatore *et al.*, 2012). Une étude approfondie des variations de contamination en fonction de ces paramètres permettrait sans doute de préciser les sources et prendre en compte un possible phénomène de dilution par l'eau de mer à proximité de l'embouchure de l'estuaire.

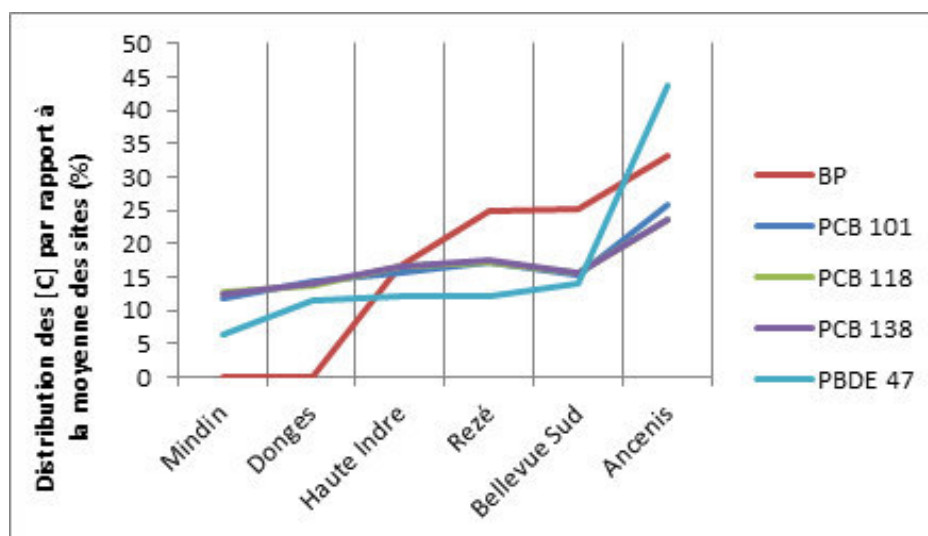


Figure 28. Variation des niveaux de contamination des sédiments intertidaux en fonction du site de prélèvement

II.3.3. Étude de l'effet site en vase intertidale pour le BPA

L'effet du site sur les niveaux de contamination par le BPA n'est pas significatif (Kruskal Wallis, $p < 0,05$). Ces niveaux étant globalement faibles, on peut supposer une contamination plus en amont de la zone d'étude, ou globale et de faible intensité (Tableau 31). La concentration en BPA dans les extraits des capteurs passifs de Haute Indre était de $33,51 \pm 29,54$ ng/g de phase stationnaire.

Tableau 31. Résultats de contamination en BPA dans les sédiments prélevés en zone intertidale exprimés en ng/g de COT et ng/g de sédiment sec : comparaison intersites

Zone	Intertidale											
Saison	Moyenne des saisons											
Site	Mindin		Donges		Haute Indre		Rezé		Bellevue Sud		Ancenis	
Unité	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)	[C] (n/g COT)	[C] (ng/g séd)
BPA	172,44	3,25	267,40	6,18	112,11	3,43	166,26	4,11	248,14	7,71	161,58	10,01
	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a

a, b, c : indices tenant compte des différences intersites

II.3.4. Étude du potentiel d'activité des extraits au test de liaison à la TTR

La Figure 29 (A) présente les résultats d'activités exprimés en nanogramme d'équivalent T4 par gramme de sédiments des tests de liaison à la protéine de transport TTR (TTR-binding assay) réalisés sur les échantillons de sédiments prélevés en vasières intertidales. Des activités similaires sont observées pour les sites s'échelonnant de Mindin à Bellevue Sud, avec des variations saisonnières relativement faibles pour l'ensemble des sites, exceptés les sites de Bellevue Sud et Ancenis. Le site d'Ancenis est significativement plus actif avec des valeurs comprises entre 413 et 1065 ng éq. T4/g d'extrait en fonction de la saison (KW, $p < 0,05$). Une très forte activité a été notée au niveau du site de Bellevue Sud au printemps 2011 (4592 ng éq. T4/g d'extrait) pouvant traduire une contamination ponctuelle du milieu en composés de type perturbateurs thyroïdiens.

La Figure 29 (B) présente les mêmes résultats mais exprimés par gramme de COT. Au printemps, le site de Bellevue présentait toujours une très forte activité par rapport à tous les autres sites étudiés. Néanmoins, la correction par le COT a « inversé » les activités exprimées par gramme de sédiment sec puisque le site étudié le plus en amont de l'estuaire Ancenis qui était le plus actif n'est plus différent des autres alors que Mindin, le site le plus en aval de la zone de prélèvement présente des activités plus importantes par rapport à l'ensemble des sites de prélèvement. Le site de Mindin est significativement plus actif que les autres en été mais également en automne (hors Bellevue) et en hiver (KW, $p < 0,05$). Hormis Mindin, les activités

par saison varie peu au niveau des autres sites. Au sein de chaque site, l'activité ne semble pas être affectée par la saison. Ainsi à Bellevue, l'extrait de sédiment prélevé au printemps avait une activité plus importante qu'aux autres saisons et pour Mindin il s'agissait de l'extrait de l'été (KW, $p < 0,05$).

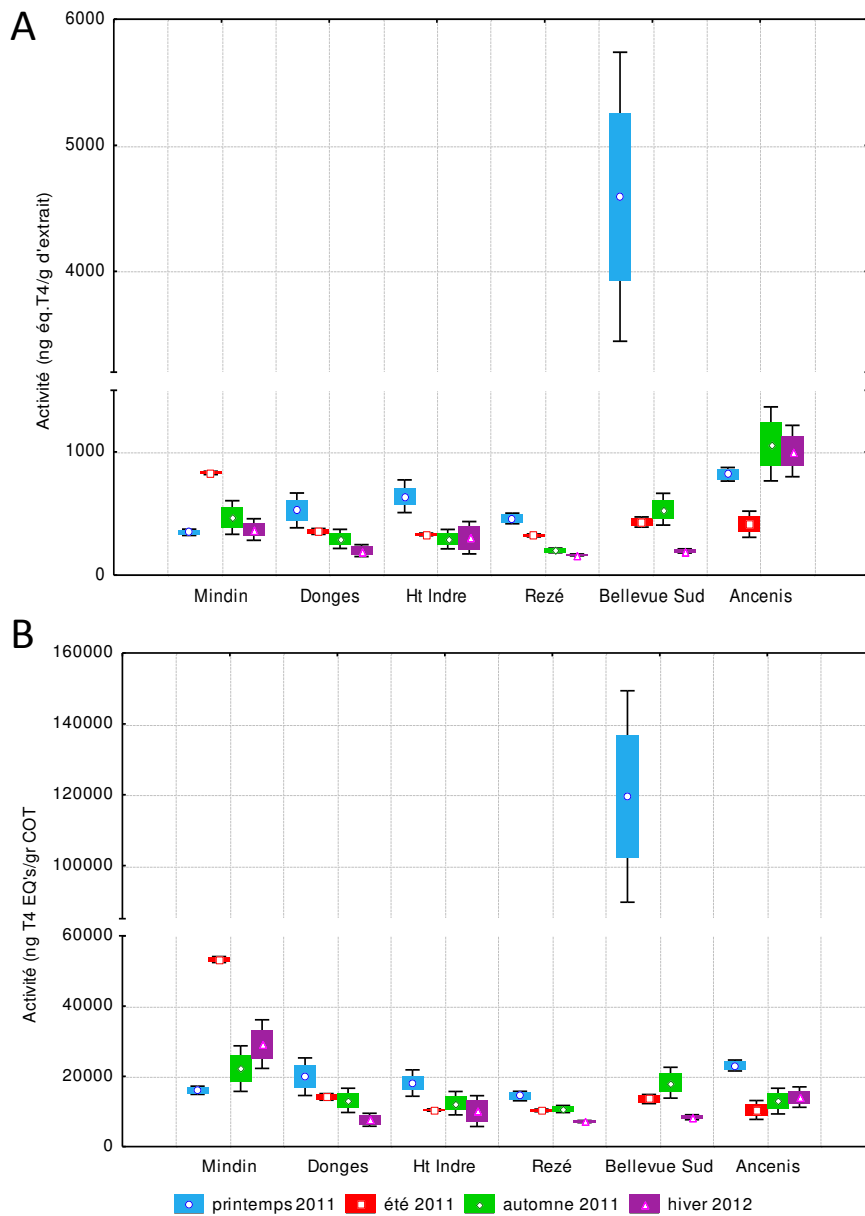


Figure 29. Résultats des tests de liaison à la TTR des vasières intertidales par site et par saison exprimés en ng d'équivalent T4 par g de sédiment sec (A) et de COT (B)

Les résultats des tests TTR réalisés sur les échantillons de sédiments prélevés en zone subtidale sont présentés sur la Figure 30 (A) et exprimés par gramme de sédiment sec. Les activités *thyroid-like* observées (comprises entre 78 et 225 ng éq. T4/g d'extrait) sont deux à

trois fois plus faibles que celles mises en évidence pour les sédiments prélevés en vasières intertidales. Les activités les plus importantes sont observées pour les sites de Donges et Saint-Nazaire mais celles-ci ne sont pas différentes des autres points de prélèvements (KW, $p>0,5$). Les résultats d'activité exprimés en ng d'équivalent T4 par g de COT sont présentés sur la Figure 30 (B). Les valeurs variaient de 4675 à 11 272 ng éq.T4/g de COT pour les sites de Bellevue Sud et Donges respectivement. Le site présentant la plus forte activité était celui de Donges, mais là encore, aucune différence significative n'a été trouvée entre les sites (KW, $p>0,05$)

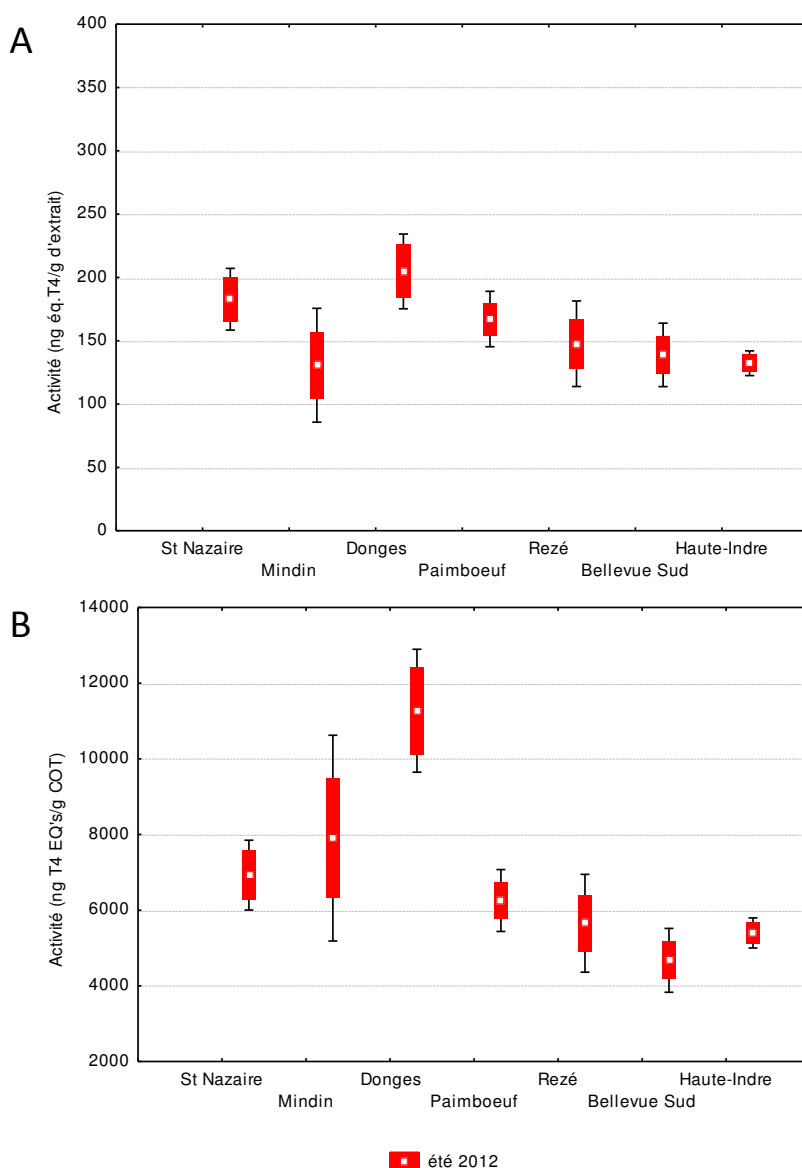


Figure 30. Résultats des tests TTR des vasières subtidales par site et par saison en ng d'équivalent T4 par g de sédiment sec (A) et par g de COT (B)

Les capteurs passifs ont été placés sur les bouées du chenal en avril 2013 à Paimboeuf, Haut-Indre et Champtoceaux pendant 20 jours. Les forts courants mesurés sur cette période ont détruit 6 capteurs sur les 9 mis en place. Seuls les capteurs déployés sur le site de la Haute-Indre ont pu être exploités. Les résultats d'activité obtenus lors du test TTR à partir des extraits des capteurs passifs et des extraits de sédiments intertidaux du site de Haute-Indre sont présentés sur la Figure 31. Aucune différence significative d'activité n'a été observée entre les trois capteurs (KW, $p < 0.05$). Le niveau d'activité obtenu après 20 jours d'immersion était comparable à celui des sédiments prélevés en zone intertidale sur le même site.

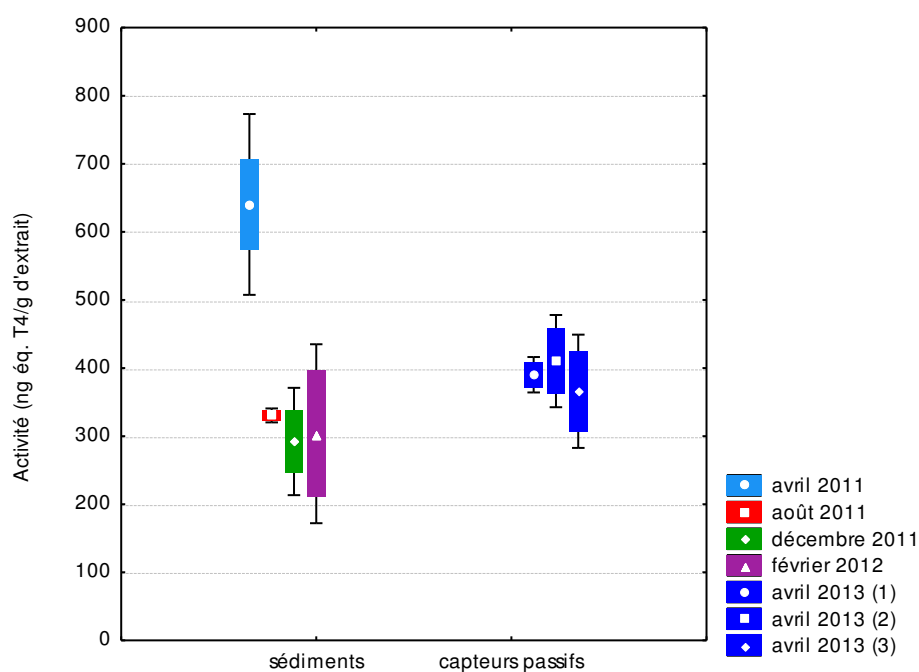


Figure 31. Activité en ng d'équivalent T4/g d'extract (phase stationnaire) des capteurs passifs comparée à celle des extraits sédimentaires (sédiment sec) sur le site de Haute-Indre

II.3.5. Étude des relations entre les résultats au test de liaison à la TTR et la contamination des sites

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée afin d'étudier l'influence des contaminants sur les résultats du test TTR. Cette analyse a été effectuée en utilisant les concentrations sédimentaires rapportées à la teneur en COT. En effet, il a été montré une corrélation positive ($R = 0,71$, $p < 0,0005$, $n = 30$) entre le pourcentage de COT sédimentaire et les résultats du test TTR. Les polluants se stockant essentiellement dans les sédiments riches en matière organique, il a ainsi été réalisé une normalisation des résultats obtenus au test TTR par rapport au COT. Deux valeurs aberrantes ont été mises en évidence par l'application du test de Grubbs (1950). Les résultats pour le site de Bellevue Sud pendant le printemps ont été exclus. En effet, les résultats au test TTR étaient trop élevés par rapport aux autres extraits. Les niveaux de contamination de cet extrait n'étant pas significativement plus importants que les autres extraits, l'activité TTR de cet extrait ne serait donc pas expliquée par les polluants étudiés. Étant donné la localisation de cet extrait (Bellevue Sud), une pollution ponctuelle due à des activités de maraîchage (source de pesticides), peut être suspectée. Les résultats de contamination du site d'Ancenis pendant le printemps ont également été exclus. La concentration en polluants était trop élevée par rapport à celle des autres extraits. Étant donné que l'activité TTR de cet extrait n'était pas beaucoup plus élevée que celle des autres sites, il semblerait que les forts niveaux de HAP et d'AP retrouvés dans cet extrait influencent peu les résultats du test cellulaire.

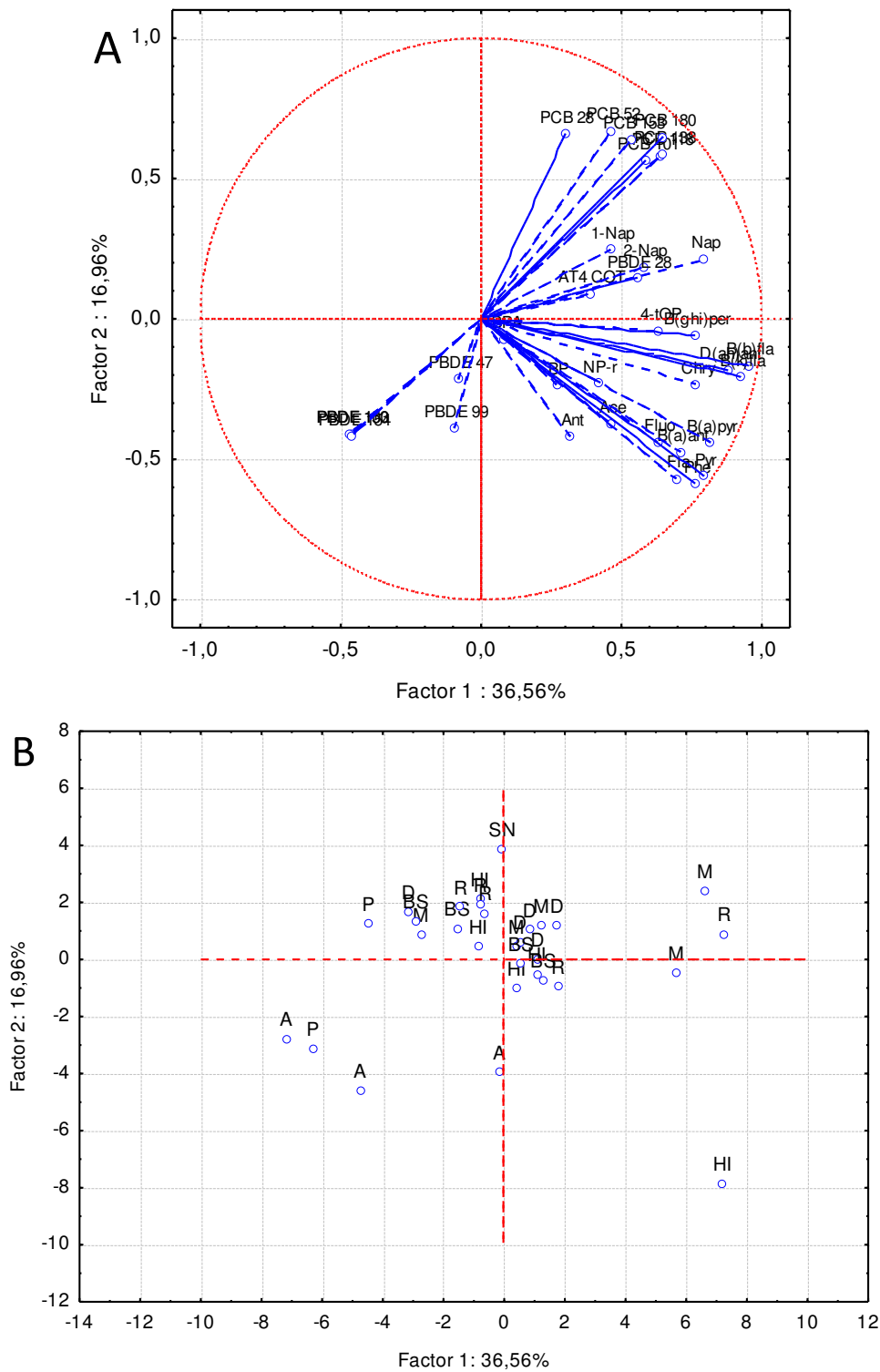


Figure 32. Analyse en Composantes Principales : (A) Cercle des corrélations des 2 premiers facteurs; (B) Projection des points de prélèvements

Le cercle des corrélations obtenu à partir de l'ACP est présenté sur la Figure 32 (A). Le premier facteur représente 36,56% de la variance totale et le second 16,96%. De manière générale, le premier facteur est positivement corrélé aux HAP alors que le second facteur est plutôt positivement corrélé aux PCB. L'activité TTR n'a pas vraiment de poids dans la

construction des deux facteurs et donc dans la variance totale des résultats. Néanmoins, sur le cercle des corrélations, cette variable se retrouve positionnée à proximité de contaminants divers. Il est donc possible de dire que ces contaminants sont corrélés à l'activité TTR. Ainsi des corrélations positives avec l'activité TTR ont été trouvées pour le Nap ($R = 0,54$ et $p = 0,002$), le 2 méthy ($R = 0,47$ et $p = 0,01$), le Fluo ($R = 0,46$ et $p = 0,01$) et le B(ghi)per ($R = 0,46$ et $p = 0,011$) et dans une moindre mesure (corrélations positives plus faibles) pour le 1-méthy ($R = 0,36$ et $p = 0,048$), le Chry ($R = 0,40$ et $p = 0,029$), le B(b)fla ($R = 0,38$ et $p = 0,038$), le B(k)fla ($R = 0,40$ et $p = 0,03$) et le PCB 180 ($R = 0,37$ et $p = 0,043$). Il s'agirait d'effets exclusivement agonistes sur la TTR. Il a été montré dans la littérature que les composés ayant le plus d'affinité pour la liaison à la TTR possèdent des groupements fonctionnels et sont généralement polaires (Lübcke-von Varel *et al.*, 2011). Les faibles corrélations observées pour les PCB et PBDE peuvent ainsi être expliquées puisque ces composés ne possèdent aucun groupement fonctionnel et sont apolaires. Dans le cas du B(a)pyr, il a par exemple été observé par Lübcke-von Varel *et al.* (2011) une absence d'activité lors du test TTR confirmée par la présente étude.

Les présents travaux ont permis de mettre en évidence une potentielle activité TTR de polluants non métabolisés. Il est ainsi important de noter que la toxicité de ces polluants peut être accentuée une fois métabolisés par l'organisme. Les métabolites hydroxylés ont tendance à être retenus dans l'organisme, liés à la TTR, où ils sont relativement protégés contre d'autres métabolisations (Montaño *et al.*, 2013).

Concernant les corrélations entre les sites et les variables étudiées (activité TTR et contaminants), il a pu être observé que le site d'Ancenis est marqué par des niveaux élevés de PBDE (Figure 32 (B)) tandis que les concentrations en Nap et les niveaux d'activité lors du test TTR caractérisent plutôt les sites plus en aval (Mindin et Donges). Cette dernière observation peut être reliée aux activités anthropiques de ces zones. La présence de la centrale thermique de Cordemais (en amont de Donges) peut d'une part expliquer la forte corrélation entre la présence de Nap et la zone géographique. D'autre part, les activités agricoles localisées en amont de Cordemais (*i.e.* Le Pellerin) peuvent être source de pesticides. Les contaminants étudiés n'expliquant pas les activités observées, l'analyse d'autres contaminants, réagissant au test TTR pourrait venir compléter les données existantes, comme les pesticides, les PPCP ou les PFAS.

II.4. Conclusion

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les variations spatio-temporelles au sein des sédiments de l'estuaire de Loire, de 4 grandes familles de contaminants (PCB, PBDE, AP et HAP) et du BPA, connus pour leur potentiel de perturbation thyroïdienne avéré ou suspecté. Les liens entre cette contamination et les résultats de tests cellulaires renseignant sur l'activité des extraits sédimentaires et aqueux sur le transport des HT ont également été étudiés. Lors de ces travaux, une méthode d'analyse par HPLC-FLD pour la quantification des HAP, des AP et du BPA a été transposée vers l'UHPLC-FLD et a été optimisée.

L'analyse des HAP a conduit à mettre en évidence la présence des 16 congénères recherchés dans chacun des échantillons de sédiments quels que soient le site, la zone (intertidale et subtidale) et la saison de prélèvement. Les HAP les plus lourds se retrouvaient majoritairement dans les profils (83,5%). Seul 4 HAP (le Nap, le Phe, l'Ant et le Pyr) ont été détectés dans les extraits des capteurs passifs. La somme des HAP mesurée en vasière intertidale ne présentait aucune différence significative entre les saisons. Seules au sein des sites, quelques variations saisonnières étaient observées entre des analytes, notamment dans la partie amont de l'estuaire (Ancenis). L'impact des crues hivernales pourrait être à l'origine de ces résultats notamment en participant à la remise en suspension des sédiments et en diluant ceux-ci dans des masses d'eau plus importantes. Toujours en vasière intertidale, aucune différence significative dans les concentrations de HAP totales ou individuelles n'a été constatée entre les sites, sur la moyenne annuelle, ni entre les sites au sein d'une même saison. Quelques effets « site » ont néanmoins été observés entre l'amont et l'aval de l'estuaire pendant l'hiver : Donges et Mindin étaient significativement plus contaminés qu'Ancenis par le 1-méthy et le Fla. Pour l'Ace, Ancenis est significativement plus contaminé que Mindin pendant l'automne et le printemps. Un effet site en vasière subtidale a été observé entre le site de Haute Indre qui présentait des concentrations plus élevées pour 12 des 16 HAP étudiés par rapport à celles de Mindin et Donges, mais ces différences n'étaient plus significatives en appliquant une correction par le COT. L'étude des variations de concentrations en HAP entre les vasières intertidales et subtidales a montré des niveaux de contamination plus élevés en zone intertidale pour tous les sites, excepté pour Haute Indre où le contraire était constaté.

L'analyse des 5 AP a conduit à la détection d'uniquement 3 d'entre eux dans l'ensemble des échantillons prélevés. Les 7 indicateurs de la contamination en PCB ont été détectés dans tous les échantillons sédimentaires, excepté pour le site Paimboeuf (été 2012, zone subtidale) où le

congénère 28 était absent pour une raison difficile à expliquer. Les profils de distribution tendaient vers les plus substitués (PCB 138, 153 et 180). Parmi les 7 PBDE investigués, les PBDE 28, 47 et 99 étaient majoritairement représentés dans les échantillons. Aucun PBDE n'a été retrouvé dans les extraits des capteurs passifs. L'étude en vasière intertidale des variations spatiales de la contamination pour ces 3 familles de composés a montré notamment des niveaux plus élevés pour la partie en amont de l'estuaire que pour celle en aval, particulièrement entre le site d'Ancenis et de Mindin. Aucune variation de concentration en BPA, entre les sites des vasières intertidales n'a été observée.

Les résultats obtenus lors des tests TTR à partir des sédiments prélevés en zone intertidale montraient de faibles variations intersites et saisonnière. Seul le site d'Ancenis, le plus en amont de l'estuaire, présentait une activité plus importante par rapport aux autres sites, notamment en automne et en hiver. Néanmoins, après correction par les teneurs en COT, les résultats s'inversaient, puisque cette fois-ci, seul le site de Mindin (le plus en aval) était le plus actif lors du test TTR, pour les saisons été et automne. Une très forte activité *thyroid-like* a également été constatée pour le prélèvement effectué au printemps à Bellevue mais ceux des autres saisons étaient similaires aux niveaux observés pour les autres sites. Cette activité sur une saison et un seul site pourrait traduire une contamination ponctuelle du milieu. Les activités mesurées sur les extraits de sédiments des vasières subtidales n'étaient pas différentes quel que soit le site de prélèvement, et ce même après correction par le COT.

L'analyse des relations entre les résultats des contaminations et des activités mesurées lors du test TTR ont montré principalement des corrélations entre l'activité et quelques HAP (Nap, 2 méthy, Fluo, B(ghi)per, 1-méthy, Chry, B(k)fla et B(b)fla) mais aussi le PCB 180. Les sites les plus en aval, notamment Mindin et Donges seraient les plus contaminés en Nap et également les plus actifs lors du test TTR. Les autres sites ne se démarqueraient pas. Seul Ancenis serait principalement caractérisé par sa contamination en PBDE mais sans lien avec l'activité pour la TTR. Ces corrélations n'expliquent cependant pas la plupart des résultats en termes d'activité, notamment ceux obtenus au printemps pour le site de Bellevue Sud. Il a ainsi été suggéré que d'autres composés tels que les pesticides, les PFAS ou les PPCP aient pu causer cette activité.

Chapitre III : Etude du *biota* : taux d'imprégnation tissulaire par des polluants organiques persistants de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et relation avec des marqueurs potentiels de perturbations thyroïdiennes

III.1. Introduction et contexte de l'étude

L'estuaire de la Loire a été peu étudié au regard des autres grands estuaires français. Peu de travaux ont utilisés l'anguille européenne, pour en étudier la contamination en polluants organiques (Blanchet-Letrouvé *et al.*, 2014; Bragigand *et al.*, 2006; ONEMA, 2012) et à ce jour aucune de ces études ne s'est intéressée à son impact sur le système thyroïdien. Le *biota* figure comme un excellent indicateur de contamination. Son utilisation a d'ailleurs été récemment approuvée dans la DCE de 2013 afin de caractériser la qualité du milieu aquatique (European Commission, 2013). Qui plus est, par rapport aux matrices physiques (*e.g.* sédiment et eau), les effets des mixtures complexes de contaminants (approche multi-contaminants) présentes dans le milieu peuvent être directement étudiés sur l'organisme exposé.

Ce chapitre comporte deux publications dans lesquelles nous avons investigué la qualité du milieu estuarien en utilisant l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) comme espèce sentinelle puis dans un second temps nous avons recherché des corrélations entre les contaminants détectés dans les muscles et la bile et de potentiels effets sur le fonctionnement du système thyroïdien. Les contaminants recherchés dans les muscles ont été les PCB, PBDE et PFAS. Les AP, les métabolites de HAP et le BPA ont été analysés dans la bile. Ces derniers ont fait l'objet d'un développement spécifique de méthode analytique (extraction et détection) dont la méthodologie retenue est présentée au sein de l'Article 1 suivant. Les perturbations du fonctionnement thyroïdien ont été investiguées au moyen de deux outils. Les concentrations plasmatiques en hormones thyroïdiennes circulantes (T3 libre, T4 libre et T4 totale) ont été mesurées par des dosages radio-immunologiques (RIA). Ce type d'analyse est couramment utilisé notamment chez les poissons pour déterminer des atteintes de l'homéostasie (Carr and Patiño, 2011). Néanmoins seulement quelques études ont décrit l'homéostasie thyroïdienne chez l'anguille européenne mais ne se sont pas intéressées aux effets de contaminants sur celle-ci (Aroua *et al.*, 2005; Marchelidon *et al.*, 1999; Van Ginneken *et al.*, 2007). Ce type de travaux a cependant déjà été réalisé mais chez d'autres espèces de poissons (*e.g.* *Cymatogaster aggregata*, *Leptocottus armatus*, *Perca flavescens*, *Ameiurus nebulosus*) (Brar *et al.*, 2010; Simmons *et al.*, 2014). Des perturbations de l'expression de gènes spécifiques du système thyroïdien ont également été recherchées sur les anguilles prélevées. Ainsi l'expression de la désiodase de type 2 (Deio2), principale enzyme impliquée dans la conversion de la T4 en T3 (hormone active) a été mesurée dans le foie. L'expression des

récepteurs thyroïdiens TR α et TR β a été déterminée dans le muscle et celle de l'hormone TSH produite par l'hypophyse (TSH β) dans le cerveau. De nombreuses études ont montré l'importance des HT dans la fonction de reproduction et le développement des gonades chez les poissons (Blanton and Specker, 2007; Cyr and Eales, 1996; Power *et al.*, 2001). Les HT potentialiseraient l'activation de l'expression des gènes de la vitellogénine (Vtg) (Lethimonier *et al.*, 2000; Sumpter and Jobling, 1995). Ainsi l'expression du gène de synthèse de la vitellogénine, principale hormone impliquée dans la formation du vitellus des œufs, a été mesurée dans le foie.

Afin de pouvoir déterminer la qualité du milieu, nous avons décidé de prélever des anguilles jaunes. A ce stade sexuel, les anguilles sont considérées comme un excellent indicateur de contamination qui peut être utilisé pour obtenir des profils des pressions chimiques spécifiques d'une zone et peut donc permettre d'étudier les variations spatiales des contaminations sur l'estuaire (Belpaire *et al.*, 2008). Ainsi, trois points de prélèvements ont été déterminés. Pour chacun d'eux, dix anguilles ont été prélevées. Le site de Varades figure comme le point le plus en amont de l'estuaire, zone limite de l'influence des marées. Il est principalement caractérisé par une forte pression agricole. Les deux autres points ont été fixés en partie amont (Bellevue) de l'agglomération nantaise et dans sa partie aval (Haute-Indre), le but étant de déterminer l'impact de la pression anthropique de l'agglomération nantaise sur les niveaux et les types de contaminants. Par ailleurs des anguilles argentées (15 femelles et 14 mâles) ont également été prélevées lors de la dévalaison dans une zone de pêche située en amont de Nantes. Celles-ci ont également été utilisées pour déterminer l'état chimique de la Loire et ont été comparées aux anguilles jaunes considérées comme sédentaires afin d'apprécier la variabilité induite par le stade sexuel.

Dans l'objectif de déterminer si les niveaux de contaminants présents dans les anguilles peuvent altérer le système thyroïdien de celles-ci, une comparaison des concentrations en T3 libre, T4 libre et T4 totale entre les deux stades sexuels (anguilles jaunes et argentées) et des corrélations avec les contaminants mesurés chez celles-ci ont été recherchées. Enfin, les analyses d'expressions géniques ont été effectuées chez les anguilles argentées pour déterminer d'éventuelles corrélations avec les contaminants et leurs impacts chez les deux sexes d'anguilles argentées.

Enfin, une interprétation des données de contamination en termes de risque sanitaire pour les consommateurs de ce type de poisson (anguille européenne) a également été proposée.

III.2. Article 1

➤ *Accepté en révision mineure dans le journal Science of the Total Environment (STOTEN)*

Occurrence of POPs and other persistent organic contaminants in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary, France.

M. Couderc^{1*}, L. Poirier¹, A. Zalouk-Vergnoux¹, A. Kamari¹, I. Blanchet-Letrouvé¹, P. Marchand², A. Vénisseau², B. Veyrand², C. Mouneyrac³, B. Le Bizec²

¹ LUNAM Université, Université de Nantes, MMS, EA 2160, Nantes, F-44322, France

² LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France

³ LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, MMS, EA 2160, Angers, F-49000, France

* Corresponding author: +33669552298, mikacouderc@yahoo.fr

ABSTRACT

The chemical contamination of the Loire estuary by three classes of persistent organic pollutants (POPs): the polychlorinated biphenyls (PCBs), the polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and the perfluorinated and polyfluorinated alkyl substances (PFAS), and three families of organic contaminants, the alkylphenols (APs), the polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (OH-PAHs) and the bisphenol A (BPA) were investigated in muscles and bile of European eel (*Anguilla Anguilla*). Yellow eels (n=30) were caught in three different points along the estuary to highlight variations between sites and sources of contaminations. Comparison between sexual stages was also investigated with measures on silver eels (n=15). Average concentrations in muscles of the eel groups ranged between: 857-4358 ng/g lw for the PCBs, 26-46 ng/g lw for the PBDEs, 130-1293 ng/g lw for the PFAS; and in bile: 31-286 µg/g protein for the APs, 9-26 µg/g protein for the OH-PAHs and ND-1213 µg/g protein for the BPA. Among PCBs, PCB 153 (40% contribution to the sum of PCBs) was predominant in all eel muscles. PBDE 47 (60%) was the most predominant PBDE congeners, while perfluorooctanesulfonic acid (85%) was the most widely detected PFAS. For APs, 4p-nonylphenol (91%) was the most abundant and for the OH-PAHs, it was 1OH-Pyrene (63%). All the eels exceeded the environmental quality standards (EQS) for biota for the PBDEs and about 75% were higher than the EQS specific to PFOS. Finally, 20% of the analyzed eels presented TEQ concentrations above the maximum limits for oil fish species. These results supplied new data on the occurrence, levels, and patterns of 53 organic chemicals in the eels from the Loire estuary and it highlighted the need to further investigations focused notably on the potential effects of these chemicals on this species and their analysis in the water and sediments of the estuary.

Keywords: PBDEs; PCBs; PFAS; PAH metabolites; Alkylphenols; BPA; European eel

1. INTRODUCTION

The anthropization of fresh water systems has led to strong urban, industrial and agricultural pressures. The water systems drain via catchment all the earth surface and thus large rivers are the final receptacle to diffuse pollution including organic compounds. Estuaries are one of the main zones receiving freshwater runoff before discharging into marine systems.

Persistent Organic Pollutants (POPs) are chemical substances that persist in the environment, bioaccumulate through the food chain and pose a risk of adverse effects to human health and environment. Numerous POPs were considered as priority pollutants by the Stockholm convention (Stockholm convention, 2009). The present study focused on several of these industrial chemicals of which the monitoring is of high interest. The polychlorinated biphenyls (PCBs) were used for their insulating and flame retardant properties. Despite their ban in the 1970s in most developed countries (1981 in France), they are still measured in environmental samples. The polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a class of brominated flame retardants (BFR). They have been widely used in a variety of household and industrial appliances such as textiles, electronic equipment, plastics and furniture (de Wit, 2002). The perfluorinated and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) are largely used as additives for the production of fluoropolymers and as surfactants in industrial and consumer products (Ahrens, 2011). The PFAS were basic components in the production of carpets, textiles, paper and packaging products (Ahrens, 2011). For these two last chemical classes (PBDEs and PFAS), the Water Framework Directive of the European Commission has set environmental quality standards (EQS) in surface waters (river, lake, transitional and coastal) (European Commission, 2008; European Commission, 2013). The EQS are the concentrations of a pollutant or group of pollutants in water, sediment or biota which should not be exceeded in order to protect human health and environment. Monitoring biota is a new Water Framework Directive requirement.

Other persistent organic contaminants, even if they are not included in the Stockholm Convention, are monitored in the environment. The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) form a class of various hydrophobic organic molecules which are ubiquitous persistent pollutants of the environment. They have two origins: natural (*e.g.* forest fires or volcanic activity) and anthropogenic (*e.g.* pyrogenic or petrogenic). For monitoring PAH exposure of fish, the PAH metabolites (OH-PAH) are used as markers as the parent compounds are rapidly metabolized (Nagel et al., 2012b). Alkylphenols (APs) such as nonylphenol, octylphenol and butylphenol principally come from the degradation of alkylphenolethoxylates

(APEs). These compounds represent a class of non-ionic surfactants widely used as detergent, wetting agents, dispersants, solubilizers, emulsifiers, *e.g.* in pesticide formulations and industrial products, including textiles, coating, lube oils and fuels, metals and plastics. In addition to their role of raw material for APEs, APs are used in the preparation of phenolic resins, polymers, heat stabilizers, antioxidants and curing agents (Ying et al., 2002). BisphenolA (BPA) is found ubiquitously in our environment (Vandenberg et al., 2007). This chemical is one of the most widely produced worldwide, with a production volume each year of over 2.7 million tons and it is estimated that every year over 100 tons are released into the atmosphere through production (Vandenberg et al., 2007). BPA is a monomer mainly used in the production of synthetic polymers such as the polycarbonates and the epoxy resins (Flint et al., 2012). All of these compounds (PCBs, PBDEs, PFAS, APs and the PAH (parent compounds of OH-PAHs)) are listed as priority substances within the European Union Water Framework Directives (European Commission, 2000; European Commission, 2008; European Commission, 2013). Since 2013, the list of the directive identified 45 substances or group of substances shown to be of major concern for European Waters (European Commission, 2013). These chemicals were selected from among those presenting a significant risk to or via the aquatic environment.

Chemicals released into the environment may impact ecosystems and human health. This is why it is important to monitor contaminants present in the environment in order to not only safeguard the ecosystems and man, but also target their origin in order to implement rules of restriction or prohibition of these compounds. The Water Framework Directive recommended the use of indicators for monitoring the chemical status of surface waters.

Biological indicators such as crustaceans (Munschy et al., 2013; Ricciardi et al., 2010), bivalves (Covaci et al., 2005) or fish (Bettinetti et al., 2011; Blanchet-Letrouvé et al., 2014; Bodin et al., 2014; Macgregor et al., 2010; Roosens et al., 2010; Schuetze et al., 2010; Tabouret et al., 2011; Tapie et al., 2011) were therefore used most often. Among these potential indicator species, the eel may be used. This bioindicator value is however restricted to the yellow eel phase, because of the reproduction and migratory behavior of the silver eels (Belpaire and Goemans, 2007). The European eel (*Anguilla anguilla*) has specific physiological and behavioral characteristics (such as catadromous, carnivorous, fat content, wide distribution, euryhyalinity and long lifespan) favorable for the use as chemical sentinel species (Belpaire and Goemans, 2007). As eel pollution profiles were shown to be significantly different along a river at small and large-scale (Belpaire and Goemans, 2007; Belpaire et al., 2008), it would be a valuable fingerprint of the chemical pressure of a specific

site, particularly for the lipophilic chemicals. Furthermore since 1950, the eel population has continued to decline even if the glass eel recruitment has increased slightly over the last two years (ICES, 2013). Overfishing, climate change, habitat reduction and numerous hydraulic barriers to the downstream and upstream migrations, impacts of pollution, diseases and parasitism were all factors explaining the overall decline of the stock (Dekker, 2003; Elie and Girard, 2009). In September 2008, the eel was listed as “critically endangered” in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List and one year earlier, it was included in the UN CITES Appendix II list (CITES, 2007). On the other hand, this fish species represents an important part of the human diet (Covaci et al., 2005).

For the European eel, the Loire estuary (France) represents one of the most important continental migration paths of glass eels. The Loire River is one of the largest west European rivers but also the last wild large and most preserved river in Europe. Its estuary constitutes an interesting study area because it is characterized by an important human pressure. Compared to other large French estuaries, few studies on eel contamination by organic compounds exists and they focused mainly on PCBs, dioxins and furans (PCDD/Fs) and PBDEs (Bragigand et al., 2006; Blanchet-Letrouvé et al., 2014; ONEMA, 2012). The aims of the present work were to investigate current levels and profiles of contamination of 53 organic compounds in European eels (*Anguilla anguilla*) collected along the Loire estuary. In order to evaluate variations according to the spatial locations in the estuary and/or life stage, the sample collections were carried out at three locations for yellow eels and at different life stages of the eels (yellow and silver).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Sampling locations

From its source in the Massif Central across the Paris basin before discharging into the Atlantic Ocean, the Loire River flows for more than 1000 km and drains around 118,000 km² catchment area. The Loire estuary is highly urbanized and industrialized, with the Nantes - Saint Nazaire harbor (4th seaport of France), a refinery (2nd in France), a coal power plant, a gas storage, an aircraft industry, a shipyard, etc. and is very attractive for tourism, especially on the coast. Moreover, the estuary constitutes the main source of drinking water for the western region. Agriculture is also an important activity around the estuary. Consequently, it is an area subject to major environmental issues. In the Loire estuary, resources of glass, yellow and silver eels are exploited. For glass, yellow and silver eels, there are about 100, 220

and 3 professional fishermen in the Loire estuary respectively. The annual yields of harvested eels for human consumption are about 3, 30 and 50 tons for glass, yellow and silver eels respectively. Figure 1 shows the three sampling locations selected in this study. Varades (47°21'58"N – 1°1'31''O) is a small city (about 3550 locals), located upstream in the estuary at the limit of the salinity (100 km from the Loire mouth); it presents few industrial activities and is particularly under agricultural pressure. The two other sampling locations are upstream (47°14'15"N – 1°28'2''O) and downstream (47°11'39"N – 1°40'4''O) an important city, Nantes (about 600,000 locals), called Bellevue and Haute-Indre respectively. These two areas are within a strong influence of the North Atlantic Ocean. The city of Nantes, located approximately 50 km from the mouth, is characterized by an industrial harbor and an urban zone including two incineration factories.

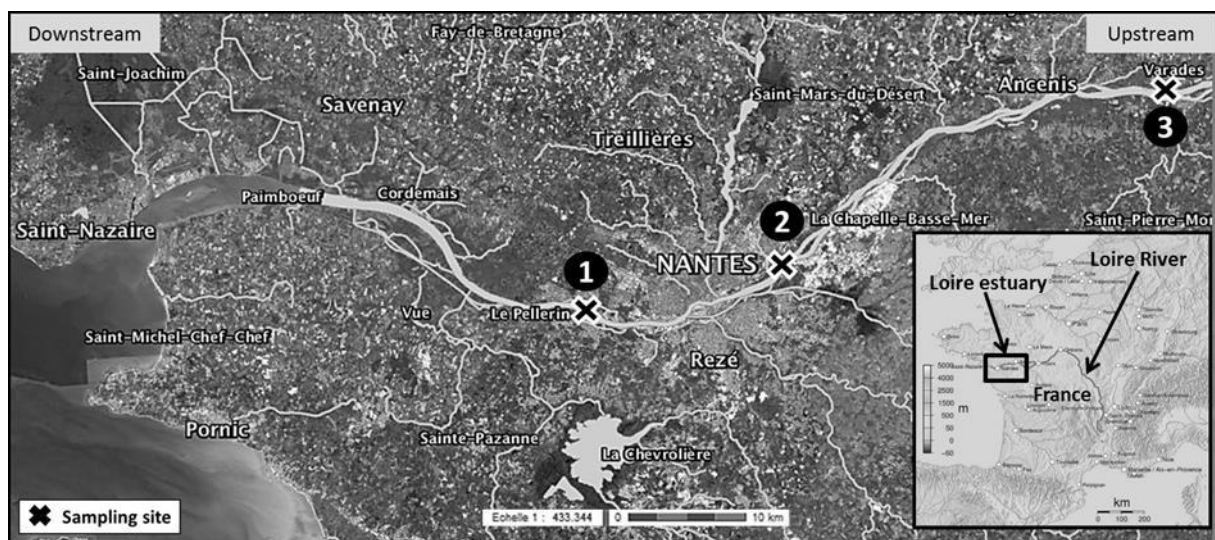


Figure 1. Map of the France and of the three sampling sites distribution on the Loire estuary. 1: Haute Indre; 2: Bellevue and 3: Varades.

2.2. Studied species and sample collections

According to the fishing authorizations, European eels (*Anguilla anguilla*) were fished by local fishermen in the three sampling areas described above at two life stages (silver (S) and yellow (Y)) in November 2011 and June 2012, respectively (Table 1). Yellow eels were collected with fyke and silver eels with stow nets. The aim is to assess the spatial and life stage influence on chemical accumulation. In function of the sampled fish, only female eels over 40 cm long were kept. The gender was confirmed during dissection. A total of 45 females were randomly collected: 10 yellow eels sampled at Varades (YV), 10 at Bellevue (YB; upstream to Nantes) and 10 at Haute Indre (YHI; downstream to Nantes), as well as 15 migrant silver eels (SV) sampled during downstream migration in the estuary (between

Varades and the mouth of the estuary). The silver stage was distinguished from the yellow one using morphological and physiological changes between these two sexual stages, *i.e.* body length, ocular diameter, body color (differentiated lateral line and contrasting skin color), pectoral fin length, empty stomach with gut degeneration and gonadal maturation underlined by gonado-somatic index (GSI) (Durif et al., 2005; Van Ginneken et al., 2007). After fish capture, the eels were conducted to the laboratory in 200 L tanks, aerated and filled with water from the sampling site. At the laboratory, the eels were acclimated during at least 12 hours under a natural photoperiod and at a temperature around $12^{\circ}\text{C} \pm 2$, equivalent to the fishing site conditions before dissection.

2.3. Biological samples and biometric parameters

Before dissection, the eels were anesthetized in a water bath of 30 L with 4.5 to 6 mL of clove oil solution dissolved in ethanol (70%) added, according to their weight. Once anesthetized, biometric parameters of each individual were measured, the total length (TL in cm) and the body weight (BW in g). The animals were then sacrificed by cardiac puncture and dissected on ice (4°C). The verification of gender was realized by direct anatomic observation of gonads. Only female eels were kept for this study. Gonads and liver were weighed to calculate the gonado-somatic index (GSI) ($\text{GSI} = \text{mass of gonads (g)} \times 100 / \text{body weight (g)}$) and the hepato-somatic index (HSI) ($\text{HSI} = \text{mass of liver (g)} \times 100 / \text{body weight (g)}$) respectively. The GSI allowed the evaluation of developmental stage of eels; GSI values higher than 1.2 underlined the gonad maturation occurring during silvering (Durif et al., 2009). The HSI provided indication on status of energy reserves in the liver. Biometric parameters recorded were used to calculate the Fulton condition index ($K = (\text{BW} \times 10^5) / \text{TL}^3$) which allowed the evaluation of overall global eel health. A reduction of this index has been considered, in fish, to be related to poor habitat quality, lower availability of food, changes in feeding habits and a metabolic rate increase in response to pollution and/or other environmental stresses (Hoque et al., 1998; Lloret et al., 2002).

The whole muscle (two filets) was also collected and then stored at -20°C until chemical analysis. The bile was sampled by puncture in the gallbladder and stored at -20°C . The swim bladder of each eel was removed and dissected to detect the presence of parasites. In the case of infection, the number and weight of parasites present in the swim bladder were determined to calculate the percentage of individuals infected and the parasite index (PI) ($\text{PI} = \text{parasite total weight (g)} / \text{body weight (g)}$) to evaluate the infection level (Quadroni et al., 2013).

2.4. Fish muscle analysis

2.4.1 PCB and PBDE analysis

2.4.1.1 Chemicals and reagents

Eel muscles were analyzed for 18 PCBs and 7 PBDEs. Among the PCBs, 12 were dioxin-like PCBs (dl-PCBs: #77; 81; 105; 114; 118; 123; 126; 156; 157; 167; 169; 189) and 6 were non dioxin-like PCBs (ndl-PCBs: #28; 52; 101; 138; 153; 180; also called PCB indicators (PCBi)). Seven PBDE congeners were monitored, *i.e.* BDE 28, 47, 99, 100, 153, 154 and 183. PBDE 209 was not analyzed because it required a specific analytical procedure not developed in the laboratory. Targeted compounds including native and ^{13}C labeled internal standards were obtained from Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada) and Cambridge Isotope Laboratories (Andover, CA, USA). All solvents (Picograde[®] quality) were purchased from Promochem (Wesel, Germany).

2.4.1.2 Sample preparation procedure

For PCB/PBDE analysis, eel muscles were homogenized, weighed and freeze-dried. The freeze-dried muscles were cut and milled using a turbo-mixer. Before use, all glassware was cleaned and heated overnight in a muffle furnace at 550°C and disposable materials were used for each experiment. Sample preparation was carried out in an over pressurized room to prevent contamination, especially for PBDEs. One gram (dw) of powdered sample was transferred into a cell and then extracted by Accelerated Solvent Extraction (ASE) using a Dionex ASE 300. Before extraction, ^{13}C -labelled PCBs and PBDEs (respectively 18 and 7) congeners were added to the sample for internal standard calibration and quantification by the isotope dilution method. The extraction temperature and pressure were set to 120°C and 100 bars respectively. The extraction solvent was a toluene/acetone (70:30, v/v) mixture. Three successive extraction cycles, of 5 min each, were performed. The muscle lipid weight (LW in % of wet weight) was determined by gravimetry. The fat extract was dissolved in 25 mL hexane before further sample clean-up. Three steps of purification were achieved, using successively acid silica, Florisil[®] and celite/carbon columns. The fat was removed on the first silica gel column activated with sulfuric acid. PCBs and PBDEs were purified on the second Florisil[®] column. The separation of coplanar (non-ortho) PCBs from non-planar PCBs and PBDEs was performed on an activated mixture of Florisil[®]/Carbopack C/Celite 545 (overnight at 130°C). Before evaporation to dryness under a gentle stream of nitrogen,

injection standards ($^{13}\text{C}_{12}$ -PCB #111 for PCBs, $^{13}\text{C}_{12}$ -PBDE #139 for PBDEs) were added to the final purified extracts for signal correction. Eventually, the extracts were reconstituted in 20 and 50 μL toluene for coplanar PCBs and non-coplanar PCBs with PBDEs, respectively.

2.4.1.3 GC-HRMS measurement

PCB and PBDE analyses were carried out by gas chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (GC-HRMS) using an 7890A gas chromatograph (Agilent) coupled with a Jeol JMS 700D or a JMS 800D double sector high resolution mass spectrometer (Jeol, Tokyo, Japan). The system was fitted with a DB5MS (J&W) capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and injection was done in the splitless mode. Helium was used as a carrier gas (1 mL/min). The injection volume was 2 μL . The GC program for PCBs was: 3 min at 120°C, 20°C/min to 170°C, 3°C/min to 245°C and 20°C/min to 275°C. For the PBDEs, the program used was: 2 min at 120°C, 10°C/min to 215°C, 3°C/min to 270°C, 10°C/min to 310°C and hold for 4 min. The source temperature was 280°C. The mass spectrometer resolution was set-up at 10,000 (FWHM) and the spectrometric signals were recorded in the Single Ion Monitoring (SIM) mode focusing on two abundant ions selected in the molecular ion isotopic pattern. Ionization was achieved in the electron ionization mode (40 eV electron energy). Signals obtained were integrated by JEOL Diok software (v.4). The limit of detection (LOD) was determined by a signal to noise ratio equal to 3 (S/N=3) and was systematically calculated by JEOL Diok software for each congener in each sample. The concentrations of PCBs and PBDEs were expressed as ng/g wet weight (ww), ng/g dry weight (dw) and ng/g lipid weight (lw). For PCBs, the LOD ranged from 0.16 (PCB 169) to 1.72 (PCB 156) pg/g ww for dl-PCBs and from 0.67 (PCB 101) to 13.4 (PCB 28) pg/g ww for PCBi. For PBDEs, the LOD ranged from 1 (BDE 28) to 5 (BDE 183) pg/g ww. The recoveries ranged from 60 to 120 %.

2.4.2 Toxic equivalency calculation

Health risk resulting from PCB toxicity was estimated by the Toxic Equivalent (TEQ) values. Concentrations of TEQs were calculated by summing the concentration of each congener weighed by a specific congener factor, the World Health Organization Toxic Equivalent Factors (WHO TEFs) for human. For comparative purposes with literature, our TEQ data have been expressed in WHO TEQ 1998 and WHO TEQ 2005 (Van den Berg et al., 1998; Van den Berg et al., 2006). In addition, dl-PCBs TEQ and Total TEQ were estimated by predictive models using the indicator PCBs (Babut et al., 2009; Bodin et al., 2014).

2.4.3 PFAS analysis

2.4.3.1 Chemicals and reagents

PFAS and corresponding ^{13}C -labelled internal standards (purity higher than 98%) were obtained from Wellington Laboratories (Guelph, Ontario, Canada). A total of 17 PFAS were analyzed in the eel muscles including 5 perfluoroalkylsulfonates (PFASS): perfluorobutanesulfonate (PFBS), perfluorohexanesulfonate (PFHxS), perfluoroheptanesulfonate (PFHpS), perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorodecanesulfonate (PFDS); 1 perfluoroalkylsulfinate (PFASi): perfluorooctanesulfinate (PFOSi) and 11 perfluorocarboxylic acids (PFCAs): perfluorobutanoic acid (PFBA), perfluoropentanoic acid (PFPA), perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA), perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluoroundecanoic acid (PFUnA), perfluorododecanoic acid (PFDoA), perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) and perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA). Ten labeled internal standards were used *i.e.* PFBA $^{13}\text{C}_4$, PFHxA $^{13}\text{C}_5$, PFHpA $^{13}\text{C}_4$, PFOA $^{13}\text{C}_4$, PFNA $^{13}\text{C}_2$, PFDA $^{13}\text{C}_2$, PFUnA $^{13}\text{C}_7$, PFDoA $^{13}\text{C}_2$, PFOS $^{13}\text{C}_4$ and PFOSi $^{13}\text{C}_4$. Methanol (Picograde[®] quality) was purchased from Promochem (Wesel, Germany). Ammoniac (32%), ammonium acetate, potassium hydroxide and glacial acetic acid were acquired from Merck (Darmstadt, Germany). The SPE WAX cartridges (150mg, 6mL) were purchased from Waters (Guyancourt, France) and the Envicarb cartridges (500mg, 6mL) from Supelco (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Ultrapure water (>18 m Ω cm) was produced with a nanopure system (Barnstead, Germany).

2.4.3.2 Sample preparation procedure

One gram of freeze-dried eel muscle was introduced into a polypropylene tube of 50 mL and 2 ng of an internal standards mixture (10 ^{13}C -mass labelled compounds) was added. The tube was agitated. Then, a liquid solid extraction (LSE) was performed by adding 15 mL 0.01M KOH of methanol before mechanical agitation during 15 min. The mixture was left overnight at room temperature. After extraction, 3 mL supernatant was transferred in a polypropylene tube and evaporated to 1 mL under a gentle nitrogen stream. 4 mL water were added to the supernatant before purification using solid phase extraction with WAX stationary phase. The cartridge was previously conditioned with 4 mL MeOH/NH₄OH (99.5:0.5, v/v), followed by 4 mL MeOH and 4 mL water. The extract was loaded on the cartridge and washed twice: first 4 mL ammonium acetate (20 mM) and then 4 mL MeOH. The elution was performed with 4

mL MeOH/NH₄OH (99.5:0.5, v/v). The eluted solution was evaporated to 1 mL under a gentle stream of nitrogen. Then, a second SPE composed of carbon graphitized (Envicarb) was conditioned with 10 mL MeOH. The extract was loaded on the cartridge and the target compounds were eluted with 6 mL MeOH/glacial acetic acid (80:1, v/v). After evaporation under a gentle stream of nitrogen, the extract was reconstituted with 160 µL water and 100 µL of a recovery standard PFOS ¹³C8 (0.01 ng/µL).

2.4.3.2 LC-MS/MS measurement

The purified extract was analyzed using liquid chromatography (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) coupled with tandem mass spectrometry. The separation of compounds was achieved using a Gemini C18 reverse phase column (3 µm, 50 x 2.0 mm) (Phenomenex, Torrance CA, USA). Elution solvents were MeOH 100% (A) and ammonium acetate in water (0.02 M) (B). The flow rate was 0.6 mL/min. The elution gradient was: t = 0-2 min: 30% A, t = 7-11 min: 100% A, t = 15-20 min: 30% A. The MS instrument used for detection and quantification was a triple quadrupole Agilent 6410 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The electrospray ionization was used in the negative mode. A minimum of two transitions were recorded per analyte. Mass spectra were acquired in the SRM mode. The common optimized source parameters were: capillary voltage, -3 kV; desolvation gas flow rate, 10 L/min; desolvation temperature was set at 300°C; nebulisation gas pressure at 45 psi and source temperature at 250°C. The fragmentor voltage and collision energy were optimized for each monitored PFAS. Signals were treated by Agilent MassHunter Workstation Software and concentrations of PFAS are reported as ng/g wet weight (ww), ng/g dry weight (dw) and ng/g lipid weight (lw). The LOQ value was determined for each target compound in each analyzed sample. LOQ were between 0.006 ng/g ww (PFOA) and 1.259 ng/gww (PFBA) for each PFAS.

2.4.4 Quality assurance/quality control

PCB, PBDE and PFAS concentrations were determined at LABERCA, the French National Reference Laboratory in charge *inter alia* of POPs in food and feed. All procedures were integrated in a certified quality assurance system ISO/IEC 17025:2005. A blank control and a fish oil as internal quality control were included in each series of analysis. Results of this quality control sample were plotted in control charts to check deviation. The compounds were quantified by isotopic dilution using the corresponding ¹³C-labeled isomers and internal standard method was used to quantify samples. The PCB procedure integrated quality control

parameters to fulfill the requirements of Commission Directives 2002/69/EC and 2005/7/EC laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of dl-PCBs in foodstuffs and feeding stuffs respectively. The laboratory applied the same requirements for PBDE analysis. The analytical method for PFAS was validated according to Commission Decision 2002/657/EC and 2004/25/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Furthermore, for each family of contaminants, LABERCA successfully participates in international proficiency tests in food (Norwegian Institute of Public Health and Amsterdam University).

2.5 OH-PAH, AP and BPA analysis in fish bile

2.5.1 Chemicals and reagents

BPA, 5 OH-PAHs (2-naphthol (2-OHNa); 2-hydroxyfluorene (2-OHF); 1-phenanthrenol (1-OHPhe); 9-phenanthrenol (9-OHPhe); 1-hydroxypyrene(1-OHPyr), 4 APs (4-tert-butylphenol (4-t-BP); 4-tert-octylphenol (4-t-OP); 4-octylphenol (4-OP) (CAS; 4-n-nonylphenol (4-n-NP) (CAS #104-40-5), and a mixture of 4-p-nonylphenol (4-p-NP) (CAS #84852-15-3) were purchased from Sigma Aldrich (France) as well as sodium acetate, ascorbic acid and β -glucuronidase with 1% sulfatase activity (Type H-3 from *Helix pomatia*). Ethanol (absolute) and acetonitrile (Scharlau LC-MS grade) were obtained from Interchim (France). To perform the analysis of total biliary proteins, sodium chloride, Trizma base and Bio-Rad Protein Assay were respectively purchased from Merck, Sigma Aldrich (France) and Bio-Rad (France).

2.5.2 Sample preparation procedure

Conjugated metabolites of bile were analyzed according to modified methods from Kammann (2007) and Jonsson et al.(2008). Twenty-five μ L of fish bile were incubated at 40°C overnight in the presence of 100 μ L of sodium acetate buffer (pH 5) and 25 μ L of β -glucuronidase sulfatase (100 units β -glucuronidase and 5 units sulfatase/ μ L bile). After incubation, 100 μ L of an ascorbic acid solution in ethanol (5 mg/L) were added and the mixture was vortexed for 1 min. A centrifugation was performed at 4°C, 10,000 G during 10 min and the supernatant was removed and injected in the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system.

2.5.3 HPLC-FL measurements

The HPLC system was an LC Ultimate 3000 (Dionex - Thermo Scientific) equipped with a quaternary pump (DGP-3600RS), a thermally controlled auto-sampler (fixed at 4°C) (WPS-300TSL), a column oven (TCC-3000SD) and a programmable fluorescence detector (FLD-3400RS, Dionex - Thermo Scientific). Chromatographic separation was performed on a reverse phase C18 column (5 µm, 250 mm x 3.0 mm; Supelcosil LC-PAH, Supelco, Sigma Aldrich) protected by a guard column (Supelgard LC-18, Supelco, Sigma Aldrich) and maintained at 50°C. Aliquots of 10 µL were injected and the flow rate was set at 1 mL/min. The mobile phase consisted of water (A) : acetonitrile (B) with the following linear gradient: t = 0-5 min: 60 % A; t = 15 min: 20 % A; t = 20-23 min: 100 % A; and t = 25-35 min: 60 % A. Before analysis, the lambda max of excitation and emission of each targeted compounds was determined using a 3D spectrofluorimeter (Perkin Elmer) and optimized with the fluorescence detector of the HPLC system used for the measurements (3D synchronous data acquisition). The excitation/emission wavelengths during the chromatographic run were: 225/313 nm for BPA and APs; 245/380 nm for 9-OHPhe, 1-OHPhe and 1-OHPyr; 271/334 nm for 2-OHF; 226/354 nm for 2-OHNa. The fluorescence detector allowed analyzing simultaneously 4 channels. Data were acquired and processed using the Chromeleon 7 software (Thermo Scientific). The contaminant quantification was performed by an external calibration using multilevel calibration curves (at least 6 concentrations) from a mixture of APs (linear range: LOQ-150 ng/mL), BPA (linear range: LOQ-150 ng/mL) and PAH metabolites (linear range: LOQ-200 ng/mL).

2.5.4 Recovery and limit of detection

Concentrations of AP, BPA and PAH metabolites were determined at MMS laboratory of Nantes University. The sample preparation procedure was validated using spiked samples. The recoveries of APs, BPA and PAH metabolites (OH-PAHs) were calculated before and after extraction to evaluate extraction efficiency and matrix effects. Spike solution containing all compounds at a concentration of 100 ng/ml in acetonitrile was added to fish bile randomly chosen. The spiked bile was treated as a sample. A blank sample (bile without spike solution) was also analyzed to determined background levels. These procedures were repeated three times. Recoveries obtained were: 92.4% for the BPA, 89.6% for the 4-t-BP, 89.0% for the 4-t-OP, 80.9% for the 4-OP, 79.9% for the 4-NP, 84.3% for the 2-OHNa, 79.2% for the 2-OHF, 85.9% for the 1-OHPhe, 47.6% for the 9-OHPhe and 89.0% for the 1-OHPyr.

The limits of detection and quantification (LOQ) were determined for each compound following the method described by Vial et Jardy (Vial and Jardy, 1999). The LOD values were: 0.25 ng/ml for the BPA, 0.18 ng/ml for the 4-t-BP, 0.41 ng/ml for the 4-t-OP, 0.003 ng/ml for the 4-OP, 0.46 ng/ml for the 4-NP, 0.017 ng/ml for the 2-OHNa, 0.033 ng/ml for the 2-OHF, 0.039 ng/ml for the 1-OHPhe, 0.48 ng/ml for the 9-OHPhe and 4.03 ng/ml for the 1-OHPyr.

Contents of APs, BPA and PAH metabolites were normalized by the measure of total biliary proteins and expressed as μg per g of protein. This normalization permitted the compensation of the differences of water content in the bile and the differences due to the feeding status of fish (Ruddock et al., 2003). The biliary protein content was measured by visible-spectrometry (UV-Visible spectrophotometer Helios Omega – Thermo Scientific) using bovine γ -globulin as standard protein (Bio-Rad Protein Assay) following the method of Bradford (Bradford, 1976).

2.6 Statistical analysis

Data were analyzed using Statistica software (v 7, Statsoft, Inc.). The conditions for applying parametric tests, *i.e.* homogeneity of variance and normality, were verified using Bartlett and Shapiro-Wilk tests respectively. As result of these tests, non-parametric tests (Kruskal-Wallis ANOVA (KW)) were used in order to highlight significant differences of contaminant levels in muscle and bile of eels from different locations and sexual stages. The KW test was followed by a post hoc test Multiple Comparisons of p-value (MCP) when it was significant at $p < 0.05$. Differences between groups were considered significant when $p < 0.05$. Links between variables were analyzed using the Pearson's correlation. As an integrated approach, Principal Component Analyses (PCA) was performed to illustrate and facilitate the discrimination of contaminant levels in muscle and bile of eels from different sites and sexual stages, as well as their biometric parameters.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Biometric parameters

The biometrics parameters (Table 1) were presented according to the life stage (yellow or silver) of organisms and the fishing locations along the Loire estuary (Varades, Bellevue and Haute-Indre). Four groups were considered: yellow eels from Varades (YV), from Bellevue (YB), from Haute-Indre (YHI) and silver eels (SV). Total length mean was significantly greater for the YB group compared with YHI and YV ($p=0.002$ and $p<0.001$ respectively) but not significantly different to SV ($p=0.524$). The lowest mean size was observed for YV which was very close to the YHI group. YHI and SV constituted intermediate groups. Nonetheless, SV had a greater mean size than YHI. Body weight differences between groups were similar to those found for the total length and showed the same significant differences. Whatever the life stage and the fishing location, BW was positively correlated to TL ($p<0.001$). The linear regression equations were $TL=0.056BW+39.62$ $R^2=0.887$ for YV, $TL=0.071BW+36.64$ $R^2=0.901$ for YHI, $TL=0.024BW+54.10$ $R^2=0.764$ for YB and $TL=0.039BW+46.71$ $R^2=0.946$ for SV. These results are in accordance with a previous study on eels (*A. anguilla*) from the Loire estuary (Blanchet-Letrouvé et al., 2014). The three groups of yellow eels had a lower LW than silver eels but this difference was significant only for YV and YHI eels ($p<0.001$ and $p=0.040$, respectively). These LW values were usually observed in silver European eels (Quadroni et al., 2013). Previous studies showed that yellow eels have lower lipid content mainly due to their growth whereas silver eels are in sexual development and accumulating lipid reserves for migration (Durif et al., 2005). According to Boëtius and Boëtius (Boëtius and Boëtius, 1980), the percentage of lipids necessary to support the energetic cost of gamete production and migration must be at least 20% of the body weight. Only one SV eel had a lipid weight lower than this value (LW=18.8%). All other silver eels had a lipid content ranging from 22.2% to 34.8%. Two more recent studies (Van den Thillart et al. (2004); Palstra and al.(2007)) established at 15% and 13.5% of the body weight, respectively, the lipid content necessary to realize the healthy migration to the Sargasso Sea. In the present study, it can be assumed that all silver eels fished had a high enough LW for the reproductive migration necessary for the species survey.

The range values of GSI for the SV group were 1.66 to 2.21% reflecting that all individuals of this group were in silver stage. GSI of yellow individuals was significantly lower ($p<0.008$) and ranged from 0.11 to 1.62%. Only three yellow individuals out of 30 showed GSI higher than 1.2% which could indicate the onset of silvering. YB and YHI tend to present higher

values of GSI compared to YV but the difference was not significant. No sampling site effect was evidenced on the liver weight of yellow eels, HSI values being very variable and ranging from 0.79 to 1.61. YB eels showed significantly lower HSI compared to SV ($p < 0.05$) but this difference was not found with other yellow eel groups. Durif et al. (2005) described a higher mean HSI value for yellow eels (1.58 ± 0.53) coming from different French waters and sampled between 1994 and 2002.

Silver eels were less infested by *Anguillicola crassa* than the yellow eels as showed by the PI. YHI presented the highest mean of PI among yellow individuals but the variability intra-group was high. The percentages of parasited eels, (40%:YV; 66.7%: SV;80%:YB and YHI) were in accordance with values usually observed in most eels from European habitats (40% up to 90%)(Palstra et al., 2007).

The Fulton's index constituted a heterogeneous biologic factor which could especially characterize the habitat context including pollution pressure and trophic conditions. On the whole, the Fulton's indexes of sampled eels were in the same range than those reported for eels fished in the Loire estuary in 2011(Blanchet-Letrouvé et al., 2014) and in other European habitats (Bultel et al., 2014; Palstra et al., 2007; Reckordt et al., 2014; Tapie et al., 2011).

Table 1: Means of biometric parameters (Total Length (TL), Body Weight (BW), Lipid Weight (LW), Gonads weight (wt.), Liver weight (wt.), parasitic parameters (*Anguillicola crassa* number and weight (wt.)), index (Gonado Somatic Index (GSI), Hepato Somatic Index (HSI), Parasitic Index (PI)) and Fulton's condition factor (K) of European eels sampled in Loire estuary.

Life stage	Yellow eels		Yellow eels		Yellow eels		Silver eels	
Sampling site	Varades (47°21'58"N – 1°1'31"O)		Bellevue (47°14'15"N – 1°28'2"O)		Haute-Indre (47°11'39"N – 1°40'4"O)		Estuary	
Catch period	November 2011		November 2011		November 2011		June 2012	
n	10		10		10		15	
TL (cm)	50.40 ± 5.73	(43.40-64.90)	71.74 ± 11.35	(52.20-87.20)	52.22 ± 7.04	(42.30-63.00)	61.80 ± 9.99	(50.30-83.50)
BW (g)	192.30 ± 96.41	(114.00-459.00)	727.50 ± 409.24	(262.00-1685.00)	222.20 ± 93.59	(123.00-359.00)	384.20 ± 247.62	(181.00-992.00)
LW (%)	6.16 ± 4.96	(0.70-15.16)	17.65 ± 11.05	(2.26-35.03)	13.32 ± 12.52	(0.64-34.77)	26.86 ± 4.36	(18.81-34.77)
<i>Anguillicola crassa</i> number	4.30 ± 7.73	(0.00-21.00)	2.40 ± 2.07	(0.00-6.00)	6.10 ± 9.95	(0.00-33.00)	2.47 ± 3.66	(0.00-14.00)
<i>Anguillicola crassa</i> wt. (g)	0.44 ± 0.60	(0.00-1.54)	2.61 ± 2.75	(0.00-9.16)	2.48 ± 3.12	(0.00-10.49)	0.22 ± 0.46	(0.00-1.54)
Gonads wt. (g)	0.62 ± 0.78	(0.15-2.81)	5.68 ± 6.22	(0.76-20.42)	1.46 ± 1.73	(0.14-5.57)	7.09 ± 4.05	(3.21-16.50)
Liver wt. (g)	2.20 ± 1.01	(1.44-4.86)	7.00 ± 3.33	(3.19-15.01)	2.76 ± 1.28	(1.34-4.58)	4.51 ± 2.73	(2.41-11.41)
GSI (%)	0.27 ± 0.15	(0.13-0.61)	0.66 ± 0.41	(0.29-1.53)	0.55 ± 0.48	(0.11-1.62)	1.89 ± 0.14	(1.66-2.21)
HSI (%)	1.16 ± 0.20	(0.83-1.43)	1.01 ± 0.14	(0.79-1.22)	1.22 ± 0.17	(1.08-1.61)	1.20 ± 0.15	(0.97-1.53)
PI (%)	0.25 ± 0.35	(0.00-0.90)	0.33 ± 0.22	(0.00-0.58)	1.01 ± 1.04	(0.00-3.23)	0.06 ± 0.13	(0.00-0.39)
K	0.14 ± 0.02	(0.12-0.18)	0.18 ± 0.03	(0.15-0.25)	0.15 ± 0.02	(0.12-0.18)	0.15 ± 0.01	(0.13-0.17)

(Mean ± standard deviation)

Table 2: Mean concentrations of dl-PCBs, ndl-PCBs (PCBi), PCBs (dl-PCBs+ndl-PCBs), PBDEs and PFAS in eel muscles and concentrations of BPA, APs and OH-PAHs in eel biles from Loire estuary according to the sampling site (Varades, Bellevue, Haute Indre) and the life stage (yellow and silver). Muscle concentrations are expressed in ng/g wet weight (ww), ng/g dry weight (dw) and ng/g lipid weight (lw) and bile concentrations are expressed in ng/ml bile and µg/g protein (prot.). (Mean ± standard deviation; min-max value are presented into brackets)

Life stage	Yellow eels		Yellow eels		Yellow eels		Silver eels	
	Varades		Bellevue		Haute-Indre		Estuary	
Sampling site	Varades		Bellevue		Haute-Indre		Estuary	
n	10		10		10		15	
Muscle concentration	dl-PCB sum (ng/g ww)	10.9 ± 5.1 (4.6-21.3)	51.1 ± 25.0 (7.5-85.1)	38.8 ± 26.5 (7.9-89.7)	34.8 ± 7.0 (26.2-48.5)			
	dl-PCB sum (ng/g dw)	38.6 ± 14.2 (21.0-61.1)	143.8 ± 71.3 (16.1-277.4)	105.4 ± 50.3 (34.5-201.9)	78.9 ± 16.7 (60.2-106.4)			
	dl-PCB sum (ng/g lw)	343.7 ± 350.4 (88.0-1156.1)	566.7 ± 701.4 (25.3-2418.4)	506.9 ± 374.0 (176.4-1225.3)	132.8 ± 33.9 (89.1-208.0)			
	ndl-PCB sum (ng/g ww)	63.4 ± 28.2 (29.1-125.2)	329.4 ± 207.7 (22.5-746.2)	256.2 ± 170.2 (69.3-635.8)	190.0 ± 34.7 (144.1-253.5)			
	ndl-PCB sum (ng/g dw)	223.6 ± 70.0 (131.7-359.4)	916.9 ± 538.3 (48.5-2005.4)	717.0 ± 342.0 (304.1-1430.9)	430.8 ± 86.9 (345.3-607.3)			
	ndl PCB sum (ng/g lw)	1945.3 ± 1922.2 (587.5-6659.9)	3355.7 ± 3583.9 (76.1-12270.2)	3851.2 ± 3367.2 (782.4-10795.5)	724.6 ± 180.7 (533.2-1078.5)			
	PCB sum (ng/g ww)	74.3 ± 33.2 (33.8-146.5)	380.5 ± 230.3 (30.0-821.5)	294.9 ± 195.7 (77.2-725.5)	224.8 ± 41.2 (172.2-302.0)			
	PCB sum (ng/g dw)	262.2 ± 83.9 (152.7-420.6)	1060.7 ± 600.7 (64.6-2207.7)	822.4 ± 389.8 (338.6-1632.8)	509.8 ± 102.5 (413.6-702.7)			
	PCB sum (ng/g lw)	2288.9 ± 2270.8 (675.5-7816.1)	3922.5 ± 4276.4 (101.5-14688.6)	4358.1 ± 3740.2 (958.8-12020.8)	857.4 ± 213.1 (622.3-1286.5)			
	PBDE sum (ng/g ww)	0.6 ± 0.5 (0.1-1.9)	4.9 ± 3.1 (1.8-10.9)	4.2 ± 3.2 (0.7-8.8)	9.5 ± 2.9 (6.7-18.1)			
	PBDE sum (ng/g dw)	2.2 ± 2.3 (0.4-8.1)	12.9 ± 6.1 (6.4-25.0)	10.9 ± 6.0 (2.9-18.0)	21.6 ± 6.4 (15.4-39.9)			
	PBDE sum (ng/g lw)	25.9 ± 42.1 (2.3-107.2)	40.5 ± 29.7 (10.0-102.9)	46.2 ± 29.2 (24.1-103.6)	36.3 ± 12.0 (21.8-70.0)			
	PBDE 47 (ng/g ww)	0.3 ± 0.3 (0.0-1.1)	3.0 ± 2.0 (0.9-6.7)	2.4 ± 2.1 (0.2-5.6)	6.5 ± 2.3 (4.2-13.5)			
	PBDE 47 (ng/g dw)	1.2 ± 1.3 (0.2-4.6)	7.8 ± 4.0 (3.7-15.3)	6.1 ± 4.0 (0.9-11.4)	14.6 ± 5.0 (10.1-29.7)			
	PBDE 47 (ng/g lw)	13.1 ± 20.7 (1.3-60.6)	22.4 ± 12.7 (7.5-47.4)	21.6 ± 8.3 (10.1-36.0)	24.6 ± 9.3 (14.4-52.0)			
	PFAS sum (ng/g ww)	22.5 ± 16.0 (5.1-47.8)	45.2 ± 44.1 (7.7-149.3)	20.0 ± 16.9 (4.1-50.4)	32.5 ± 23.4 (5.1-84.0)			
	PFAS sum (ng/g dw)	88.4 ± 71.9 (16.4-212.7)	123.7 ± 104.6 (16.5-342.1)	75.3 ± 76.2 (8.7-221.0)	75.4 ± 57.6 (12.0-210.0)			
	PFAS sum (ng/g lw)	1293.0 ± 2090.3 (50.5-6656.8)	398.5 ± 384.1 (26.0-1256.2)	1177.8 ± 2434.9 (12.4-7845.9)	129.9 ± 104.2 (18.7-370.5)			
Bile concentration	n	6	8	6	6			
	BPA (ng/ml)	3109.1 ± 1706.5 (1715.5-7012.4)	412.7 ± 705.2 (15.5-2321.2)	<LOD	-	36.8 ± 34.2 (18.6-125.9)		
	BPA (µg/g prot.)	1212.9 ± 1278.7 (147.0-3641.5)	127.5 ± 184.0 (8.4-564.9)	<LOD	-	5.2 ± 5.2 (1.7-15.6)		
	AP sum (ng/ml)	189.0 ± 107.1 (46.8-349.3)	141.0 ± 114.7 (35.3-358.1)	617.8 ± 237.8 (141.8-842.7)	160.8 ± 232.9 (0.0-569.2)			
	AP sum (µg/g prot.)	59.3 ± 39.5 (16.6-125.1)	64.2 ± 51.9 (21.4-170.0)	285.5 ± 226.1 (33.3-575.6)	30.7 ± 30.6 (4.4-70.4)			
	OH-PAH sum (ng/ml)	74.5 ± 44.3 (35.0-167.5)	23.9 ± 20.4 (0.5-53.7)	32.6 ± 11.7 (15.9-50.8)	148.8 ± 68.1 (0.0-259.4)			
OH-PAH sum (µg/g prot.)	26.0 ± 16.4 (3.7-43.7)	8.6 ± 10.0 (0.3-25.5)	14.9 ± 10.7 (4.6-32.8)	21.7 ± 6.3 (12.9-32.1)				

3.2 Contaminants in eel muscles

3.2.1 PCBs

The mean concentrations of dl-PCBs and PCBi according to the life stage and location in the estuary are presented in the Table 2. The 18 PCBs investigated were detected in all eels sampled in this study. The mean sum of these 6 PCBi for the yellow eels was 3050.7 ng/g lw. This concentration was lower than those measured in Flemish eels (Belpaire et al., 2011; Van Ael et al., 2014). In order to compare these results to previous studies, the PCB 118 was added to this sum. For yellow eels, the mean sum of the 6 PCBi +PCB-118 was twice lower (3326.9 ng/g lw) than concentrations measured in the Rhin and Meuse (5724-8518 ng/g lw) by de Boer et al.(2010) and in Flanders (4636 ng/g lw) by Van Ael et al.(2014). However, this value was greater than levels reported in Italia (Tevere river: 685.3 ng/g lw Bettinettiet al. (2011)), in France (the Gironde estuary: 2062 ng/g lw, (Bodin et al., 2014), and in the Adour basin: 193-1320 ng/g lw (Tabouret et al., 2011)). However, Tapie et al.(2011) found, in eels with the same size class, close concentrations in the Gironde estuary (1913-4473 ng/g lw), the Garonne river (1372-3478 ng/g lw) and the Dordogne river (1321-2992 ng/g lw). PCB eel contaminations were previously investigated in the Loire estuary by Blanchet-Letrouvé et al. (2014). Two sites were directly comparable with this study because of their proximity (Varades and Nantes/BelleVue). The results were similar for the yellow eels from these sites as well as silver eels. The downstream site in this study (Haute-Indre) was further away than the Cordemais site, leading to differences of eel contaminations. YHI eels seemed to be more contaminated than eels from Cordemais because the Haute-Indre site is closer to Nantes city. The results of the present study showed intermediate contamination of yellow eels from the Loire estuary compared to other French rivers. Silver eels were less contaminated (sum of the 6 PCBi and 6 PCBi +PCB-118, 725 and 799 ng/g respectively) compared to the whole of yellow ones, regardless of the sampling site. Regarding the influence of the fishing zone in the Loire estuary, yellow eels from Varades (YV) were significantly ($p<0.027$) less contaminated in ndl-PCBs and dl-PCBs expressed as ng/g ww and dw than the ones from the two other sites (YHI, YB). No differences were found between the YB and YHI. These results could be explained by the influence of the sampling site and the lw of eels. The Varades site is far from industrial and urban influences compared to the others sampling sites (BelleVue, Haute Indre). On the other hand, assuming that PCBs are lipophilic compounds, their levels are usually correlated to lw. In the present study, PCB levels (expressed in ww) were correlated to the lw only for YV and YHI groups ($p<0.05$). The differences observed in PCB accumulation could

be partially linked to lower lw depicted mainly for YV and to a lesser extent for YHI. Normalization of the PCB concentrations by eel lipid contents was more relevant for the comparison between the sampling sites, since other factors like the size and physiological condition also affected the overall bioaccumulation. This lipid normalization lead to similar levels whatever the sampling site, indicating that the contamination level in Varades was comparable to those in Bellevue and Haute Indre. However, the high variability of PCB concentrations in the different groups must be duly noted. This variability could be due to the fact that in estuarine habitats, furthermore in estuarine tidal systems, the sedentarity is less pronounced than in freshwater upstream habitats.

An influence of the sexual stage is only observable between YV and SV which was more contaminated ($p < 0.038$; for dl-PCB, PCB_i and PCB sum in ww and dw). When concentrations of ndl-PCBs, PCB_i and total sum PCBs were normalized by gram of lipids in muscle, YV levels were similar to SV and significantly ($p < 0.005$) lower than YB and YHI. These results could be explained by the fact that migrating silver eels could come from less polluted freshwater areas, far upstream, since the Loire River is characterized by the absence of barriers permitting the free downstream-upstream migration of fish. Furthermore, Daverat et al.(2004) reported that eels would not be strict sedentary fish. Moreover, lipophilic compounds like PCBs have the particularity of accumulating in fat muscle. Another hypothesis could be that the mobilization of lipid reserves would induce a detoxification process of the muscles of silver eels. In fact, silver eels during migration mobilized lipid reserves providing the necessary energy for sexual maturation and also for crossing the Atlantic Ocean to reach spawning sites (Durif et al., 2005). Since the Loire is a large river, a potential migration could start from areas located hundreds of kilometers upstream.

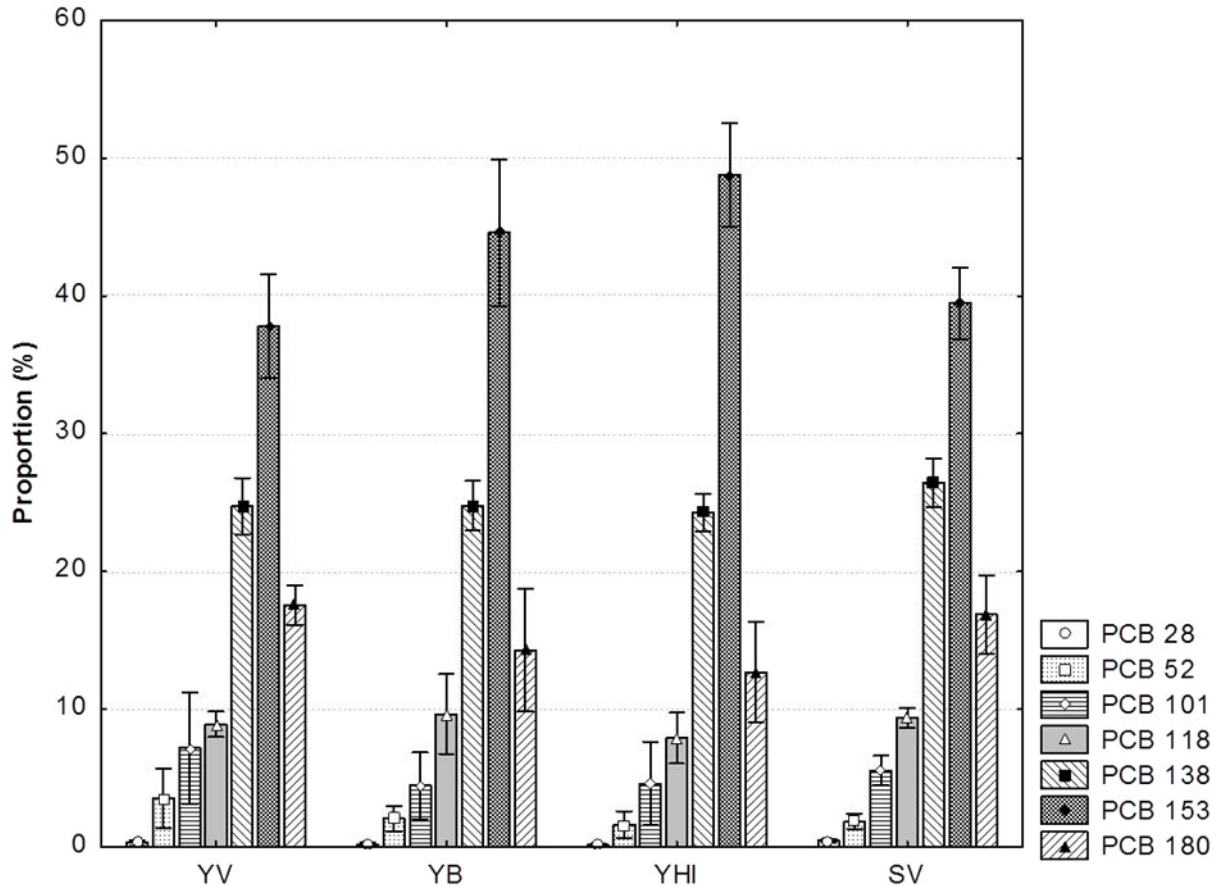


Figure 2. Profiles of the 6 PCB_i +PCB-118 in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades (n=10); YB: Bellevue (n=10); YHI: Haute-Indre (n=10)) and silver eels (SV; n=15). PCB proportions were calculated considering the sum of 6 PCB_i +PCB-118.

Error bars correspond to standard deviation.

In all sampled eels, dominant congeners among the 18 analyzed PCBs were PCB 153 (39.7%), PCB 138 (23.7%), PCB 180 (14.6%) and PCB 118 (8.4%) such as commonly found percentages in Europe, *e.g.* in Flanders (Van Ael et al., 2014) or Gironde estuary (Bodin et al., 2014). The 6 PCB_i represented 85.9 % of the total PCB concentration in yellow eel muscles and 84.5 % in the silver eels. The 6 PCB_i +PCB-118 contributed to 94.2% and 93.3% of the total PCB levels for yellow and silver eels respectively. According to PCB relative composition in commercial mixtures, this proportional dominance of PCB 153, 138 and 180 could reflect historic use and subsequent environmental dispersion of Aroclor 1260 (Belpaire et al. 2011; Frame 2001). The patterns of the 6 PCB_i +PCB-118 according to sampling site and sexual stage are illustrated in Figure 2. No differences were found for the PCB congeners 28, 52, 101 and 138 ($p>0.05$) between the eels of the 3 sampling sites. However, differences were found for the congeners 118, 153 and 180. The proportion of the PCB 153 increased for

the eels fished in the downstream part of the river, notably for the YHI eels, which were significantly different than the YV eels ($p < 0.001$). Conversely, the proportion of the PCB 180 decreased in eels fished downstream in the estuary. Indeed, the level was lower in YHI eels than in YV eels ($p = 0.004$). For the PCB 118, the percentage was greater in the muscles of YB eels than in YHI eels ($p = 0.041$) whereas no significant difference was found between YV eels and the two other groups. In this area of the estuary, numerous variations in geochemical processes such as salinity, turbidity, temperature and tidal cycles could affect the bioavailability of contaminants such as PCBs between the different sampling sites (Blanchet et al., 2014; Cailleaud et al., 2009; Turner, 2003). The results on PCB 153 and 180 were in accordance with those of Blanchet et al. (2014) for Bellevue and Varades sites. The PCB 153 was considered as a non metabolizable congener, *i.e.* a tracer of bioaccumulation process. Its higher proportion in YHI eels could suggest differences of diet, ecology, physiology or metabolism capacities, as already proposed by Tapie et al. (2011).

Regarding the influence of the life stage, SV eels presented similar patterns as the YV and YB eels, (except for the congener 28 which was significantly higher for the SV eels ($p = 0.009$)). The SV eels had greater proportions of the congeners 28, 118 and 180 than YHI and a lower proportion of the congener 153. These differences could be explained by the unknown origin of the SV eels. Moreover, the mobilization of the lipids during the silvering process could modify PCB patterns. During starvation, the neutral muscle lipids are more quickly metabolized than the polar ones for energy production (Osako et al., 2003).

According to all the data available for the Loire eels, the existing scoring systems (quality classes; Amilhat et al., 2013; Belpaire and Goemans, 2007; ICES, 2012) were applied to estimate the overall quality of the eels (Figure 3). The eels were classified as not impacted, slightly impacted, impacted and strongly impacted with PCB_i concentrations in eels < 62 , $62-155$, $155-391$, > 391 ng/g ww respectively. This figure confirmed the higher contamination of yellow eels from Bellevue and Haute-Indre, compared to Varades where more than a half of eels appeared to be not impacted. The silver eels showed less variability than yellow ones and appeared in the whole as impacted.

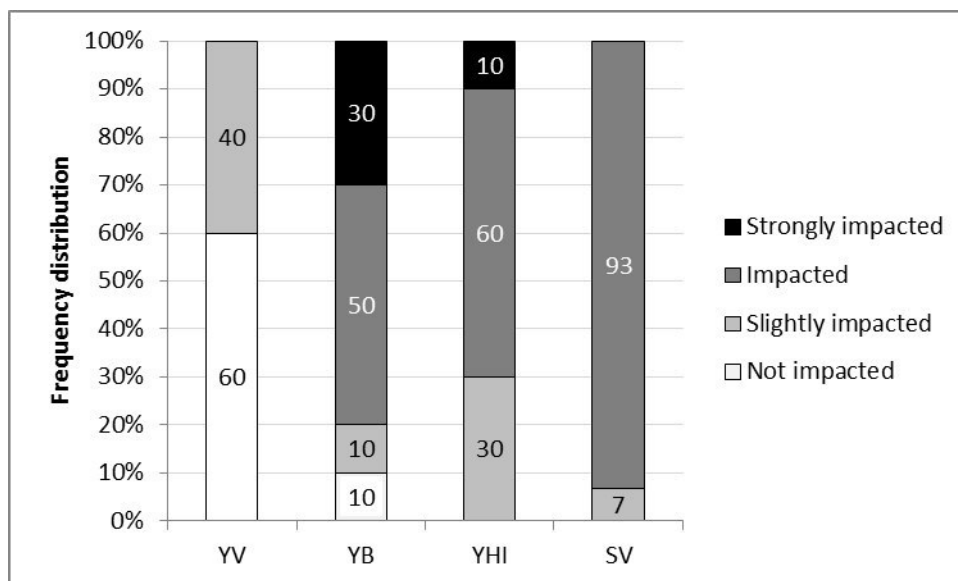


Figure 3. Eel quality classes distribution in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades (n=10); YB: Bellevue (n=10); YHI: Haute-Indre (n=10)) and silver eels (SV; n=15) according to $\Sigma 6$ PCB_i (ww).

3.2.2 PBDEs

PBDE accumulation in the eels is shown in Table 2. Among the 7 investigated PBDEs, 6 were found in all fish. The PBDE 183 was found in all SV but it was detected in 10 to 50 % of yellow eels. Burreau et al. (2006) indicated a link between biomagnification and the bromination degree. The PBDEs with up to 6-7 bromine atoms, except congener 183, biomagnify while heavier PBDEs do not. It could partially explain why it was not found in all fish. The presence of this congener in all SV could indicate different exposure windows and sources compared to yellow eels. Sum of PBDE concentrations ranged from 25.9 to 46.2 ng/g lw in yellow eels and was 36.3 ng/g lw in silver eels. Urbanized sites seemed to be characterized by greater PBDE concentrations than rural sites as reported by Macgregor et al.(2010) or Roosens et al.(2010). All analyzed eels exceeded the EU EQS biota for the sum of six PBDE congeners (28, 47, 99, 100, 153and 154): 0.0085 ng/g fish (European Commission, 2008; European Commission, 2013). The levels of PBDEs varied considerably, ranging from 10 to around 2100 times above the EQS.

The comparisons of monitoring studies are difficult since the number of analyzed PBDE congeners varied. Indeed, there are no PBDE indicators, such as for PCBs, and the regulatory measures of PBDE mixture uses tend to stabilize or decrease the contamination levels. This is why, because of its abundance, PBDE 47 is sometimes used to represent PBDE contamination and therefore, it is easier to compare studies using levels of this congener.

In the silver eels from the river Rhine, mean PBDE concentration was 88.7 ng/g lw (PBDE 47=59.2 ng/g lw) and in the river Elbe, they were 33.5ng/g lw and 30.2 ng/g lw for yellow and silver eels respectively (Sum of 9 PBDEs) (22.5ng/g lw and 21.5 ng/g lw for PBDE 47) (Sühling et al., 2013). Roosens et al.(2010) reported PBDE levels ranging from 10 to 5811 ng/g lw for eels from Flanders (Σ of 10 PBDEs). This high variability was due to a large data set with data from many sites of different typology, area or river basin including healthy sites and sites within proximity of industrialized areas (textile, production of electronic devices and plastic industry). Recently, Malarvannan et al. (2014) presented PBDE values ranging from 12 to 1400 ng/g lw (Σ of 14 PBDEs) in eels from Flanders. Concerning eels from French rivers, Bragigand et al.(2006) found PBDE concentrations in eel muscles ranging from 3.5 to 13.1 ng/g ww in the Seine estuary and from 0.3 to 0.9 ng/g ww in the Loire (Σ 6 of PBDEs)(54 ng/g lw and 1.6 ng/g lw for the PBDE 47). The eels from the Seine estuary were represented by yellow individuals and appeared to be more contaminated than yellow eels of our study. The levels found in the eels from the Loire were obtained in muscles of silver eels and were lower in comparison to our data. A study on eels of same size class from the Gironde estuary reported concentrations between 61 and 237 ng/g lw (Tapie et al., 2011). Compared to the PBDE concentrations found in eels from European waters, the eels from the Loire estuary, like those from Irish waters (McHugh et al., 2010) and from French Mediterranean coastal lagoons (Labadie et al., 2010), seemed to be less contaminated. Since there are few companies using PBDEs in the basin of the Loire (Bragigand, 2005), moderate PBDE levels in the Loire should mostly result from the use and incineration of goods commonly consumed in everyday life (Bragigand et al., 2006). Furthermore, Penta-BDE and octa-BDE mixtures have been banned in Europe since 2004 and the deca-BDE, the only PBDE mixture authorized, is no longer produced in France or in the European Union (INERIS, 2012), contributing as well to a moderate contamination. Urbanized sites tended to have greater PBDE levels than rural sites as reported for example by Macgregor et al. (2010) or Roosens et al.(2010).

Among the three sites studied in the Loire estuary, YV eels showed PBDE concentrations (expressed in wet and dry weight) significantly lower than the YB and YHI eels ($p<0.05$)The YHI eels downstream the river showed PBDE levels (expressed in lw) twice greater than YV eels ($p=0.036$), YB eels being intermediate. PBDE contaminations would be increasing in the direction of the mouth of the estuary. YB and YHI eels located in urbanized and industrialized sites seem to be greater exposed to PBDEs than the YV eels under agricultural pressure.

According to the sexual stage, silver eels were significantly more contaminated by PBDE compounds than the yellow eels ($p < 0.036$), except for the YB eels. YB eels presented singular physiological characteristics (BS, BW and LW) close to the SV ones which could explain this similarity. After normalization of concentrations by the lipid content, all differences were annihilated suggesting correlation between PBDE concentration and lipid content. However, PBDE concentrations were significantly correlated with lipid content only for the YHI eels. The absence of correlation between PBDE concentration and LW for the SV eels, as well as for PCB levels, could be explained by the lipid mobilization and by the lack of information on their upstream habitat, which may be less contaminated than the estuary.

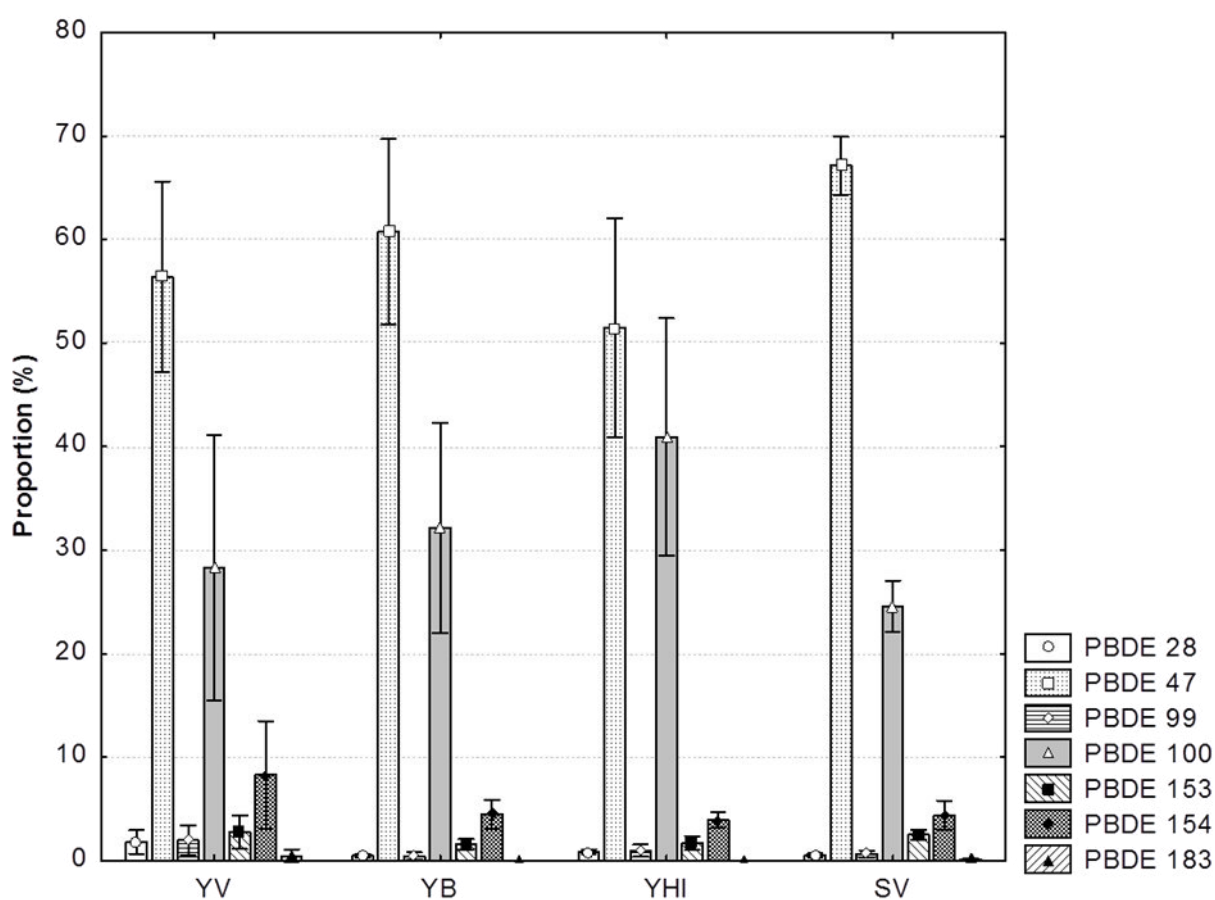


Figure 4. Profiles of the 7 PBDEs in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades (n=10); YB: Bellevue (n=10); YHI: Haute-Indre (n=10)) and silver eels (SV; n=15). PBDE proportions were calculated considering the sum of 7 PBDEs. Error bars correspond to standard deviation.

PBDE patterns are presented in Figure 4. Whatever the sexual stage and location, the most abundant congeners in eel muscles were the PBDE 47 ($59.9 \pm 9.8\%$) followed by the PBDE 100 ($30.7 \pm 11.1\%$) and the PBDE 154 ($5.2 \pm 3.1\%$). PBDE 47 is usually the most abundant

congener in fish due to its high uptake rate and to its high bioaccumulation factor (Andersson et al., 1999; Burreau et al., 2006). The high contribution of congener 47 in the patterns may also be due to the enzymatic debromination of higher brominated PBDEs in lower brominated ones, like 47, during the metabolization in fish (Eljarrat and Barceló, 2011). For the other PBDE analyzed congeners, the concentrations were low and sometimes below the analytical limit of detection, notably for the congener 183. The low proportion of PBDE 99 could be explained by three hypotheses: i) the nature of source contamination; ii) the low assimilation efficiency (Burreau et al., 1997; Stapleton et al., 2004a,b); iii) the possible biotransformation/metabolism to PBDE 47 in eels as hypothesized by several authors (Labadie et al., 2010; Malarvannan et al., 2014; McHugh et al., 2010; Roosen et al., 2010). Such metabolic pathways have been described for another fish, the Carp (*Cyprinus carpio*) by Stapleton et al. (2004c). Analysis of spatial differences showed no significant differences between sites considering the PBDE 47 as well as the congeners 153, 154 and 183. The congeners 28 and 99 presented a significantly higher percentage in the YV eels than in the YB eels ($p < 0.008$). The YHI eels had a higher proportion of the PBDE 100 than the YV eels ($p < 0.031$).

Regarding sexual stage, differences were founded for 5 PBDE proportions but without evident coherence. Thus, the congener 28 concentration was lower in SV eels than in YV eels ($p < 0.004$). For the PBDE 47, the SV eels had a higher percentage than YV and YHI eels ($p < 0.013$). The proportion of congener 100 was lower in SV eels than YHI eels ($p < 0.002$). The PBDE 153 had higher proportion in SV eels than in YB eels ($p < 0.007$). And the 183 were more represented in the SV eels than in YB and YHI eels ($p < 0.003$). It must be duly noted that a greater proportion was observed in the pattern of the SV eels for the higher brominated congeners. The PBDE profile of SV eels consisted of PBDE 183 and PBDE 153, which are congeners of the technical octa-BDE mixture. Since August 2004, the penta- and octa-BDE mixtures are banned in Europe due to European scientific assessments (INERIS, 2012). Assuming that the silvering metamorphosis occurs after the juvenile growth and differentiation phase (>7 years for females) in the inland waters (Van Ginneken et al. 2007), their presence in the SV eels could probably be linked to the exposure to this technical mixture before the ban. It could also be induced by debromination to lower brominated congeners of the technical deca-BDE mixture as described by Eljarrat et al. (2011), this mixture being the only one authorized in Europe.

3.2.3 PFAS

The PFAS sums observed in eels from the estuary are presented in Table 2. The values were between 75.25 and 123.67 ng/g dw with great variations within the different groups. A total of 17 PFAS were investigated and only 2 (PFOS and PFUnA) were detected in all muscle eels. The PFOSi was not detected in any eels. Among the 5 perfluoroalkylsulfonates substances (PFASS), only the PFOS was found in all eels. In contrast, the PFBS was not detected in all samples. The PFOS is known for its high bioaccumulative potential, whereas PFBS is considered nonbioaccumulative (Conder et al., 2008), which is consistent with present results. The PFHxS was observed in all yellow eels but not detected in 2 SV eels. PFHpS was present in about one quarter of individuals, mainly in SV and YB eels, but never in all fish of these groups. Only 8 out of the 11 studied perfluorocarboxylic acids (PFCAs) were detected in eel muscles. The PFHxA was in only one fish (YV) and the PFUnA was in all eels. Not detected PFCAs were the PFBA, the PFPA and the PFHpA. The 6 others were found in all eel groups but not in all fish. According to Conder et al. (2008), the PFCAs with shorter carbon chain possess a very low or nonexistent bioaccumulation potential that could explain the lack of detection of the PFCAs with 7 or less carbons.

PFAS regulation is recent and involves only few compounds. Since May 2009, perfluorooctane sulfonic acid (PFOS), its salts and perfluorooctanesulfonyl fluoride (PFOSF) are part of the 9 substances added to the list of substances covered by the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) (Stockholm Convention, 2009). As such, PFOS and derivatives are covered (restrictions on the marketing and use for substances) by Regulation (EU) No 207/2011 of Commission Regulation and directive (EU) 2006/122/EC of the European Parliament and of the Council of 2 March 2011 and 12 December 2006, respectively. The EU EQS specific to PFOS was 9.1 ng/g ww for biota (European Commission, 2013). Three quarters of eels fished in this study exceeded this value (YV: 70%, YB: 90%, YHI: 50% and SV: 73%). The highest value was approximately 14 times higher than the UE EQS PFOS and was found in muscle of one YB eel. To our best knowledge, data on the eel contamination by PFAS in Europe are scarce. It is therefore difficult to compare the levels at the national and the European scales. The predominant PFAS found in all species, tissues and locations around the world is the PFOS (Houde et al., 2011). The level of PFOS in the present study ranged from 67.6 to 106.9 ng/g dw (17.9 to 39.0 ng/g ww) for yellow eels and was 61.6 ng/g dw (26.6 ng/g ww) for the silver ones. In German water, the average levels of PFOS in different fish (herring, mackerel, eel, trout, carp, bream) ranged from 12.0 to

135.7 ng/g ww and the compound was not detected in 3 sites (Lake Storkow, North and Baltic Sea)(Schuetze et al., 2010). In this same study, the PFOA was not detected in any investigated samples. The distribution of 15 perfluorinated compounds in eels from aquatic systems in The Netherlands was studied by Kwadijk et al.(2010). The authors found only 3 PFAS in all eel filets. The PFOS was found to be the predominant compound with concentrations ranging from 7 to 58 ng/g ww. The two other PFAS, the PFHxS and PFDoA, were detected at a level approximately 10 times lower than PFOS. In a comparative earlier study conducted also in the Netherlands, the PFOS ranged between <8 to 143 ng/g ww (Schrapp et al., 2004). Eels caught in Lake Möhne in Germany had PFOS concentrations ranging from 37 to 83 ng/g ww and a maximum PFOA concentration of 2.3 ng/g ww (Hölzer et al., 2011). However, the PFOA was not found in all fish from this Lake and the other analyzed PFAS (PFDoA, PFUnA, PFDA, PFNA, PFHpA, PFHxA, PFHxS and PFBS) were not detected in any fish sample. Again, the absence or the lower levels of PFAS with a shorter carbon (< 7 C) were found.

The presence of PFAS and particularly of PFOS in eels from the Loire could be explained by the industrial activities around the estuary. In fact, the Pays de la Loire region is France's foremost region for wood transformation, especially paper industry and for metal surface treatment industry, both of which represent potential sources of PFOS (Munsch et al., 2013). Regarding the spatial (YV, YHI and YB) and the sexual stage (yellows vs silvers) differences, no significant differences between the PFAS sums were observed whatever the expression unit (ww, dw or lw) due to the very high variability of the concentrations of these groups, particularly expressed in lw. The PFAS accumulations in eels seem to be independent to the sampling site and life stage. Regarding the chemical properties of some PFAS, especially the PFOS, the body fat content was known as an important parameter to explain the bioaccumulation. However, in this study, the lipid content was negatively correlated with the PFAS sums, expressed as dw and ww, for the YHI eels ($p < 0.05$) and no correlation was found for the other groups.

The PFAS patterns (Figure 5) showed that PFOS is the major detected PFAS. Its contribution to the sum was comprised between 84 and 88 %. This is the major PFAS found in fish (Hoff et al., 2005; Hölzer et al., 2011; Houde et al., 2011; Kwadijk et al., 2010; Labadie and Chevreuil, 2011; Miège et al., 2012; Schuetze et al., 2010). No differences between the three studied sites were found for the main PFAS (PFOS, PFDA, PFUnA and PFDoA). However, the YHI eels had a greater proportion of PFHxS than the two other groups. Regarding the sexual stage, the SV eels, like the YV and YB, had a lower proportion of PFHxS than YHI eels ($p = 0.037$). The YHI eels were caught after Nantes city thus the PFHxS contamination

could be due to urban pressure (sewage effluents) and to industrial activities around this city, especially the paper industry. The PFUnA proportion was higher in SV eels than in YV eels ($p=0.048$) among the main PFAS (PFOS, PFDA, PFUnA and PFDoA). The origin of this compound preferentially found in SV eels was difficult to explain, notably due to unknown living area of these silver individuals.

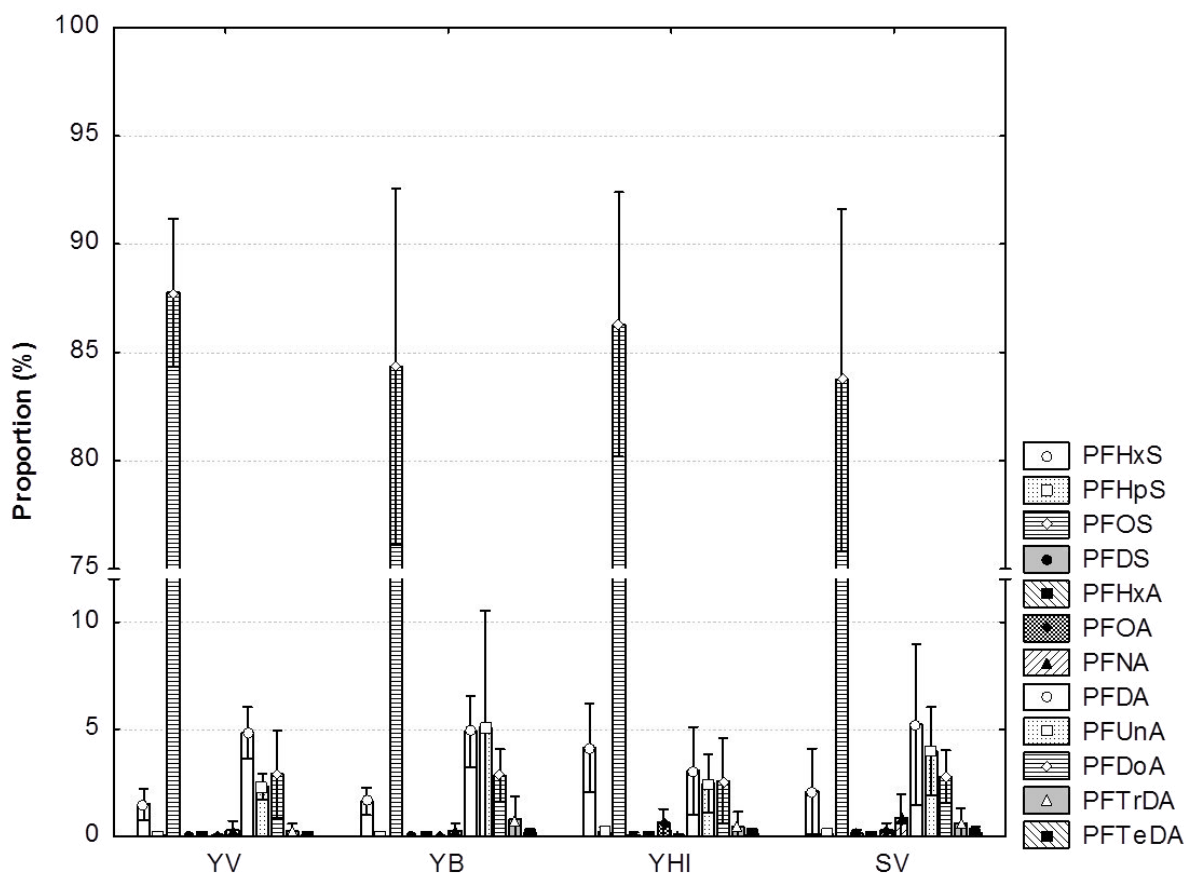


Figure 5. Profiles of the 12 PFAS in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades (n=10); YB: Bellevue (n=10); YHI: Haute-Indre (n=10)) and silver eels (SV; n=15). PFAS proportions were calculated with the sum of 12 detected PFAS. Error bars correspond to standard deviation.

3.3 OH-PAHs, APs and BPA in eel biles

The BPA level, AP sums and OH-PAHs sums are presented in Table 2. The 4-OP and the 9-OHPhe were not detected in the bile of all eel groups. In contrast, the 4-p-NP and the 1-OHPhe were found in all fish, whereas the other OH-PAHs and APs were not systematically detected. Because of the variability of the feeding status and the water level in the bile, some studies recommended to normalize the biliary PAH metabolite concentration using the biliverdin or protein concentration in this biological matrix (Blahova et al., 2014; Nagel et al., 2012a; Ruddock et al., 2003). Investigating influences of the silvering process of European eel on the PAH metabolite concentrations in bile, Nagel et al. (2012b) particularly recommended the use of a normalization. The protein concentration was chosen in this study to show normalized to protein concentrations as well as non-normalized ones. The volume of bile of several eels was low and did not allow the analysis (YV: n=6/10, YB: n=8/10, YHI: n=6/10 and SV: n=6/15). Therefore, obtained results should be analyzed with caution. Nevertheless, they provide interesting data on the presence of contaminants poorly studied in the fish of the Loire estuary.

In the present study, the mean sums of OH-PAHs varied between 23.9 and 148.8 ng/ml bile with concentrations ranging from 25.5 to 100.5 ng/ml bile (11.3-20.4 µg/g prot.) for the 1-OHPyr and from 3.6 to 38.0 ng/ml bile (1.4-5.0 µg/g prot.) for the 1-OHPhe. European eels caught in the United Kingdom estuaries had 1-OHPyr and 1-OHPhe contents from 120 to 7600 ng/ml bile and from 23 to 2096 ng/ml bile respectively (Ruddock et al., 2003). In eels from German rivers, the mean 1-OHPyr and 1-OHPhe detected values ranging from 10.9 to 2420.8 ng/ml bile and 52.7 to 632.4 ng/ml bile respectively (Nagel et al., 2012a). 1-OHNaph and 1-OHPyr were found in eels living in the Orbetello lagoon (Italy) at concentrations up to 8,000 and 13,000 µg/ml bile, respectively (Gorbi et al., 2005). The contamination of eels in the Loire estuary is low compared with these levels depicted in eels from other European waters. These results are very surprising since the estuary of the Loire includes the second largest refinery of France, a coal-fired plant, an incinerator and a port with high activity (the 4th in France). All these activities are known to be sources of pollution, including PAHs, and the presence of metabolites in eel bile can provide information on the putative sources of PAH contamination. The 1-OHPyr, which is the prevalent compound detected in the eel biles in this study, is the main metabolite of pyrene. The pyrene is released by significant pyrolytic and petrogenic industrial processes. For this reason it is a common and widespread PAH (Ariese et al., 1993; Van Der Oost et al., 2003). The second greatest abundant metabolite found in bile

eels from the Loire was the 1-OHPhe, one of the degradation metabolites of phenanthrene. This PAH is generated by the combustion of fossil fuels, in particular coal, oil and its refined products (O'Malley et al., 1996; Varanasi et al., 1989). Lower concentrations of 1-OHPhe compared to 1-OHPyr may be related to the fact that phenanthrene bind strongly to sediment particles reducing their bioavailability (Yuan et al., 2001). Furthermore, it was shown that some low molecular weight metabolites of phenanthrene were mainly excreted in the urine (Timbrell, 2000). Therefore, low levels in the bile may not reflect exactly the environmental exposure of the fish (Ruddock et al., 2003).

Among the three studied sites where yellow eels were caught, no differences between OH-PAH concentrations were found after normalization of the protein contents of the bile ($p > 0.05$). Comparison between yellow and silver eels showed the same results, no difference was highlighted between the OH-PAH sums in bile ($p > 0.05$).

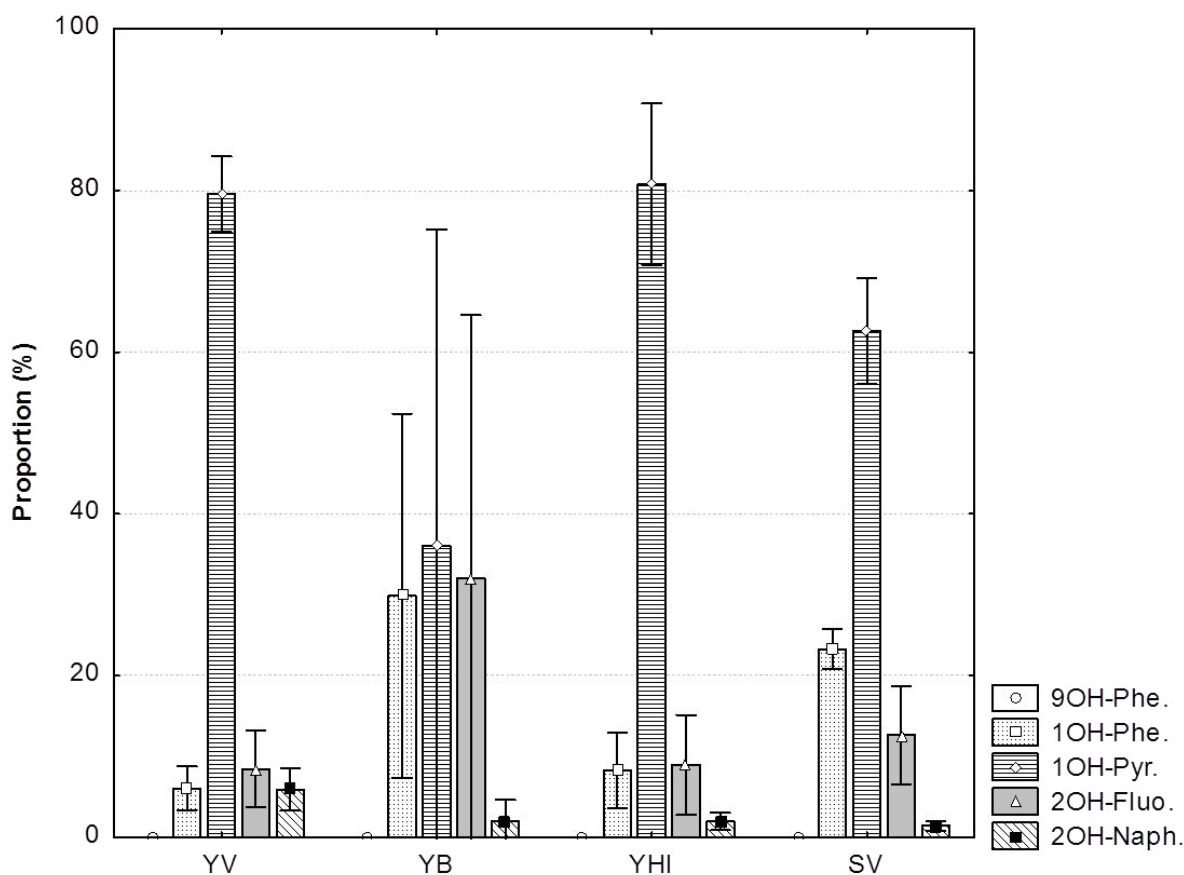


Figure 6. Profiles of the 5 OH-PAHs in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades (n = 6); YB: Bellevue (n = 8); YHI: Haute-Indre (n = 6)) and silver eels (SV; n = 6). OH-PAH proportions were calculated considering the sum of 5 OH-PAHs. Error bars correspond to standard deviation.

Among the five analyzed OH-PAHs, the 1-OHPyr was the most abundant (Figure 6). It represented an average range between 36.0 and 80.8 % of the sum of OH-PAHs. Although the 1-OHPyr is regarded as the most abundant compound present in fish bile and the best indicator of PAH exposure in fish (Ariese et al., 1993; Beyer et al., 2010; Ruddock et al., 2003; Van Der Oost et al., 2003), this compound was not detectable in all eels in this study. Analysis of spatial influences showed differences for the 1-OHPyr, the 1-OHPhe and the 2-OHNaph. For the 1-OHPhe, YV eels had a significantly lower percentage of this metabolite than YB eels ($p=0.009$). For the two other metabolites, it was the opposite; the YV eels had a significant higher proportion of 1-OHPyr and 2-OHNaph than the YB eels ($p=0.044$ and $p=0.020$) and also for this last than the YHI eels ($p=0.041$).

Regarding sexual stage, differences were found for the 1-OHPhe and 2-OHNaph metabolites. SV eels had a greater percentage of 1-OHPhe than YHI and YV eels ($p=0.044$ and $p=0.012$). The 2-OHNaph was present in a lower proportion in the bile of SV eels than in YV eels ($p=0.017$). This metabolite is an indicator of recent exposure to petrogenic compounds (Martínez-Gómez et al., 2013). Independent from the significant differences of individual OH-PAH proportions between sites and sexual stages, the distribution patterns of YV, YHI and SV eels seemed to be quite similar whereas those of YB eels was different, presenting high variability. These patterns seemed not to be balanced by the industrial, urban and agricultural activities. The origin of the OH-PAHs in eel bile and the organic compound behavior could be explained by the study of the PAHs in sediments.

APs and BPA were measured in the average range of 141.0-617.8 ng/ml bile and 36.8-3109.1 ng/ml bile respectively. Among the analyzed APs, two were mainly found: the 4-p-NP and the t-OP (concentrations ranging from 139.0 to 612.2 ng/ml bile and 2.8 to 15.1 ng/g bile, respectively). In the literature, no data seems to be available on wild eels. Nevertheless, some results were found for other fish species from European waters. In the Bay of Biscay (Southwestern Europe), alkylphenolic compounds were measured in bile of the thicklip grey mullet in the average range of 856-7483 and 21-153 ng/g of NP and OP levels respectively (Puy-Azurmendi et al., 2013). Biliary NP and t-OP were detected in *Alepocephalus rostratus* from the Western Mediterranean Basin with mean concentrations ranging from 42.5 to 67.1 ng/g bile for NP and from 7.9 to 14.2 ng/g bile for the t-OP (Koenig et al., 2013). Red mullets from polluted areas of the NW Mediterranean Sea showed mean concentrations that ranged from 0.34 to 28.3 μg NP/g bile and 30 to 250 ng t-OP/g bile (Martin-Skilton et al., 2006). The mean concentrations reported for red mullets caught at several sites along the

Spanish Mediterranean coast were 358.4-923.3 ng/g for the NP and 18.8-63.1 ng/g bile for t-OP (Martínez-Gómez et al., 2013).

Compared to these data, eels from the Loire estuary were less exposed to APs than other fish caught in different waters from Europe. Regarding BPA, it was found at concentrations similar to those found in some other studies. For example, in the bile from male breams collected in Netherlands, levels of BPA measured were 32.4 to 3082.3 ng/ml bile (Houtman et al., 2004).

Among the three sites of the Loire estuary, BPA was not detected in bile of the YHI eels. The YV eels had high levels of BPA, 10 fold higher than YB eels ($p=0.007$). Regarding the sexual stage differences, the YV eels presented high BPA levels in bile ($p<0.001$), around 200 fold greater than SV eels. Once again, these results are difficult to correlate to the different natures of site activities.

For the AP sums measured in bile, no difference was found between the yellow eels. The SV eels had once again a lower mean AP sum, significantly different than those of the YHI eels ($p=0.022$).

The AP pattern is presented in Figure 7. The more abundant AP in eel bile was the 4-p-NP with ranges from 70.2 to 99.2 % followed by the 4-tOP with a percentage comprised between 0.5 and 29.8 %. As with the mean AP concentrations, no variation was found between profiles of yellow eels from the three sampling sites. Regarding the sexual stage influence, the SV eels presented no significant difference with the YV eels and different patterns compared with the two other yellow groups. SV eels had a greater percentage of 4-tOP than the YHI and YB eels ($p<0.002$) and a lower percentage of the 4-pNP ($p<0.005$). For APs, and independent from the significant differences of individual proportions between sites and sexual stages, SV eels showed patterns slightly different than the yellow eels with high variability. The difference as well as the variability could be explained by the fact that migrating silver eels could come from upstream areas more or less polluted. The sediment analysis could confirm the similar AP exposition of the eels in the different sites.

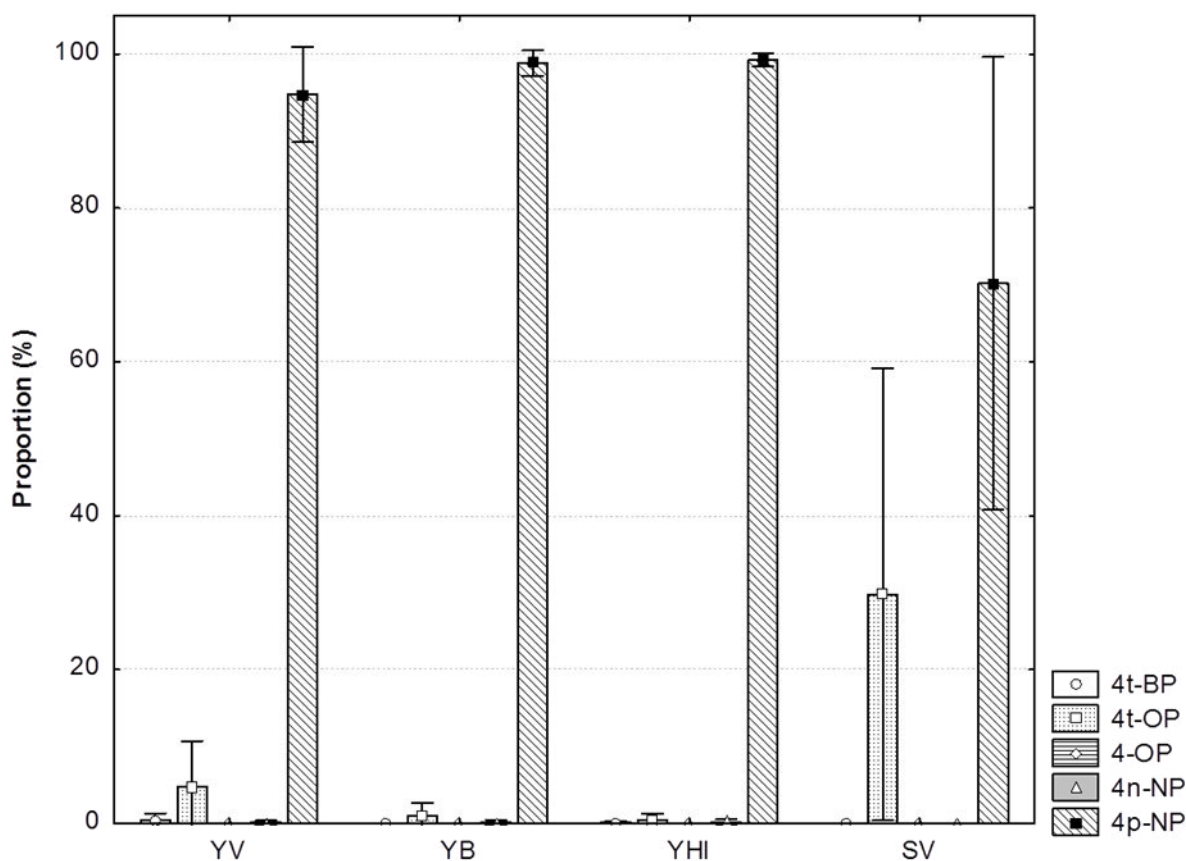


Figure 7. Profile of the 5 APs in yellow European eels from three monitored sites in the Loire estuary (YV: Varades (n=6); YB: Bellevue (n=8); YHI: Haute-Indre (n=6)) and silver eels (SV; n=6). AP proportions were calculated with the sum of 5 APs.

Error bars correspond to standard deviation.

3.4 PCA results

The correlation loading and sample representation are shown in Figure 8 (respectively Figure 8A and Figure 8B). The first two principal components (respectively PC1 and PC2) described 48% of the total variability among eels. PC1 and PC2 represented respectively 29% and 19%. The correlation loadings (Figure 8A) highlighted that the first PC was positively correlated to TL, BW, LW and PBDE. The second PC was positively correlated to PFAS and negatively to GSI. APs, OH-PAHs, BPA and PI presented low weight in the PC construction. Biometric parameters BW and TL correlated to each other and to ndl-, dl-PCBs and PFAS. All these variables were negatively correlated to HSI. Concerning LW, it appeared to be positively correlated to both GSI and PBDEs. Regarding the sample presentation (in Figure 8B), the eels were clustered according to the sexual stages. About the sampling sites of yellow eels, the eels from Varades were separated from the eels from Bellevue whereas the eels from Haute-Indre were dispersed among the others. The comparison of Figures 8A and 8B underlines that eels

from Bellevue were the biggest and the most highly contaminated by PFAS, ndI- and dl-PCBs (dw basis). Silver eels were highly contaminated by PBDEs with the highest lipid contents and GSI. The trends for yellow eels from Varades and Haute-Indre were contrary to silver eels, *e.g.* low levels of PBDEs, LW and GSI. These observations are consistent with result explanations depicted in the previous paragraphs.

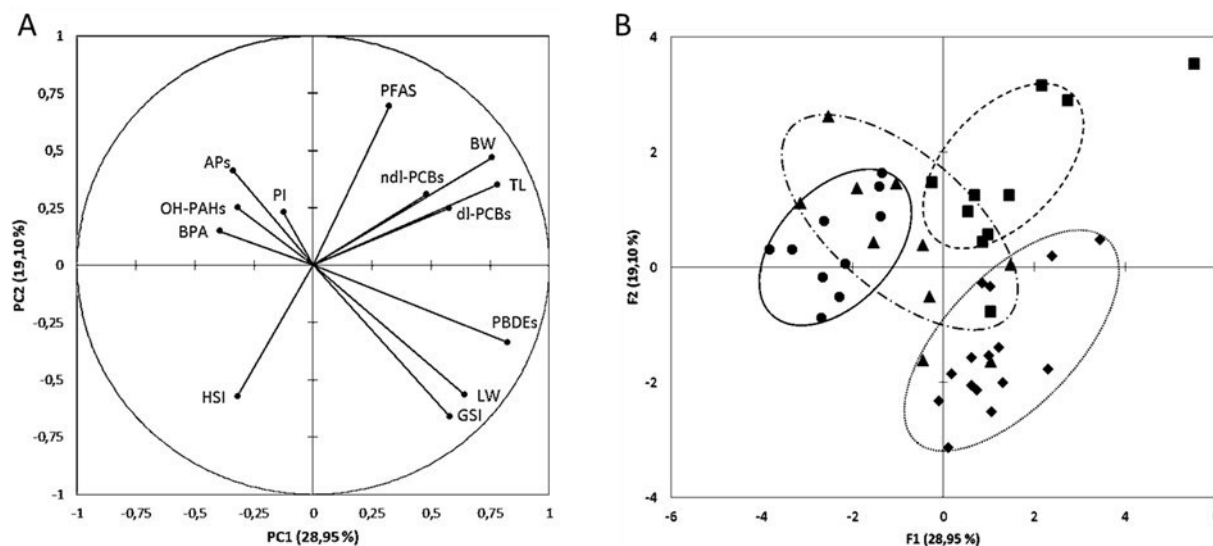


Figure 8. Principal Component Analysis (PCA) of biometric parameters, contaminants (dl- and ndI-PCBs, PBDEs and PFAS expressed in ng/g dw) in muscle and contaminants (BPA, OH-PAHs and APs expressed in $\mu\text{g/g}$ prot.) in bile of yellow eels from 3 sampling sites in the Loire estuary (Varades (n=10); Bellevue (n=10); Haute-Indre (n=10)) and of silver eels (n=15). A: correlation loadings (BW: body weight; TL: total length; LW: lipid weight). B: sample representation (circles = yellow eels from Varades; squares = yellow eels from Bellevue; triangles = yellow eels from Haute-Indre; diamonds = silver eels).

3.5. Human health risks assessment

Levels of 6 PCBi and TEQ values were showed in Table 3. Commission Regulation (EC) No 1259/2011 of 2 December 2011 had set maximum levels for dioxins and dioxin-like PCBs in a range of foodstuffs including wild eels (European Commission, 2011). In this study, the PCDD/F levels were not determined in the eels from the estuary, thus only dl-PCB TEQs were estimated. However, total TEQ (1998) and dl-PCB TEQ (1998) values were determined using prediction models for fish ($\log \text{TEQ DL-PCBs} = -1.167(\pm 0.051) + 0,932(\pm 0.022) \times \log \sum(\text{PCBi} + \text{PCB118})$) and $\log \text{TEQ Total} = -1.128(\pm 0.053) + 0.929(\pm 0.023) \times \log \sum(\text{PCBi} + \text{PCB118})$ (Babut et al., 2009).

Maximum levels set by the European Commission for specific oil species, including wild eels, were 3.5 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww for the PCDD/F TEQ and 10 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww PCDD/F TEQ + dl-PCBs TEQ (Total TEQ). Because no dl-PCB TEQ maximum value was set by the European Commission, the results were compared to the Total TEQ. Among the yellow eels, 7 individuals (4 YB and 3 YHI) had dl-PCB TEQs (2005) higher than the Total TEQ (2005) value (ranging from 10.85 to 16.93 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww) with a mean of 8.06 ± 4.67 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww for the YB and 7.18 ± 5.58 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww for the YHI. The YV eels had the lowest dl-PCB TEQ values (mean of 2.07 ± 1.21 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww). The SV eels had a dl-PCB TEQ mean (8.45 ± 2.05 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww) close to the maximum value. Nevertheless, 2 individuals showed concentrations above this regulation (10.04 and 14.55 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww).

Few differences were found between calculated and predicted dl-PCB TEQs 1998, even if the prediction seems to be more accurate for the yellow eel values. Regarding the predicted Total TEQ (98), for the yellow and silver eels, the means estimated were above the 10 pg WHO₁₉₉₈ TEQ/g ww Total TEQ.

Table 3: Mean concentrations of 6 indicator PCBs ($\sum 6$ PCBi), dioxin-like PCB TEQ 1998 (dl-PCB TEQ (98)), dioxin-like PCB TEQ 2005 (dl-PCB TEQ (05)) and predicted TEQ concentrations for dioxin-like PCBs (predicted dl-PCB TEQ (98)) and Total TEQ (predicted Total TEQ (98)) according to the life stage.

	$\sum 6$ PCBi (ng/g ww)	dl-PCBs TEQ (98) (pg TEQ WHO 1998 /g)	dl-PCBs TEQ (05) (pg TEQ WHO 2005 /g)	Predicted dl-PCB TEQ (98) (pg TEQ WHO 1998 /g)	Predicted Total TEQ (98) (pg TEQ WHO 1998 /g)
Yellow eels (n=30)	216.34 ± 188.80 (22.53 - 746.16)	9.37 ± 7.61 (1.04 - 25.86)	5.77 ± 4.91 (0.50 - 16.93)	10.85 ± 8.80 (1.47 - 33.97)	11.67 ± 9.44 (1.59 - 36.43)
Silver eels (n=15)	189.97 ± 34.68 (144.14 - 253.54)	12.35 ± 2.50 (9.26 - 18.99)	8.45 ± 2.05 (6.00 - 14.55)	9.91 ± 1.68 (7.71 - 13.05)	10.67 ± 1.80 (8.31 - 14.04)

(Mean ± standard deviation; $\sum 6$ PCBi (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180) ; min-max values are presented into brackets)

The maximum level for the sum of the 6 PCB indicators (PCB 28, 52, 101, 138, 153 and 180) was established at 300 ng/g ww (European Commission, 2011). One third of the yellow eels had a concentration of 6 PCBi higher than this value (ranging from 318.00 to 746.16 ng/g ww). The YB and YHI eels had the highest levels (mean of 329 ± 208 and 256 ± 170 ng/g ww, respectively) with 6/10 and 4/10 of the eels respectively, presenting concentrations higher than the maximum level. YV eels were the least contaminated (mean of 63 ± 28 ng/g

ww). Silver eels presented intermediate levels and all individuals presented values lower than the maximum level.

The results indicated a potential exposure to PCBs through eel consumption, especially with yellow eels. The tolerable daily intake (TDI) of 10 ng PCBi/kg body weight/day set by the French Food Safety Agency represent an intake of 700 ng/day for a 70 kg person or 150 ng/day for a child of 15 kg (French Food Safety Agency, 2010). Blanchet-Letrouvé et al. (2014) recommended the consumption of a portion of 150 g per month which would correspond to a daily intake of 1004 ng/day considering the mean concentration of all the eels (ranging from 109.0 to 3610.5 ng/day). In this study, it could then be recommended to limit the consumption to one portion of 105 g per month. For the sensitive populations (a portion of 60 g every two months), the average dietary intake would be of 201 ng/day which was above the specific recommendation of the agency. The portion should be restricted to 45 g every two months. Considering the local practices (mean annual frequency of 2.6 times per year; Blanchet-Letrouvé et al., 2014) and the results of this study, it is possible to calculate an estimated dietary daily intake of PCBi of 222 ng/day. As reported by Blanchet-Letrouvé et al. (2014), considering the local practices, the risk seems to be moderate for adults but exists for sensitive populations. Nevertheless, according to the TDI, the recommendations of the agency about the consumed portions are not really adapted to the eels fished in Loire estuary and should be revised.

The assessment of consumer risks from intake of PFAS was also realized. The EFSA suggested that dietary exposure was the main exposure route to PFAS in the human population and that fish and other seafood were considered as the major contributors (European Food Safety Authority, 2012). In 2008, a risk assessment for the two major PFAS, the PFOS and the PFOA was performed by the EFSA Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM Panel). The authority concluded that it was not probable that adverse effects of PFOS and PFOA are occurring in the general population. However to assess potential impacts on human health, the CONTAM Panel suggested a tolerable daily intake (TDI) of 150 ng/kg bw per day for PFOS and 1500 ng/kg bw per day for PFOA (Authority, 2008). These values were far above the concentrations found in the eels from the estuary. On average, fish consumption per capita in Europe was 22.1 kg (Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department, 2010). Thus, for a 70 kg person, with an average dietary daily intake of 60.5 g of fish, the potential dose of exposures of PFOS represented 10.4% and 14.4 % of the TDI for consumption of yellow and silver eels

respectively. For the PFOA, the potential dose exposures represented 0.004% and 0.012 % of the TDI for consumption of yellow and silver eels respectively.

Regarding all the recommendations and the contaminant levels in eel muscles, a total of 13 individuals out of 45 were at least above one legal consumption limit and could be considered as unfit for human consumption.

CONCLUSION

The Loire, being considered as a wild river not highly polluted in France, has long been little studied. This study presented several data on biological status and monitored contaminant levels on the eels from the Loire estuary, associating risks to the fish consumers. It constitutes an important contaminant screening realized on wild European eels in a French river. Economic issues, particularly in terms of water quality, but also quality of the consumer products, such as fish, have led local and national public authorities to run programs for monitoring the estuary. It is another step in the monitoring of the environmental quality of the Loire estuary, which began with an initial study by Blanchet-Letrouvé et al.(2014). It would be interesting to follow the evolution over time of the levels and profiles of these POPs to check the progress thereof and thus, characterize potential sources of contamination. The results of this study showed that the levels of PCBs, PBDEs and PFAS in eel muscles from the Loire estuary were intermediate compared to eels from other European waters. The OH-PAH and AP concentrations in the eel biles could be considered as low compared to European data whereas the BPA showed similar levels. The eels presented important variability of contaminant levels whatever the monitored location leading to attenuated differences between the sites and the sexual stages. The majority of eels exceeded the PFOS and PBDE EQS biota and a medium risk for the consumer has been demonstrated with 20% of the eels presenting values higher than the TEQ maximum level. A limited consumption of eels should be advised. To complete this first study, monitoring of sediment and water quality in the estuary should be undertaken.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to express their special thanks to the region Pays de la Loire, the SMIDAP (Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en 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. The technical assistance of Claire Favreau and Emilie Perrat is gratefully acknowledged. The authors thank Darci (McCardle) Couderc for the English language revision of the manuscript.

REFERENCES

- Ahrens L. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. *Journal of Environmental Monitoring* 2011; 13: 20-31.
- Amilhat E, Fazio G, Simon G, Manetti M, Paris S, Delahaut L, et al. Silver European eels health in Mediterranean habitats. *Ecology of Freshwater Fish* 2013; 23: 49-64.
- Andersson PL, Wagman N, Berg HA, Olsson P-E, Tysklind M. Biomagnification of structurally matched polychlorinated and polybrominated diphenylethers PCDE/PBDE in zebrafish *Danio rerio*. *Organohalogen Compounds* 1999; 43: 9-12.
- Ariese F, Kok SJ, Verkaik M, Gooijer C, Velthorst NH, Hofstraat JW. Synchronous fluorescence spectrometry of fish bile: A rapid screening method for the biomonitoring of PAH exposure. *Aquatic Toxicology* 1993; 26: 273-286.
- Authority EFS. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. *EFSA Journal* 2008; 653: 1-131.
- Babut M, Miege C, Villeneuve B, Abarnou A, Duchemin J, Marchand P, et al. Correlations between dioxin-like and indicators PCBs: Potential consequences for environmental studies involving fish or sediment. *Environmental Pollution* 2009; 157: 3451-3456.
- Belpaire C, Geeraerts C, Roosens L, Neels H, Covaci A. What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience. *Environment International* 2011; 37: 354-364.
- Belpaire C, Goemans G. The European eel *Anguilla anguilla*, a rapporteur of the chemical status for the water framework directive? *Life and Environment* 2007; 57: 235-252.
- Belpaire C, Goemans G, Geeraerts C, Quataert P, Parmentier K. Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 2008; 65: 1483-1491.

- Bettinetti R, Galassi S, Quadroni S, Volta P, Capoccioni F, Ciccotti E, et al. Use of *Anguilla anguilla* for biomonitoring Persistent Organic Pollutants (POPs) in brackish and riverine waters in central and southern Italy. *Water, Air, & Soil Pollution* 2011; 217: 321-331.
- Beyer J, Jonsson G, Porte C, Krahn MM, Ariese F. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2010; 30: 224-244.
- Blahova J, Divisova L, Kodes V, Leontovycova D, Mach S, Ocelka T, et al. Integrated assessment of PAH contamination in the Czech rivers using a combination of chemical and biological monitoring. *The Scientific World Journal* 2014; 2014: 1-6.
- Blanchet-Letrouvé I, Zalouk-Vergnoux A, Vénisseau A, Couderc M, Le Bizec B, Elie P, et al. 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* 2014; 472: 562-571.
- Bodin N, Tapie N, Le Ménach K, Chassot E, Elie P, Rochard E, et al. PCB contamination in fish community from the Gironde Estuary (France): Blast from the past. *Chemosphere* 2014; 98: 66-72.
- Boëtius I, Boëtius J. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1980; 1: 1-28.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
- Bragigand V. Recherches écotoxicologiques sur les retardateurs de flamme bromés dans les écosystèmes estuariens (estuaires de Loire et de Seine). *Faculté de Pharmacie. PhD thesis. Université de Nantes, Nantes (France), 2005, pp. 250.*
- Bragigand V, Amiard-Triquet C, Parlier E, Boury P, Marchand P, El Hourch M. Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries. *Science of The Total Environment* 2006; 368: 615-626.
- Bultel E, Lasne E, Acou A, Guillaudeau J, Bertier C, Feunteun E. Migration behaviour of silver eels (*Anguilla anguilla*) in a large estuary of Western Europe inferred from acoustic telemetry. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 2014; 137: 23-31.
- Burreau S, Zebühr Y, Broman D, Ishaq R. Biomagnification of PBDEs and PCBs in food webs from the Baltic Sea and the northern Atlantic Ocean. *Science of The Total Environment* 2006; 366: 659-672.
- Burreau S, Axelman J, Broman D, Jakobsson E. Dietary uptake in pike (*Esox lucius*) of some polychlorinated biphenyls, polychlorinated naphthalenes and polybrominated diphenyl ethers administered in natural diet. *Environmental Toxicology and Chemistry* 1997; 16: 2508-2513.

- CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Consideration of Proposals for Amendment of Appendices I and II. Fourteenth Meeting of the Conference of the Parties. The Hague, The Netherlands, 3–15 June 2007. 2007: 39 p.
- Conder JM, Hoke RA, Wolf Wd, Russell MH, Buck RC. Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. *Environmental Science & Technology* 2008; 42: 995-1003.
- Covaci A, Bervoets L, Hoff P, Voorspoels S, Voets J, Van Campenhout K, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in freshwater mussels and fish from Flanders, Belgium. *Journal of Environmental Monitoring* 2005; 7: 132-136.
- Daverat F, Elie P, Lahaye M. Première caractérisation des histoires de vie des anguilles (*Anguilla anguilla*) occupant la zone aval du bassin versant Gironde-Garonne-Dordogne: Apport d'une méthode de microchimie. *Cybium* 2004; 28: 83-90.
- 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. *Environmental Pollution* 2010; 158: 1228-1236.
- de Wit CA. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 2002; 46: 583-624.
- Durif C, Dufour S, Elie P. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *Journal of Fish Biology* 2005; 66: 1025-1043.
- Durif, C, Guibert, A, Elie, P. 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 2009; pp. 103–111.
- Dekker W. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* 2003; 10: 365-376.
- Elie P, Girard P. Effets des micropolluants et des organismes pathogènes chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L. 1758. Cemagref. Bordeaux, Cemagref, ONEMA 2009; 121.
- Eljarrat E, Barceló D. In: Eljarrat E, Barceló D, editors. *The Handbook of Environmental Chemistry: Brominated Flame Retardants*. 16. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- European Commission. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Communities* 2000; L327: 1-72.
- European Commission. Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union* 2008; L 348: 84-97.

- European Commission. Commission Regulation (EU) 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. Official Journal of the European Union 2011; 50: 18-23.
- European Commission. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Union 2013; L 226: 1-17.
- European Food Safety Authority. Perfluoroalkylated substances in food: occurrence and dietary exposure. EFSA Journal 2012; 10: 2743-2797.
- Flint S, Markle T, Thompson S, Wallace E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. Journal of Environmental Management 2012; 104: 19-34.
- Frame GM, Robertson LW, Hansen LG. The current state-of-the-art of comprehensive, quantitative, congener-specific PCB analysis, and what we now know about the distributions of individual congeners in commercial Aroclor mixtures. In: Robertson LW, LG H, editors. PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects. University Press of Kentucky, Lexington, KY, 2001, pp. 3-9.
- 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.
- Gorbi S, Baldini C, Regoli F. Seasonal Variability of Metallothioneins, Cytochrome P450, Bile Metabolites and Oxyradical Metabolism in the European Eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and Striped Mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2005; 49: 62-70.
- Hoff PT, Van Campenhout K, Van de Vijver K, Covaci A, Bervoets L, Moens L, et al. Perfluorooctane sulfonic acid and organohalogen pollutants in liver of three freshwater fish species in Flanders (Belgium): relationships with biochemical and organismal effects. Environmental Pollution 2005; 137: 324-333.
- Hölzer J, Göen T, Just P, Reupert R, Rauchfuss K, Kraft M, et al. Perfluorinated compounds in fish and blood of anglers at lake Möhne, Sauerland area, Germany. Environmental Science & Technology 2011; 45: 8046-8052.
- Hoque MT, Yusoff FM, Law T, Syed MA. Effect of hydrogen sulphide on liver somatic index and Fulton's condition factor in *Mystus nemurus*. Journal of Fish Biology 1998; 52: 23-30.
- Houde M, De Silva AO, Muir DCG, Letcher RJ. Monitoring of perfluorinated compounds in aquatic biota: an updated review. Environmental Science & Technology 2011; 45: 7962-7973.
- Houtman CJ, van Oostveen AM, Brouwer A, Lamoree MH, Legler J. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. Environmental Science & Technology 2004; 38: 6415-6423.
- ICES. Report of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL), 3 – 9 September 2012, Copenhagen, Denmark. No. ICES CM 2012/ACOM:18. 2012, pp. 824.

- ICES. Advice November 2013: Widely distributed and migratory stocks - European eel. ICES Advice 2013. 2013; Book 9: 1-7.
- INERIS. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Pentabromodiphényléthers. DRC-12-126866-13678A, 2012, pp. 43 p.
- Jonsson G, Cavcic A, Stokke TU, Beyer J, Sundt RC, Brede C. Solid-phase analytical derivatization of alkylphenols in fish bile for gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A* 2008; 1183: 6-14.
- Kammann U. PAH metabolites in bile fluids of Dab (*Limanda limanda*) and Flounder (*Platichthys flesus*): spatial distribution and seasonal changes. *Environmental Science and Pollution Research - International* 2007; 14: 102-108.
- Koenig S, Porte C, Solé M, Sturve J. Biliary PAH and alkylphenol metabolites, biomarker enzyme activities, and gene expression levels in the deep-sea fish *Alepocephalus rostratus*. *Environmental Science & Technology* 2013; 47: 2854-2861.
- Kwadijk CJAF, Korytár P, Koelmans AA. Distribution of perfluorinated compounds in aquatic systems in the Netherlands. *Environmental Science & Technology* 2010; 44: 3746-3751.
- Labadie P, Alliot F, Bourges C, Desportes A, Chevreuil M. Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons. *Analytica Chimica Acta* 2010; 675: 97-105.
- Labadie P, Chevreuil M. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental Pollution* 2011; 159: 391-397.
- Lloret J, Gil de Sola L, Souplet A, Galzin R. Effects of large-scale habitat variability on condition of demersal exploited fish in the north-western Mediterranean. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 2002; 59: 1215-1227.
- Macgregor K, Oliver IW, Harris L, Ridgway IM. Persistent organic pollutants (PCB, DDT, HCH, HCB & BDE) in eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland: Current levels and temporal trends. *Environmental Pollution* 2010; 158: 2402-2411.
- Malarvannan G, Belpaire C, Geeraerts C, Eulaers I, Neels H, Covaci A. 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* 2014; 482–483: 222-233.
- Marchelidon J, Le Belle N, Hardy A, Vidal B, Sbaihi M, Burzawa-Gérard E, et al. Étude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison : application à la caractérisation du stade argenté. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 1999; 355: 349-368.

- Martin-Skilton R, Lavado R, Thibaut R, Minier C, Porte C. Evidence of endocrine alteration in the red mullet, *Mullus barbatus* from the NW Mediterranean. *Environmental Pollution* 2006; 141: 60-68.
- Martínez-Gómez C, Lamoree M, Hamers T, van Velzen M, Kamstra JH, Fernández B, et al. Integrated chemical and biological analysis to explain estrogenic potency in bile extracts of red mullet (*Mullus barbatus*). *Aquatic Toxicology* 2013; 134–135: 1-10.
- McHugh B, Poole R, Corcoran J, Anninou 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: 305-313.
- Miège C, Peretti A, Labadie P, Budzinski H, Le Bizec B, Vorkamp K, et al. Occurrence of priority and emerging organic compounds in fishes from the Rhone River (France). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012; 404: 2721-2735.
- Munsch C, Marchand P, Venisseau A, Veyrand B, Zendong Z. Levels and trends of the emerging contaminants HBCDs (hexabromocyclododecanes) and PFCs (perfluorinated compounds) in marine shellfish along French coasts. *Chemosphere* 2013; 91: 233-240.
- Nagel F, Kammann U, Wagner C, Hanel R. Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in bile as biomarkers of pollution in European eel (*Anguilla anguilla*) from German Rivers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2012a; 62: 254-263.
- Nagel F, Wagner C, Hanel R, Kammann U. The silvering process of European eel (*Anguilla anguilla*) influences PAH metabolite concentrations in bile fluid: Consequences for monitoring. *Chemosphere* 2012b; 87: 91-96.
- O'Malley VP, Abrajano TA, Hellou J. Stable carbon isotopic apportionment of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in St. John's Harbour, Newfoundland. *Environmental Science & Technology* 1996; 30: 634-639.
- ONEMA. Les données du plan national d'action PCB. <http://www.pollutions.eaufrance.fr/pcb/resultats-xls.html>, 2012.
- Osako K, Kuwahara K, Saito H, Hossain MA, Nozaki Y. Effect of starvation on lipid metabolism and stability of DHA content of lipids in horse mackerel (*Trachurus japonicus*) tissues. *Lipids* 2003; 38: 1263-1267.
- Palstra AP, Heppener DFM, van Ginneken VJT, Székely C, van den Thillart GEEJM. Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2007; 352: 244-256.
- Puy-Azurmendi E, Ortiz-Zarragoitia M, Villagrasa M, Kuster M, Aragón P, Atienza J, et al. Endocrine disruption in thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*) from the Urdaibai Biosphere Reserve (Bay of Biscay, Southwestern Europe). *Science of The Total Environment* 2013; 443: 233-244.

- Quadroni S, Galassi S, Capoccioni F, Ciccotti E, Grandi G, De Leo G, et al. Contamination, parasitism and condition of *Anguilla anguilla* in three Italian stocks. *Ecotoxicology* 2013; 22: 94-108.
- Reckordt M, Ubl C, Wagner C, Frankowski J, Dorow M. Downstream migration dynamics of female and male silver eels (*Anguilla anguilla* L.) in the regulated German lowland Warnow River. *Ecology of Freshwater Fish* 2014; 23: 7-20.
- Ricciardi F, Matozzo V, Binelli A, Marin MG. Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. *Water Research* 2010; 44: 1725-1736.
- 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. *Environment International* 2010; 36: 415-423.
- Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J, Peters LD. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *Science of The Total Environment* 2003; 301: 105-117.
- Schrap S, JAMCM P, Geerdink R. Geperfluoreerde verbindingen in Nederlands oppervlaktewater. Rijkswaterstaat, Lelystad, The Netherlands, RIZA-report, 2004.
- Schuetze A, Heberer T, Effkemann S, Juergensen S. Occurrence and assessment of perfluorinated chemicals in wild fish from Northern Germany. *Chemosphere* 2010; 78: 647-652.
- Stapleton HM, Letcher RJ, Li J, Baker JE. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004 (a); 23: 1939-1946.
- Stapleton HM, Letcher RJ, Baker JE. Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 and BDE 183 in the intestinal tract of the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science & Technology* 2004 (b); 38: 1054-1061.
- Stapleton HM, Alae M, Letcher RJ, Baker JE. Debromination of the Flame Retardant Decabromodiphenyl Ether by Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) following Dietary Exposure. *Environmental Science & Technology* 2004 (c); 38: 112-119.
- Statistics and Information Service of the Fisheries and Aquaculture Department. Fishery and Aquaculture Statistics. (2008). In: yearbook F, editor. FAO, Rome, 2010, pp. 72p.
- Sühring R, Möller A, Freese M, Pohlmann J-D, Wolschke H, Sturm R, et al. Brominated flame retardants and dechloranes in eels from German Rivers. *Chemosphere* 2013; 90: 118-124.
- Tabouret H, Bareille G, Mestrot A, Caill-Milly N, Budzinski H, Peluhet L, et al. Heavy metals and organochlorinated compounds in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary and associated wetlands (France). *Journal of Environmental Monitoring* 2011; 13: 1446-1456.

- 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: 175-185.
- Timbrell J. Factors affecting toxic responses: disposition. *Principles of biochemical toxicology*. Philadelphia, USA: Taylor & Francis, 2000.
- Van Ael E, Belpaire C, Breine J, Geeraerts C, Van Thuyne G, Eulaers I, et al. Are persistent organic pollutants and metals in eel muscle predictive for the ecological water quality? *Environmental Pollution* 2014; 186: 165-171.
- 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. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106: 775.
- Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, et al. The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences* 2006; 93: 223-241.
- Van Den Thillart G, Van Ginneken V, Körner F, Heijmans R, Van Der Linden R, Gluvers A. Endurance swimming of European eel. *Journal of Fish Biology* 2004; 65: 312-318.
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2003; 13: 57-149.
- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 2007; 24: 139-177.
- Van Ginneken V, Durif C, Dufour S, Sbaihi M, Boot R, Noorlander K, et al. Endocrine profiles during silvering of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) living in saltwater. *Animal Biology* 2007; 57: 453-466.
- Varanasi U, Stein JE, Nishimoto M. Biotransformation and disposition of PAH in fish. In: Varanasi U, editor. *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Boca Raton, 1989, pp. 93-150.
- Vial J, Jardy A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry* 1999; 71: 2672-2677.
- Ying G-G, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International* 2002; 28: 215-226.
- Yuan SY, Chang JS, Yen JH, Chang B-V. Biodegradation of phenanthrene in river sediment. *Chemosphere* 2001; 43: 273-278.

III.3. Article 2

➤ *En cours de soumission dans le journal Science of the Total Environment (STOTEN)*

Thyroid endocrine status and related transcriptomic responses of wild European eels (*Anguilla anguilla*) to organic contaminants in the Loire estuary (France)

M. Couderc^{1*}, Justine Marchand², A. Zalouk-Vergnoux¹, A. Kamari¹, Brigitte Moreau², I. Blanchet-Letrouvé¹, B. Le Bizec³, C. Mouneyrac⁴, L. Poirier¹

¹ LUNAM Université, Université de Nantes, MMS, EA 2160, Nantes, F-44322, France

² LUNAM Université, Université du Maine, MMS, EA 2160, Le Mans, F-44322, France

³ LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France

⁴ LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, MMS, EA 2160, Angers, F-49000, France

* Corresponding author: +33669552298, mikacouderc@yahoo.fr

ABSTRACT

In teleosts, thyroid function has been involved in multitude of critical physiological process. Given the complexity of the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis, a large number of genes and proteins can be the potential target of endocrine-disrupting compounds (EDCs). The aim of this study was to evaluate, in yellow and silver European eels (*Anguilla anguilla*), potential effects on thyroid status by analyzing the associations between EDC body burdens (published in a previous study; Couderc et al., 2014) and thyroid hormones (THs). In silver individuals, expression of a series of genes involved in the HPT axis was also investigated. In yellow individuals, high FT3/FT4 ratios and low plasma FT4 level were associated with higher concentrations of PCBs and PBDEs, as underlined by significant correlations with many congeners. Fewer positive relationships with alkylphenols (APs) were also noticed. In contrast, silver eels exhibited significantly less correlations between THs and contaminant loads. This result could be related to their observed lower thyroid activity but also to the remobilization of contaminants suggested to occur during sexual maturation. Concerning mRNA expression, main correlations were noticed, in silver females, for thyroid-stimulating hormone (TSH β) gene expression which was significantly correlated to numerous PCBs and hepatic mRNA levels of deiodinase 2 (Deio 2) which showed to be negatively correlated to 2-OHF and 2-OHNa. Thyroid receptor (TR α and TR β) mRNA levels exhibited some weak negative correlations with few PBDEs in silver females and males. Hepatic vitellogenin (Vtg) mRNA levels were detected in all silver males but at a lower level than silver females. In males, Vtg mRNA levels were associated to increased FT4/TT4 ratio and to 2 PCB congeners but in an opposed way. In silver females, strong positive correlations were found with several congeners of PCBs, PBDEs and PFAS suggesting potential estrogenic effects. Taken together, the observed results indicate that several organic contaminants could disorder TH homeostasis in eel, via the disruption of the peripheral deiodination and/or metabolism of T4 and the induction or inhibition of TSH β , Deio 2 and Vtg gene transcription.

1. INTRODUCTION

During recent decades, the growing human activities have led to an increase of pollutant emissions into the environment leading to a widespread contamination of many ecosystems, notably the estuaries which represent the final receptacle of pollutants before the discharge in the sea. The effects of these contaminant mixtures on fish and other wildlife are not fully understood. A number of the chemicals found in such ecosystems were known to be potential disruptors of endocrine systems and may disrupt the hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish, as suggested in laboratory studies. As thyroid function has been involved in multitude of critical physiological process in fish, such as growth, metabolism, osmoregulation and reproduction (Cyr and Eales, 1996), disruption of the HPT axis raises special concern. However, few studies are available that evaluate the effects of environmental contaminant mixtures on thyroid endocrine system in wild resident fish (Brar et al., 2010; Jarque et al., 2014; Jenkins et al., 2014; Simmons et al., 2014).

The thyroid system is regulated mainly by thyroid hormone receptors (TRs), a family of nuclear receptors that bind to thyroid hormones (THs). The pro-hormone thyroxine, or T₄, is synthesized in the thyroid gland under the control of the hypothalamus and pituitary axis. Its active form, T₃, is produced in peripheral tissues through the elimination of one of the iodine atoms by selenocysteine-containing enzymes called deiodinases (Dong et al., 2013; Kohrle, 2000; Szabo et al., 2009). In fish, 2 deiodinase enzymes (Deio1 and Deio2) convert T₄ to T₃ by removing iodine from the outer ring of T₄ (Orozco and Valverde, 2005). Deio1 plays a minimal role in plasma TH homeostasis, while it has a considerable influence on iodine recovery and TH degradation (Van der Geyten et al., 2001). On the contrary, Deio2 converts T₄ into the more active form T₃. Another group of deiodinase enzymes (Deio 3) converted T₄ and T₃ to inactive forms by inner ring deiodination. Given the molecular structure of T₃, different POPs, like PCBs, dioxins and PBDEs, are putative disruptors of the thyroid hormonal system (Boas et al., 2006; Noyes et al., 2011; Szabo et al., 2009). THs play an important role in the development, growth and metabolism in vertebrates. Their important role in reproductive function and gonadal maturation in fish was also recognized (Blanton and Specker, 2007; Cyr and Eales, 1996; Power et al., 2001). THs were notably found to promote the activation of vitellogenin (Vtg) mRNA expression (Lethimonier et al., 2000; Sumpter and Jobling, 1995). Vtg is a phospho-lipo-glycoprotein produced in response to estrogen receptors (ERs) activation by oviparous species and represent the main energy reserve of eggs.

Thyroid function is dependent upon iodine uptake, TH synthesis, transport, tissue-specific TH deiodination, and binding of THs to TRs (Yen and Chin, 1994). In non-mammalian vertebrates, the corticotropin-releasing hormone (CRH) appears to stimulate the thyroid-stimulating hormone (TSH) secretion (De Groef et al., 2006) and therefore function as a common regulator of the thyroidal axis. Given the complexity of HTP axis, a number of genes and proteins can be the potential target of endocrine-disrupting compounds (EDCs). THs are indeed critical to the regulation of the gene expression machinery required during different life stages of an animal (Tabuchi et al., 2006). Although circulating THs levels are often used as biomarkers of contaminant exposure in wildlife (Chiba et al., 2001; Hall et al., 1998), gene expression end points that exploit the cellular functions of THs could provide a more sensitive and mechanistically based means to characterize the thyroid-toxic potential of complex contaminant mixtures. Such gene expression analysis might also form the basis of an early detection approach for persistent organic pollutants exposure before the manifestation of higher level health effects (Tabushi et al., 2006).

Among the wild fish species living in European estuaries, the European eel (*Anguilla anguilla*) has specific physiological and behavioral characteristics (such as catadromous, carnivorous, fat content, wide distribution, euryhalinity and long lifespan) favorable for the use as chemical sentinel species (Belpaire and Goemans, 2007). As eel pollution profiles were shown to be significantly different along a river at small and large-scale (Belpaire and Goemans, 2007; Belpaire et al., 2008), it would be a valuable fingerprint of the chemical pressure of a specific site, particularly for the lipophilic chemicals. Furthermore since 1950, the eel population has continued to decline even if the glass eel recruitment has increased slightly over the last two years (ICES, 2013). Overfishing, climate change, habitat reduction and numerous hydraulic barriers to the downstream and upstream migrations, impacts of pollution, diseases and parasitism were all factors explaining the overall decline of the stock (Dekker, 2003; Elie and Girard, 2009). In September 2008, the eel was listed as “critically endangered” in the International Union for Conservation of Nature (IUCN) Red List and one year earlier, it was included in the UN CITES Appendix II list (CITES, 2007). For the European eel, the Loire estuary (France) represents one of the most important continental migration paths of glass eels. The Loire River is one of the largest west European rivers but also the last wild large and most preserved river in Europe. Its estuary constitutes an interesting study area because it is characterized by an important human pressure. Recently, polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), perfluorinated

and polyfluorinated alkyl substances (PFAS), alkylphenols (APs), bisphenol A (BPA) and polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites (mPAHs) were investigated in yellow and silver female eels sampled in several locations of the Loire estuary with different contamination pressure (Couderc et al., 2014). In this study, we integrated the dataset used by Couderc et al. (2014) with contamination data from additional silver males specimens. The objective of this study was to evaluate potential effects on eel thyroid status by analyzing possible associations between organic contaminant body burdens and THs according to each developmental and sexual stage of individuals. Moreover, as silver stage represents a critical stage for the reproductive success of the species, mRNA expression of a series of genes involved in the HPT axis [thyroid hormone synthesis (Deio 2), binding (TR α and TR β) and regulation (TSH β)] and in the reproductive function (Vtg) were investigated in silver eels as well as their possible associations with biometric parameters, thyroid status and pollutants.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Fish sampling locations and sample collection

Within the Loire estuary, European eels (*Anguilla anguilla*) were sampling according to the fishing authorizations, by local fishermen, at two life stages (silver (S) and yellow (Y)) in November 2011 and June 2012, respectively. Yellow eels were collected with fyke and silver eels with stow nets. A total of 59 individuals were randomly collected : 30 yellow females [in three sampling areas : 10 sampled at Varades (YV), 10 at Bellevue (YB) and 10 at Haute Indre (YHI)], as well as 15 migrant silver female eels (SVf) and 14 migrant silver male eels (SVm) sampled during downstream migration. The three sampling locations of yellow individuals were detailed by Couderc et al. (2014) and were expected to present different signatures of environmental chemicals First, Varades is a small city (about 3550 locals), located upstream in the estuary at the limit of the salinity (100 km from the Loire mouth); it presents few industrial activities and is particularly under agricultural pressure. The two other sampling locations are upstream and downstream an important city, Nantes (about 600,000 locals), near two peripheral localities, Bellevue (B) and Haute Indre (HI) respectively. The Nantes city is located at approximately 50 km from the mouth, is characterized by an industrial harbor and an urban zone including two incineration factories. These two areas are with a strong influence of the North Atlantic Ocean. Yellow eels were collected with fyke and silver eels with stow nets. Animal manipulations were performed according to the guidelines

of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. After fish capture, eels were conducted to the laboratory in 200 L tanks, aerated and filled with water from the sampling site. Then, to avoid or reduce the stress of capture and transport, the eels were maintained in the laboratory until dissection under a natural photoperiod and at a temperature around $12^{\circ}\text{C} \pm 2$, equivalent to the fishing site conditions. They were acclimated to these conditions during at least 12 hours before dissection.

2.2. Biological samples and biometric parameters

Before dissection, eels were anesthetized in a water bath of 30 L added with 4.5 to 6 mL of clove oil solution dissolved in ethanol (70%), according to their weight. Once anesthetized, biometric parameter of each fish were measured, the total length (TL in cm) and the body weight (BW in g). The animals were then sacrificed by cardiac puncture and dissected on ice (4°C). The blood collected in the heart was put in a heparinized tube, centrifuged at 4°C for 15 min at 3500 rpm to pellet the cells. A sample (around 50 mg) of tissue (liver, muscle or brain) was quickly dissected with sterile scalpel on RNase free drainboard, stored in sterile Eppendorff containing 1.5 mL of RNA Later solution (Ambion Inc., Austin, TX, USA), and kept frozen at -20°C until extraction. The plasma samples removed were stored at -80°C until thyroid hormone assays. The determination of sex of eels was realized by direct anatomic observation of gonads. The muscles and bile were also collected and then stored at -20°C until chemical analysis. Biometric parameters recorded were used to calculate the Fulton condition factor ($K = (\text{BW} \times 10^5) / \text{TL}^3$). The swim bladder of each eels was removed and dissected to detect the presence of parasites. In the case of infection, the number and weight of parasites present in the swim bladder were determined to calculate the percentage of individuals infected and the parasite index (PI) ($\text{PI} = \text{parasite total weight in g} / \text{eel body weight in g}$) for evaluated the infection level (Quadroni et al., 2013).

2.3. Contaminant analysis

Analysis of organic contaminants (PCBs, PBDEs, PFAS) were done in muscles of silver males. As not enough bile was available for these individuals, the analyses of OH-PAHs, APs and BPA cannot be realized. The analyzes were done according to material and methods described previously by Couderc et al. (2014). The contaminant data (PCBs, PBDEs, PFAS, OH-PAHs, APs and BPA) for YV, YB, YHI and SVf were available in this previous study. Briefly, eel muscles were analyzed for 18 PCBs and 7 PBDEs. Among the PCBs, 12 were dioxin-like PCBs (dl-PCBs: #77; 81; 105; 114; 118; 123; 126; 156; 157; 167; 169; 189) and 6 were non dioxin-like PCBs (ndl-PCBs: #28; 52; 101; 138; 153; 180; also called PCB indicators (PCBi)). Seven PBDE congeners were monitored, i.e. BDE 28, 47, 99, 100, 153, 154 and 183. PBDE 209 was not analyzed because it required a specific analytical procedure not developed in the laboratory. A total of 17 PFAS were analyzed in the eel muscles including 5 perfluoroalkylsulfonates (PFASS): perfluorobutanesulfonate (PFBS), perfluorohexanesulfonate (PFHxS), perfluoroheptanesulfonate (PFHpS), perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorodecanesulfonate (PFDS); 1 perfluoroalkylsulfinate (PFASi): perfluorooctanesulfinate (PFOSi) and 11 perfluorocarboxylic acids (PFCAs): perfluorobutanoic acid (PFBA), perfluoropentanoic acid (PFPA), perfluorohexanoic acid (PFHxA), perfluoroheptanoic acid (PFHpA), perfluorooctanoic acid (PFOA), perfluorononanoic acid (PFNA), perfluorodecanoic acid (PFDA), perfluoroundecanoic acid (PFUnA), perfluorododecanoic acid (PFDoA), perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) and perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA). BPA, 5 OH-PAHs (2-naphtol (2-OHNa); 2-hydroxyfluorene (2-OHF); 1-phenanthrenol (1-OHPhe); 9-phenanthrenol (9-OHPhe); 1-hydroxypyrene (1-OHPyr), 4 APs (4-tert-butylphenol (4-t-BP); 4-tert-octylphenol (4-t-OP); 4-octylphenol (4-OP) (CAS; 4-n-nonylphenol (4-n-NP) (CAS #104-40-5), and a mixture of 4-p-nonylphenol (4-p-NP) (CAS #84852-15-3) were analyzed in bile of eels.

2.4. Plasma thyroid hormone levels

Total thyroxine (TT4), free thyroxine (FT4) and free thyronine (FT3) concentrations were determined in fish plasma sample using commercially available radioimmunoassay (kit RIA, Beckman Coulter). A gamma counter (Wizard 10DET1470010, Perkin Elmer) was used to determine activity of ^{125}I -labeled monoclonal antibody specific of each hormone in calibrator solutions and samples. The intra-assay coefficients of variation were inferior at 6.2%, 8.3% and 6.4% for the TT4, FT4 and FT3 respectively. The inter-assay variation was avoided by measuring all samples in the same assay. The detection limits of the TT4, FT4 and FT3 were in order 3.37 ng/ml, 0.13 pg/ml and 0.11 pg/ml. In addition to measure of individual concentration, ratios of FT3/FT4 and TT4/FT4 concentrations were calculated.

2.5. Tissue RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA from liver, brain and muscle samples was extracted using Tri-Reagent (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Deio 2 and Vtg were specifically investigated in liver tissue, TRs (TR α and TR β) in muscle and TSH β in brain. Following extraction, samples were submitted to a desoxyribonuclease treatment using the DNA-free Kit (Ambion, Life Technologies). RNA concentration was determined spectrophotometrically at 260 nm and RNA quality was checked using the Experion system (BioRad). One μg of total RNA was added to 0.5 μg of oligodT primers and nuclease free water in a final volume of 12.25 μl . A denaturation at 70°C was carried out for 5 min and then the mixture was kept on ice. First strand cDNAs were then synthesized using dTRace, dNTPs, MMLV reverse transcriptase (Promega), RNAsin (Promega) and nuclease free water in a final volume of 25 μL for 90 min at 42°C. 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) were designed on the basis of previously characterized sequences available in the GENBANK database (see Supplementary Data) and purchase from Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germany). Real-time PCR reactions were performed using a Step One plus apparatus (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ l. The amplification program consisted of an activation of the polymerase at 95°C for 2 min, and then 40 cycles of amplification at 95°C for 15 sec, and 60°C for 1 min. Each 10 μ L reaction contained 4.9 μ L of diluted cDNA, 7.55 μ L of GoTaq qPCR Master Mix (Promega) and 0.8 μ M of each specific forward and reverse primer. Primers used for qPCR were defined using the Primer Express version 3[®] software (Table 1) based on the sequences characterized previously and available in the NCBI database for Vitellogenin, deiodinase 2, TR α , TR β , TSH β , GAPDH, Actine β and EF1a (Table 1). The absence of non-specific PCR products and primer dimmers was confirmed by examination of the dissociation curve generated after the amplification cycles were completed and by amplicon sequencing. This curve was obtained by following the SYBR Green fluorescence level during a gradual heating of the PCR products from 60 to 95°C. The threshold cycle (Ct) was determined by the Step One plus version 2.1 software. The efficiency of the PCR reaction was calculated for each gene and each tissue using the Ct slope method, which involves generating a dilution series of the target template and determining the Ct value for each dilution. A plot of Ct versus log (concentration) was constructed and efficiency (E) expressed as $E = 10^{(-1/\text{slope})}$. Efficiencies calculated for all genes ($90 \leq E \leq 110$) indicated correct PCR reactions without inhibition (Gasparic et al., 2008). Out of the 3 housekeeping gene (HKG) candidates, the most stable were selected using the Bestkeeper Software (Pfaffl et al., 2004) for accurate normalization of the target genes (Derveaux et al., 2010). Relative expression levels were calculated as previously described with TG/HKG ratios expressed as Arbitrary Units (AU) (Weltzien et al., 2005).

Table 1 : Specific primers used for qRT-PCR and length of amplified amplicons

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Accession N°	Length (bp)
Vitellogenin	CCTACCACCAGCTTACCTTATG	CGCTGGGAGTGCGGAA	AM076793.1	220
Deiodinase 2	GAGGCGCATTCCTTCAAAGT	GGCACTGAGAAGGCATGGA	AB199797.1	100
Thyroid-receptor α	CTTGGAGGCTTTCAGGGAGTT	ACAAGGCAGCTCGGAAAACA	AF302240.1	100
Thyroid-receptor β	TTACCATGCGAGGACCAGATT	AGCCATTTCCCGTTCAGT	AF302241.1	120
Thyroid Stimulating Hormone β	CTGTAATTGTTGTGCTAGTTGGTAAGG	TGCCAGATGTAAAGCACTTTGAA	AB175833.1	90
β Actin	CAGCCTTCCTTCTGGGTATG	AGGACGGTGTGGCGTACAG	DQ286836.1	110
Elongation factor 1a	GTTGCCTTTGTGCCCATCTC	CCTCCTTGCGCTCAACCTT	EU407825.1	100
GAPDH	CTGAAGGGAGGTGCCAAGAG	TGGTTGTGCAGGAGGCATT	AY219884.1	130

2.7. Statistical analysis

All statistical tests and graphical representations were carried out using Statistica software (v 7, Statsoft, Inc.). For hormone levels, undetectable values were imputed by using the following guidelines (Hornung and Reed, 1990) : as less than 50% of the sample had nondetectable values for TT4, FT4 and FT3, the concentration for the undetectable was imputed by dividing the limit of detection (LOD) by the square root of 2. Next, each imputed concentration value was compared to the sample median for the hormone. If it was greater than the median, the median was assigned as the final concentration. If it was less than the median, the imputed value was assigned. The conditions for applying parametric tests, i.e. homogeneity of variance and normality, were evaluated using Bartlett and Shapiro-Wilk tests on untransformed and log-transformed values. As result of these tests, untransformed variables were used and analyzed with non-parametric tests Kruskal-Wallis ANOVA to compare the different eel groups. The KW test was followed by a post hoc test Multiple Comparisons of P-value (MCP).

Within each developmental and sexual stage (yellow eels, silver males and silver females), principal component analysis (PCA) were performed to examine the simultaneous variations of biometric parameters, hormone levels and mRNA expressions. The analyses were carried out with the casewise deletion of missing data.

Relationships between parameters (e.g. hormone level vs. contaminant concentration) were analyzed using Pearson's correlation. Prior to these analysis, variables which were correlated to body size or body weight of eels were standardized to remove any biometric effect according to MacCrimmon and Claytor (1985) as follow : $VAR_STD = VAR - (M(TL \text{ or } BW - TL_mean \text{ or } BW_mean))$ where VAR_STD is the corrected variable, VAR the original variable, M is the slope of the regression of the variable elements on total length or body weight, TL_mean and BW_mean are respectively the mean total length and the mean of body weight of the eels in the sample. Only Vtg and TR β variables for silver male eel group were standardized in this way on total length and body weight respectively. For all analyses, differences between groups or correlations were considered significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Silver males: biometric and contamination variations

- biometric parameters of silver males

The biometrics parameters of male silver European eels sampled in Loire estuary are presented in Table 2. These results were compared to results presented in a previous work (Couderc et al., 2014) on silver female European eels caught at the same time in the Loire estuary. The total lengths of the males were relatively homogenous and ranged from 36.5 to 40.8 cm. These values were lower than values found for female silver eels. This result is in accordance with the biological characteristics of the species: the sexual maturation is accompanied by sexual dimorphism in growth. After metamorphosis to the silver eel stage, male size is ranging from 29 to 40 cm whereas the females size is comprised between 38 and 130 cm (Tesch, 2003). As a consequence of the lower sizes of silver males compared to the silver females, the body weight values were also lower. As it was found by Couderc et al. (2014) for silver females, BW was positively correlated to TL ($p < 0.001$) in silver males. The linear regression equation was $TL = 0.095 BW + 30.84$ and $R^2 = 0.565$. The LW values ranged from 24.81 to 37.24% and were significantly higher than those found for silver females ($p = 0.002$). It can be assumed that all silver male eels sampled for this study had a LW sufficient for the reproductive migration necessary for the species survey. Indeed, the percentage of lipids required to realize an healthy migration to the Sargasso Sea must be at least 20%, 15% and 13.5% of the body weight according to Boetius and Boetius (1980), Van den Thillart et al. (2004), and Palstra et al. (2007) respectively. As a consequence of the sexual dimorphism, the gonad weights of silver males were significantly lower than those of the silver females leading to a lower GSI too. In the case of the livers, their weights were significantly lower for silver males than silver females. Since the TL were also lower for silver males, the HSI were not significantly different according to the gender. Male silver eels were not significantly more or less infested than the female silver eels as showed by the PI. The percentages of parasited eels was about 70% which was in accordance with values usually observed in most of the eels from European habitats (40% up to 90%) (Palstra et al., 2007). The Fulton's index of males was significantly low relative to females. This difference could be explained by the sexual dimorphism. The silver females tended to take weight with length in a more accentuated way than silver males. Nevertheless, the K values were in the same range than those reported for eels fished in the Loire estuary in 2011 and 2012

(Blanchet-Letrouvé et al., 2014; Couderc et al., 2014); and in other European habitats (Bultel et al., 2014; Palstra et al., 2007; Reckordt et al., 2014; Tapie et al., 2011).

Table 2 : Biometrics parameters (Total Length TL, Body Weight BW, Lipid Weight LW, Gonad weight (wt.), Liver weight (wt.)), parasitic parameters (*Anguillicola crassa* number and weight (wt.)), index (Gonado Somatic Index GSI, Hepato Somatic Index HSI, PI Parasitic Index) and Fulton’s condition factor (K) of male silver European eels (n = 14) sampled in Loire estuary.

	Male silver European eels	
	Mean ± standard deviation	Result range
n		14
TL (cm)	38.30 ± 1.39	(36.50 - 40.80)
BW (g)	76.57 ± 9.38	(65.00 - 95.00)
LW (%)	32.92 ± 3.76	(24.81 - 37.24)
Gonad wt. (g)	0.55 ± 0.23	(0.20 - 0.93)
GSI (%)	0.72 ± 0.28	(0.27 - 1.16)
Liver wt. (g)	0.91 ± 0.11	(0.71 - 1.15)
HSI (%)	1.19 ± 0.13	(0.96 - 1.39)
<i>Anguillicola crassa</i> number	3.64 ± 3.97	(0 - 13.00)
<i>Anguillicola crassa</i> wt. (g)	0.13 ± 0.17	(0 - 0.56)
PI (%)	0.17 ± 0.22	(0 - 0.75)
K	0.14 ± 0.01	(0.11 - 0.15)

-Contaminants in silver males

As for the biometric parameters, the results of contaminants in silver males (Table 3) were compared to results on silver females caught at the same time in the Loire estuary and presented in a previous work (Couderc et al., 2014).

Table 3 : Mean concentrations of dl-PCBs, ndl-PCBs (PCBi), PCBs (dl-PCBs+ndl-PCBs), PBDEs and PFAS in muscles of male silver European eels from Loire estuary. Muscle concentrations are expressed in ng/g wet weight (ww), ng/g dry weight (dw) and ng/g lipid weight (lw).

	Male silver European eels	
	Mean \pm standard deviation	Result range
n		14
dl-PCB sum (ng/g ww)	42.9 \pm 9.2	(29.8 - 59.9)
dl-PCB sum (ng/g dw)	83.9 \pm 19.0	(61.2 - 118.9)
dl-PCB sum (ng/g lw)	132.0 \pm 33.5	(97.1 - 200.6)
ndl-PCB sum (ng/g ww)	214.5 \pm 31.3	(167.5 - 272.1)
ndl-PCB sum (ng/g dw)	419.2 \pm 65.8	(332.3 - 546.2)
ndl-PCB sum (ng/g lw)	659.9 \pm 126.6	(496.7 - 921.7)
PCB sum (ng/g ww)	257.4 \pm 38.4	(203.8 - 319.9)
PCB sum (ng/g dw)	503.0 \pm 81.0	(404.3 - 665.0)
PCB sum (ng/g lw)	791.9 \pm 155.0	(603.2 - 1122.2)
PBDE sum (ng/g ww)	9.6 \pm 1.6	(7.2 - 12.7)
PBDE sum (ng/g dw)	18.8 \pm 3.1	(13.6 - 24.2)
PBDE sum (ng/g lw)	29.4 \pm 5.1	(21.0 - 40.3)
PBDE 47 (ng/g ww)	6.4 \pm 1.2	(4.6 - 8.6)
PBDE 47 (ng/g dw)	12.4 \pm 2.3	(8.4 - 16.4)
PBDE 47 (ng/g lw)	19.4 \pm 3.7	(13.0 - 27.4)
PFAS sum (ng/g ww)	29.2 \pm 26.3	(6.8 - 102.0)
PFAS sum (ng/g dw)	57.2 \pm 49.9	(12.5 - 185.2)
PFAS sum (ng/g lw)	90.0 \pm 77.3	(19.3 - 273.8)

- PCBs

The mean concentrations of dl-PCBs and ndl-PCBs of the silver male eels are presented in the Table 3. The 18 investigated PCBs were detected in all eels sampled in this study. When they were expressed as ng/g ww, the dl-PCB sums and the PCB sums were significantly higher in male muscles than in female muscles (respectively $p = 0.027$ and $p = 0.043$). For the results of the other expressions of PCB sums and dl-PCB sums (ng/g dw and lw), as well as for the ndl-PCB sums whatever their expression, no significant gender difference was observed. The significant differences observed between males and females did not change the position of the Loire estuary among the other French and European rivers in terms of eel PCB contamination discussed by Couderc et al. (2014).

The PCB pattern of the ndl-PCBs + PCB-118 in male silver eels is shown in Figure 1. The ndl-PCBs + PCB-118 contributed to 93.2% of the total PCB level for males and Couderc et al. (2014) found a similar value for females (93.3%). The pattern of these congeners was not significantly different to the pattern found for female silver eels by Couderc et al. (2014). The percentages of each PCB congeners were quite similar comparing the genders. As it was explained in this previous work, the proportional dominance of PCB 153, 138 and 180 could reflect historic use and subsequent environmental dispersion of Aroclor 1260, according to the PCB relative composition in this commercial mixture (Belpaire et al., 2011; Frame et al., 2001).

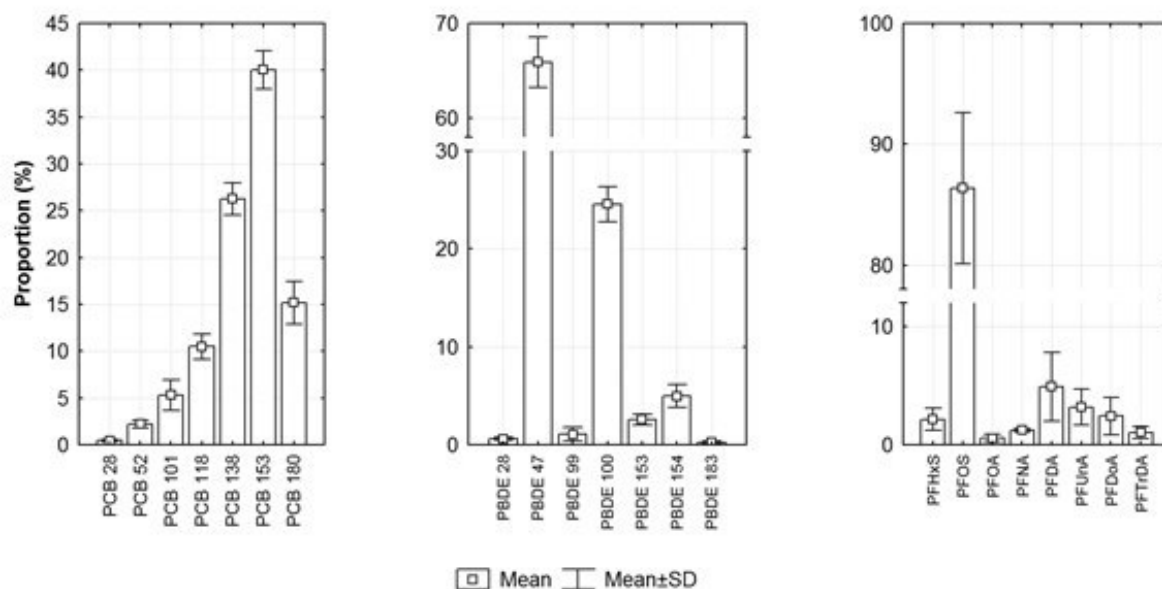


Figure 1 : Profiles of the most abundant congeners of PCB, PBDE and PFAS in silver male European eels from the Loire estuary (SVm; n=14). PCB proportions were calculated considering the sum of 6 PCB_i +PCB-118. PBDE proportions were calculated considering the sum of 7 PBDEs. PFAS proportions were calculated with the sum of the 8 most abundant detected PFAS. Error bars correspond to standard deviation

According to the data available for the Loire eels, the existing scoring systems (quality classes; Amilhat et al., 2013; Belpaire and Goemans, 2007; ICES, 2012) were applied to estimate the overall quality of the male silver eels as it was done by Couderc et al., 2014. The classification of the eels into the four groups (not impacted, slightly impacted, impacted and strongly impacted) was realized with ndl-PCB concentrations in males. The results obtained were strictly similar to those of females with 1 eel out of 14 (7%) in the slightly impacted group and 13 eels out of 14 (93%) in the impacted group.

- **PBDEs**

PBDE accumulation in the male silver eels is shown in Table 3. All the 7 investigated PBDEs were found in the fish. Sum of PBDE concentrations in male muscles was about 29.4 ng/g lw (36.3 ng/g lw in female muscles according to Couderc et al., (2014)). The results between males and females were significantly different using the expression of results in ng/g lw. The same difference was observed for the PBDE 47 concentrations (19.4 ng/g lw vs 24.6 ng/g lw for males and females respectively). The significantly different lipid weights found between males and females in the biometric parameter section could explain these differences since males had higher lipid weights than females. Consequently, as it was discussed by Couderc et al. (2014), it could be assumed that PBDE concentrations were not correlated to the LW in male silver eels. Even if PBDE sums and PBDE 47 concentrations were significantly lower in male muscles than in female muscles, the position of the Loire estuary presented by Couderc et al. (2014) in terms of PBDE eel contamination did not change among the French and European rivers. This estuary seems to be less contaminated.

All analyzed eels exceeded the EU EQS biota for the sum of six PBDE congeners (28, 47, 99, 100, 153 and 154): 0.0085 ng/g ww of fish (European Commission, 2008; European Commission, 2013). The levels of PBDEs varied considerably, ranging from around 850 to 1500 times above the EQS.

The PBDE pattern in male silver eels is shown in Figure 1. The pattern of all the studied congeners was not significantly different to the pattern found for female silver eels by Couderc et al. (2014). The percentages of each PBDE congeners were quite similar comparing the genders. The most abundant congeners in silver male muscles were the PBDE 47 (65.9%) followed by the PBDE 100 (24.6%) and the PBDE 154 (5.0%). The explanations of the PBDE patterns in eels from Loire estuary were previously reported by Couderc et al. (2014).

- **PFAS**

The PFAS sums determined in male muscles from the Loire estuary are presented in Table 3. The high standard deviations showed that values were much dispersed among the 14 males caught in the estuary whatever the expression of results (ww, dw, lw). These results found for silver males were comparable and equivalent to those found for silver females studied by Couderc et al. (2014). Among the 17 investigated PFAS, only PFHxS, PFOS, PFDA, PFUnA and PFDoA were detected in all muscle samples. PFHpS, PFDS, PFOA, PFNA, PFTrDA and PFTeDA were detected in some of the samples and 6 out of 17 were not detected (PFBS, PFOSi, PFBA, PFPA, PFHxA, PFHpA). The PFAS patterns (Figure 1) showed that PFOS was the major detected PFAS. Its contribution to the sum was about 86.4%. Then, PFDA, PFUnA, PFDoA and PFHxS showed relative proportions between 5% and 2%. These proportion values in males were not significantly different to those found by Couderc et al. (2014) in females. Since the PFAS concentrations and patterns in males were not significantly different to those of females, the position of the Loire estuary in terms of PFAS contamination among the French and European rivers discussed by Couderc et al. (2014) remains valid as well as the discussion about the PFAS sources.

The EU EQS specific to PFOS was 9.1 ng/g ww for biota (European Commission, 2013). Among the 14 males, 12 exceeded this value. The highest value was approximately 10 times higher than the UE EQS PFOS.

3.2. Sexual stage and location associated differences in thyroid endocrine status of eels

Free TH and TH bound to plasma thyroid hormone binding-proteins were analyzed in the blood plasma of eels. TH levels were illustrated in Figure 2 according to sexual stage and sampling site.

No differences were observed between groups for the TT4 level, which ranged from 2.4 to 49.2 ng/mL. A high heterogeneity of the values within each group could be noticed, particularly for YB. Free TH (FT3 and FT4) concentrations showed a different pattern. No spatial influence was found on FT4 and FT3 levels regarding yellow individuals. Male and female silver eels (SVm and SVf) presented significant lower FT4 and FT3 concentrations (FT4 : 7.7 ± 0.47 and 10.7 ± 7.8 pg/mL; FT3 : 4.0 ± 1.3 and 12.4 ± 5.0 pg/mL for SVm and SVf respectively) than yellow ones (FT4 : 13.0 ± 4.0 pg/mL; FT3: 20.5 ± 6.3 pg/mL, for all yellow individuals) ($p < 0.01$). Considering each sampling site, the difference were significant compared to YV and YB groups for FT4 levels, whereas it was shown to be significant with YB and YHI groups for FT3 levels. No significant gender differences were noticed even though silver females tend to present higher free TH levels than males.

The FT3/FT4 molar ratios ranged from 0.52 to 2.50 for yellow individuals and from 0.58 to 1.72 for silver female eels. No values could be calculated for SVm as not enough plasma was available for the analysis for many individuals in this group. A sampling site influence was evidenced as YHI and YB presented significant higher FT3 levels than FT4 ones, leading to high FT3/FT4 ratios for these both groups (YHI : 1.69 ± 0.51 and YB : 1.46 ± 0.36). The difference with YV and SVf was however significant only for YHI ($p < 0.02$). The determination of free T4 versus T4 bound to plasma thyroid-hormone binding proteins (THBP) showed that less than 0.02 to 0.52 % of T4 circulated freely in the blood plasma. Mean values were lower for SVm (0.04 ± 0.02 %) and SVf (0.06 ± 0.03 %) compared to yellow groups which presented mean values ranging from 0.11 ± 0.10 % for YB to 0.15 ± 0.16 % for YHI. Significant differences were found only between SVm, YV and YHI ($p < 0.05$).

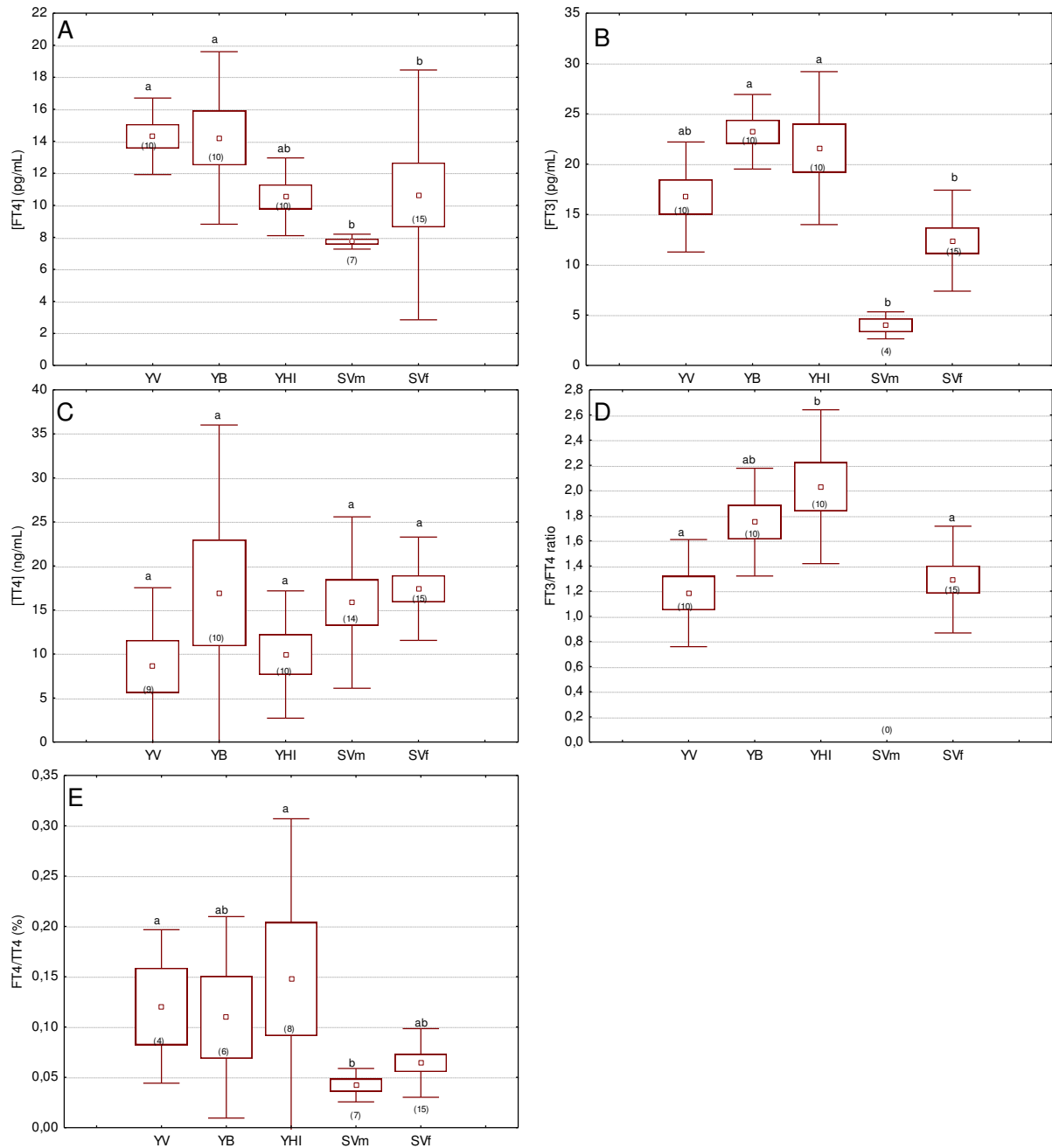


Figure 2 : Plasma FT4 (A), FT3 (B), TT4 (C) concentrations, FT3/FT4 (D) and FT4/TT4 (E) ratios in eels collected from field sites in the Loire estuary (YV, YB, YHI =yellow female eels respectively sampled in Varades, Bellevue and Haute-Indre; SVm = silver migrant male eels and SVf silver migrant female eels). Middle point represents mean value, box the standard error and whisker the standard deviation. The number of individuals per mean is shown in parentheses. (a-b) Superscripts indicate significant differences between means (p < 0.05).

3.3. Endocrine related gene expression in silver eels and gender differences

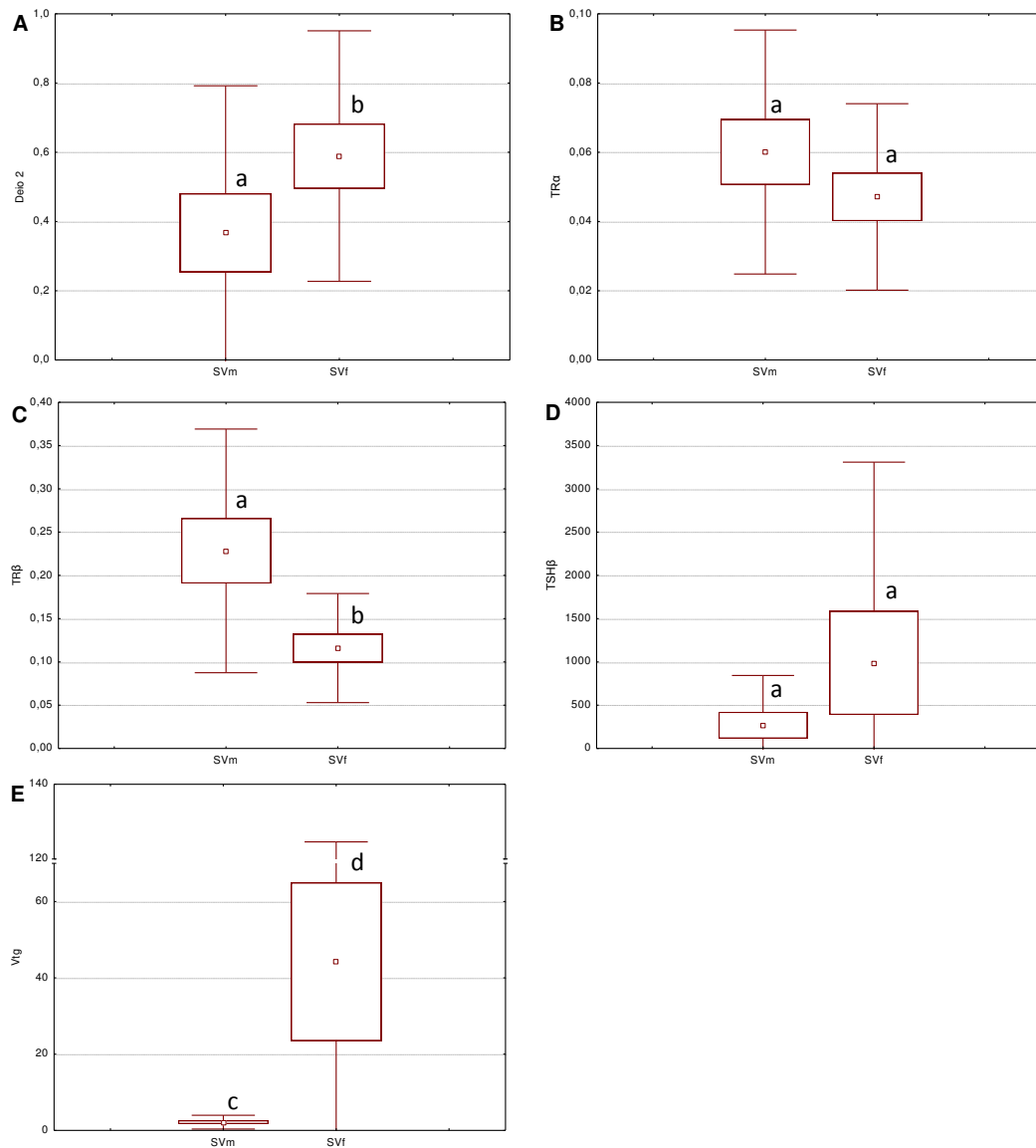


Figure 3 : Deiodinase 2 (Deio 2), thyroid receptors (TR α and TR β), thyroid stimulating hormone (TSH β) and vitellogenin (Vtg) mRNA expression in silver eels collected in the Loire estuary (SVm = silver migrant male eels (n=14) and SVf silver migrant female eels (n=15). Target gene / housekeeping gene mean ratios were presented in arbitrary units \pm standard deviation. (a-b) and (c-d) superscripts indicate significant differences between means at p-level < 0.05 and < 0.001 , respectively.

Deio 2 and Vtg mRNA levels were significantly higher in females compared to males (1.6 and 20.4 fold for Deio 2 and Vtg respectively) (Figure 3A and E). For Vtg, a particular high variability in mRNA expression was observed within females (Figure 3E). TR mRNA expression was lower in females compared to males, though only significant for TR β (Figure 3B and C). TSH β mRNA levels were not significantly different in the two sexes with in addition in both sexes a high variability (Figure 3E).

3.4. Relationships between biological factors, thyroid endocrine status and mRNA expression of endocrine related genes

Principal component analyses (PCA) have been performed in order to evaluate relationships between biometric and biological variables (TL, BL, LW, DT, GSI, HSI, PI, K), THs and endocrine related gene expression according to each developmental stage (Figure 4).

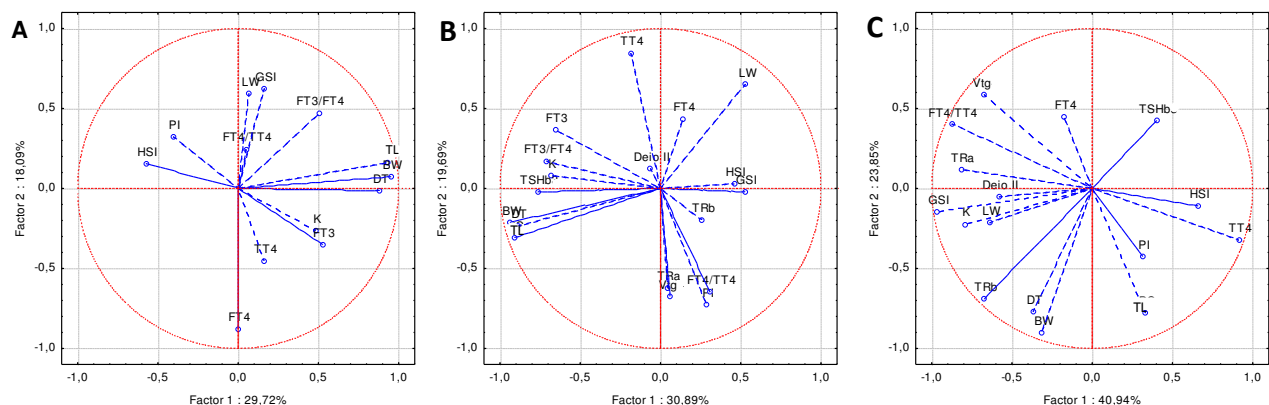


Figure 4 : Developmental and sexual stage associated evolution of physiological characteristics of sampled eels: total length (TL), body weight (BW), lipid weight (LW), digestive tract weight (DT), gonado-somatic index (GSI), hepato-somatic index (HSI), parasitism index (PI), Fulton's index (K), plasma free T3 level (FT3), plasma free T4 level (FT4), plasma total T4 level (TT4), FT3/FT4 ratio, FT4/TT4 and, in the case of silver eels, mRNA expression of Deiodinase 2 (Deio 2), thyroid receptors (TR α and TR β), thyroid stimulating hormone (TSH β), vitellogenin (Vtg). Correlation loadings for (A) yellow eels (n=18), (B) silver female eels (n=13) and (C) silver male eels (n=7)

For yellow eels, the first two components of the analysis represented 29.7% and 18.1% respectively of the total inertia (Figure 4A). Morphometric parameters such as TL, BW, DT, were highly and significantly correlated together on the first axis, whereas the second axis was mainly explained by FT4. The somatic index, GSI, appeared to be positively correlated to LW whereas HSI was negatively related to BW. No relationship was found between TH levels and biometric variables. FT3 levels were inversely correlated to PI and positively to FT4 levels and FT3/FT4 molar ratios. TT4 was found to be negatively correlated to FT4/TT4.

The PCA performed with silver female data showed similarity concerning the first axis which accounted for 30.9% of the data distribution and represented variations in TL, BW and DT. The silvering process was underlined by this first axis with the maturation of gonads (GSI) and the regression of the digestive tract (DT), both in negative correlation ($r=-0.52$, $p<0.05$), corresponding to the silver eel starvation. LW appeared to be negatively correlated to TL and BW and no correlated to GSI. The second axis (19.7%) was mainly correlated to variations in thyroid status (TT4), parasitism (PI) and Vtg expression. High negative correlation between PI and TH levels (FT3 and TT4) was not representative of the whole group as mainly due to two individuals highly parasited. High Vtg transcript levels were found in these two individuals, which explained the high correlation between PI and Vtg. Although not significant on the whole sample in our study, it could be noticed that this positive correlation PI/Vtg has been also observed in silver females sampled in the Loire estuary in the framework of another study (Blanchet-Letrouvé, personal communication). Results on TH levels showed a high negative correlation between FT3 and HSI, which was not observed for yellow eels. Despite the absence of correlation found between FT3 and FT4 levels, similar relationships as yellow eels were observed between FT3, FT3/FT4 and TT4, FT4/TT4 respectively. Regarding thyroid related gene expression, TR α transcript levels significantly increased with the increase of FT4/TT4 ratio. TR β was not correlated to THs but showed a significant negative correlation with Deio 2. After removing one outlier individual, no significant correlation was found between TSH β , Vtg and THs.

The PCA performed with silver male data was presented in Figure 4C. The first two axes justified almost 65% of the total inertia (respectively 40.9 and 23.9% for axes 1 and 2). Negative correlation was found between TT4 and GSI variations as described by the first axis. GSI appeared consequently highly correlated to the increase of FT4/TT4. The same pattern was observed between THs and Vtg transcripts, without significant correlation between GSI and Vtg. FT4/TT4 showed also negative relationship with HSI. As TH data not available for

the whole group, these correlations were obtained with 7 individuals and therefore must be interpreted with precaution. The axis 2 was correlated to biometric variables (BW, TL and DT), highly positively correlated each other. Concerning thyroid related gene expression, two variables showed correlation with biometric parameters: TR β , positively correlated with BW and DT; and Vtg, negatively correlated with TL. The genes encoding for thyroid receptors, TR α and TR β , were positively correlated each other.

3.5. Relationships between THs and contaminant impregnation

Significant negative correlations were observed between FT4 levels and 12 PCB congeners in yellow eels ($p=0.0005-0.05$; Table 4), including dl-PCBs 126, 169, 105, 114, 118, 123, 157, 167 and ndl-PCBs 28, 52, 101 and 153. PCB 138 also exhibited nearly significant negative relationships with FT4 ($p<0.08$). Significant negative relationships were also observed between FT4 and sum of dl-, ndl- and total PCBs. There were no significant correlation between PCBs and FT3 levels, nevertheless FT3/FT4 molar ratios were positively correlated with most of the congener concentrations correlated with FT4 ($p=0.001-0.03$). Among them, PCB 156 was nearly significant ($p=0.085$) and PCB 28, only, was not correlated. There were no significant relationships between PCBs and FT4/TT4 ratios. In silver eels, relationships between thyroid status and contaminant levels have been investigated in function of gender. Silver females exhibited no correlation between PCBs and free and total T4 levels (Table 5). Negative relationships were however found with FT4/TT4 ratios for few congeners : two dl-PCBs, congeners 123 and 156, and one ndl-PCB, the 180. The ndl-PCB sum showed nearly significant correlation ($p=0.08$). Two congeners only, PCB 138 and PCB 77, exhibited nearly significant ($p=0.07$) or significant ($p<0.05$) correlations with FT3 and FT3/FT4 ratio respectively ($R=-0.48$ and 0.57 , respectively). For silver males, few correlations between thyroid status and PCB levels were observed (Table 6). Moreover, the data interpretation required caution due to the limited number of individuals for free TH analyses ($n=4-7$). PCB 81 and 123 exhibited significant positive correlations with FT4 whereas no correlation was found with TT4 and only one positive correlation was depicted between PCB 28 and FT4/TT4. Several congeners were shown to be positively correlated to FT3: PCBs 189 and 153 ($p<0.05$), PCB 180 ($p=0.06$) and ndl and total PCB sums ($p=0.07-0.09$). On the contrary, PCB 101 was inversely correlated.

Regarding PBDEs, similar results to PCBs were observed in yellow eels (Table 4). Indeed, most of the PBDE congeners were negatively correlated to FT4 levels ($p=0.0003-0.03$) including PBDE 28, 47, 99, 100, 153 and 154. Only PBDE 183 exhibited no correlation. Positive relationships were consequently observed between PBDEs and FT3/FT4 ratios, significantly for PBDEs 100 and 153 ($p=0.008-0.04$) and nearly significant for PBDE 47 ($p=0.06$). No association was shown with FT3, TT4 and FT4/TT4. Regarding silver females, PBDEs were not correlated to TH levels and ratios (Table 5). In silver males, negative correlations, nearly significant, could be noticed between FT4 and congeners 154 and 183 ($p<0.1$) (Table 6). No correlation was observed with TT4, FT4/TT4 and FT3, in spite of nearly significant positive correlations between FT3 and PBDE 153, 154 and 183 ($p=0.06-0.08$).

In contrast to the many significant correlations highlighted for PCBs and PBDEs, no significant correlations were observed between TH and PFC in yellow eels. The same result was observed in silver females. In silver males, few relationships could be noticed implying a small number of individuals: an inverse relationship between FT4 and PFNA ($p<0.05$; $n=3$) and positive correlations between FT4/TT4 and PFC sum and PFOS ($p<0.05$; $n=7$).

BPA was inversely correlated to FT3 and FT3/FT4 ratio in yellow eels ($p<0.05$). Regarding AP contamination, yellow eels exhibited positive relationships between AP sum, 4 p-NP and FT3/FT4 molar ratio ($p<0.05$). Similar correlations were nearly significant with FT3 ($p<0.06$). Among the mPAH, only the 2-OHNa was inversely related to plasma FT3 concentrations and FT3/FT4 ratio ($p<0.05$) in yellow eels. A nearly significant inverse relationship between the mPAH sum and FT3/FT4 could also be noticed ($p<0.06$). In silver females, no correlations between BPA, AP, mPAH concentrations and THs were found (Table 5).

Table 4 : Correlation coefficients (R) and p-values of the relationships between thyroid endocrine status (plasma FT4, FT3, TT4 concentrations, FT3/FT4 and FT4/TT4 ratios) and organic contaminant concentrations (PCB, PBDE, PPFAS, BPA, AP, mHAP) in yellow eels collected in the Loire estuary. *Italic and bold characters indicate significant Pearson correlation coefficient (p<0.05). Italic characters indicate signification with p=0.05-0.1.*

	FT4		FT3		TT4		FT3/FT4		FT4/TT4		
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p	
Σ PCBs (ng/g ww)		-0.38	0.04	0.27	0.17	0.19	0.34	0.46	0.01	0.02	0.95
Σ dl-PCBs (ng/g ww)		-0.48	0.01	0.25	0.20	0.23	0.24	0.49	0.01	-0.06	0.81
	77	-0.27	0.16	-0.05	0.78	0.31	0.11	0.08	0.70	0.07	0.79
	81	-0.24	0.22	-0.02	0.91	0.21	0.27	0.07	0.72	0.10	0.71
	126	-0.47	0.01	0.18	0.36	0.31	0.11	0.42	0.02	-0.19	0.48
	169	-0.49	0.01	0.27	0.15	0.23	0.25	0.52	0.00	-0.14	0.60
	105	-0.51	0.01	0.22	0.25	0.25	0.20	0.48	0.01	-0.10	0.69
	114	-0.49	0.01	0.16	0.39	0.16	0.40	0.42	0.02	-0.10	0.70
	118	-0.51	0.01	0.24	0.21	0.25	0.21	0.51	0.01	-0.08	0.76
	123	-0.61	0.00	0.24	0.20	0.26	0.19	0.58	0.00	-0.10	0.70
	156	-0.25	0.20	0.21	0.28	0.09	0.63	0.33	0.09	0.03	0.91
	157	-0.41	0.03	0.25	0.19	0.23	0.23	0.45	0.01	-0.07	0.80
	167	-0.44	0.02	0.30	0.11	0.21	0.28	0.53	0.00	0.01	0.97
	189	-0.03	0.87	0.14	0.48	0.00	0.98	0.14	0.48	0.05	0.85
Σ ndl-PCBs (ng/g ww)		-0.37	0.05	0.27	0.16	0.18	0.35	0.45	0.01	0.03	0.92
	28	-0.42	0.02	-0.01	0.94	0.22	0.26	0.22	0.25	-0.22	0.41
	52	-0.49	0.01	0.14	0.46	0.39	0.04	0.41	0.03	-0.15	0.56
	101	-0.52	0.00	0.14	0.48	0.41	0.03	0.43	0.02	-0.14	0.58
	138	-0.34	0.07	0.24	0.21	0.16	0.43	0.42	0.03	0.00	0.99
	153	-0.42	0.02	0.31	0.10	0.19	0.32	0.52	0.00	0.05	0.85
	180	-0.09	0.64	0.18	0.35	0.04	0.85	0.21	0.27	0.07	0.80
Σ PBDEs (ng/g ww)		-0.56	0.00	0.10	0.59	0.16	0.40	0.39	0.04	-0.12	0.64
	28	-0.59	0.00	-0.02	0.94	0.08	0.67	0.29	0.13	-0.10	0.71
	47	-0.52	0.00	0.08	0.69	0.16	0.40	0.35	0.06	-0.15	0.57
	99	-0.46	0.01	-0.12	0.55	0.22	0.26	0.11	0.56	0.12	0.66
	100	-0.62	0.00	0.16	0.41	0.18	0.37	0.49	0.01	-0.10	0.69
	153	-0.50	0.01	0.12	0.52	0.25	0.20	0.38	0.04	-0.04	0.86
	154	-0.40	0.03	0.11	0.57	-0.01	0.97	0.30	0.11	0.07	0.79
	183	-0.21	0.62	0.39	0.33	-0.07	0.87	0.34	0.41	0.13	0.87
Σ PFAS (ng/g ww)		-0.10	0.61	0.13	0.50	-0.27	0.17	0.13	0.49	0.20	0.45
	PFHxS	-0.27	0.16	0.22	0.24	-0.15	0.45	0.32	0.09	0.07	0.80
	PFHpS	0.46	0.30	0.18	0.69	0.66	0.11	-0.21	0.65	0.64	0.56
	PFOS	-0.10	0.62	0.13	0.50	-0.26	0.19	0.13	0.50	0.19	0.48
	PFOA	-0.06	0.85	0.28	0.39	-0.18	0.58	0.40	0.20	0.04	0.91
	PFNA	-0.38	0.36	-0.19	0.65	-0.48	0.23	0.19	0.65	0.11	0.89
	PFDA	-0.11	0.57	0.11	0.57	-0.25	0.20	0.15	0.44	0.22	0.40
	PFUnA	-0.15	0.43	0.12	0.53	-0.34	0.08	0.18	0.35	0.27	0.29
	PFDoA	0.04	0.85	0.03	0.86	-0.33	0.10	-0.01	0.96	0.22	0.43
	PFTTrDA	-0.36	0.13	0.11	0.64	-0.26	0.28	0.37	0.12	0.44	0.21
	PFTeDA	-0.06	0.86	0.06	0.85	-0.01	0.99	0.09	0.80	-0.39	0.44
BPA (ng/mL)		0.22	0.43	-0.49	0.04	0.06	0.84	-0.61	0.01	-0.12	0.75
Σ APs (ng/mL)		-0.25	0.24	0.39	0.06	-0.04	0.85	0.41	0.04	0.30	0.28
	4t-BP	-0.49	0.26	-0.32	0.48	0.34	0.51	0.03	0.95	-0.45	0.45
	4t-OP	0.34	0.27	-0.30	0.35	-0.15	0.67	-0.41	0.19	0.11	0.79
	4n-NP	-0.27	0.65	0.18	0.73	-0.14	0.79	0.69	0.13	-0.24	0.64
	4p-NP	-0.25	0.23	0.39	0.05	-0.04	0.84	0.42	0.04	0.30	0.28
Σ mPAHs (ng/mL)		0.33	0.11	-0.30	0.15	0.21	0.33	-0.38	0.06	-0.12	0.67
	1-OHPhe	0.07	0.76	0.11	0.61	0.05	0.82	-0.01	0.97	-0.04	0.90
	1-OHPyr	0.26	0.26	-0.31	0.18	0.10	0.66	-0.34	0.13	-0.10	0.76
	2-OHF	0.34	0.10	-0.01	0.95	0.23	0.29	-0.21	0.32	-0.14	0.64
	2-OHNa	0.13	0.58	-0.47	0.04	0.04	0.87	-0.45	0.05	-0.01	0.97

Table 5: Correlation coefficients (R) and p-values of the relationships between thyroid endocrine status (plasma FT4, FT3, TT4 concentrations, FT3/FT4 and FT4/TT4 ratios) and organic contaminant concentrations (PCB, PBDE, PFAS, BPA, AP, mHAP) in silver female eels collected in the Loire estuary. *Italic and bold characters indicate significant Pearson correlation coefficient (p<0.05). Italic characters indicate signification with p=0.05-0.1.*

	FT4		FT3		TT4		FT3/FT4		FT4/TT4	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Σ PCBs (ng/g ww)	-0.23	0.42	-0.38	0.16	0.17	0.56	-0.14	0.63	-0.44	
Σ dl-PCBs (ng/g ww)	-0.10	0.71	-0.36	0.19	0.13	0.65	-0.32	0.25	-0.27	
77	-0.31	0.25	0.00	0.99	-0.07	0.80	0.57	0.03	-0.32	
81	0.15	0.59	-0.05	0.85	0.26	0.35	-0.36	0.18	0.04	
126	0.03	0.91	-0.01	0.97	0.02	0.94	-0.07	0.80	-0.05	
169	-0.01	0.98	-0.08	0.77	0.12	0.67	-0.10	0.73	-0.16	
105	0.01	0.96	-0.28	0.32	0.17	0.56	-0.39	0.15	-0.17	
114	-0.03	0.91	-0.25	0.37	0.36	0.18	-0.27	0.33	-0.32	
118	-0.12	0.67	-0.40	0.14	0.06	0.82	-0.34	0.21	-0.23	
123	-0.23	0.41	-0.31	0.25	0.35	0.20	-0.05	0.87	-0.53	
156	-0.18	0.52	-0.26	0.34	0.25	0.37	-0.07	0.80	-0.47	
157	-0.10	0.73	-0.30	0.27	0.18	0.52	-0.25	0.37	-0.32	
167	-0.12	0.68	-0.32	0.25	0.01	0.97	-0.24	0.38	-0.21	
189	-0.18	0.52	-0.21	0.46	0.28	0.31	-0.01	0.96	-0.44	
Σ ndl-PCBs (ng/g ww)	-0.25	0.38	-0.38	0.17	0.17	0.54	-0.10	0.73	-0.47	
28	-0.10	0.72	-0.21	0.45	-0.04	0.89	-0.17	0.54	-0.06	
52	-0.16	0.58	-0.44	0.10	-0.15	0.59	-0.38	0.16	-0.05	
101	-0.22	0.44	-0.18	0.51	0.09	0.75	0.10	0.72	-0.35	
138	-0.26	0.35	-0.48	0.07	0.07	0.80	-0.23	0.41	-0.41	
153	-0.22	0.44	-0.28	0.31	0.07	0.79	0.00	1.00	-0.35	
180	-0.15	0.58	-0.22	0.44	0.41	0.13	-0.03	0.92	-0.56	
Σ PBDEs (ng/g ww)	-0.03	0.92	-0.11	0.70	0.25	0.37	-0.11	0.70	-0.24	
28	-0.27	0.33	-0.17	0.54	-0.11	0.69	0.24	0.39	-0.24	
47	-0.01	0.97	-0.08	0.77	0.24	0.38	-0.10	0.73	-0.22	
99	-0.08	0.77	-0.04	0.89	0.02	0.96	0.05	0.86	0.10	
100	0.01	0.98	-0.18	0.53	0.23	0.40	-0.26	0.35	-0.22	
153	-0.14	0.61	-0.04	0.89	0.35	0.20	0.17	0.54	-0.37	
154	-0.21	0.45	-0.17	0.54	0.20	0.49	0.10	0.73	-0.42	
183	-0.24	0.40	-0.31	0.27	0.13	0.63	-0.03	0.92	-0.30	
Σ PFAS (ng/g ww)	0.29	0.29	0.37	0.17	0.42	0.12	0.09	0.76	-0.08	
PFHxS	0.54	0.06	0.26	0.39	0.50	0.08	-0.50	0.09	0.18	
PFHpS	-0.29	0.63	-0.26	0.67	-0.06	0.92	0.17	0.79	-0.45	
PFOS	0.33	0.23	0.39	0.15	0.42	0.12	0.04	0.87	-0.03	
PFOA	0.00	1.00	0.41	0.36	0.12	0.81	-0.43	0.39	-0.05	
PFNA	-0.09	0.83	-0.14	0.74	-0.02	0.96	-0.11	0.80	-0.07	
PFDA	-0.09	0.79	0.10	0.76	-0.01	0.99	0.32	0.30	-0.18	
PFUnA	0.02	0.96	0.19	0.49	0.28	0.32	0.26	0.35	-0.25	
PFDoA	0.03	0.92	0.23	0.40	0.29	0.29	0.30	0.28	-0.25	
PFTrDA	0.00	0.99	0.25	0.55	0.19	0.66	0.37	0.37	-0.04	
PFTeDA	-0.03	0.96	0.34	0.57	0.26	0.67	0.59	0.29	-0.13	
BPA (ng/mL)	-0.34	0.37	-0.41	0.27	-0.06	0.88	-0.30	0.43	-0.18	
Σ APs (ng/mL)	0.45	0.19	-0.14	0.70	-0.29	0.42	-0.35	0.32	0.34	
4t-BP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4t-OP	-0.03	0.93	0.12	0.74	0.16	0.66	0.13	0.71	-0.07	
4n-NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4p-NP	0.45	0.19	-0.15	0.69	-0.30	0.41	-0.35	0.32	0.34	
Σ mPAHs (ng/mL)	0.03	0.93	-0.34	0.34	0.19	0.59	-0.38	0.28	-0.21	
1-OHPhe	0.19	0.60	-0.16	0.66	0.27	0.45	-0.25	0.48	-0.22	
1-OHPyr	-0.09	0.80	-0.33	0.36	0.22	0.54	-0.31	0.38	-0.23	
2-OHF	0.09	0.80	-0.40	0.26	0.06	0.86	-0.46	0.18	-0.16	
2-OHNa	0.50	0.17	-0.35	0.35	-0.21	0.59	-0.61	0.08	0.17	

Table 6 : Correlation coefficients (R) and p-values of the relationships between thyroid endocrine status (plasma FT4, FT3, TT4 concentrations, FT3/FT4 and FT4/TT4 ratios) and organic contaminant concentrations (PCB, PBDE, PFAS, BPA, AP, mHAP) in silver male eels collected in the Loire estuary. *Italic and bold characters indicate significant Pearson correlation coefficient (p<0.05). Italic characters indicate signification with p=0.05-0.1.*

	FT4		FT3		TT4		FT3/FT4		FT4/TT4	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Σ PCBs (ng/g ww)	0.23	0.61	<i>0.91</i>	<i>0.09</i>	0.17	0.56	-	-	0.18	0.70
Σ dl-PCBs (ng/g ww)	0.56	0.19	0.67	0.33	0.15	0.61	-	-	0.53	0.22
77	-0.19	0.69	0.57	0.43	0.24	0.40	-	-	<i>0.71</i>	<i>0.08</i>
81	0.85	0.02	0.65	0.35	0.10	0.74	-	-	0.13	0.78
126	0.28	0.54	0.18	0.82	0.18	0.54	-	-	-0.15	0.74
169	0.14	0.76	0.19	0.81	0.32	0.27	-	-	-0.44	0.33
105	0.56	0.19	0.50	0.50	0.20	0.50	-	-	0.51	0.24
114	<i>0.67</i>	<i>0.10</i>	0.84	0.16	0.12	0.69	-	-	0.41	0.37
118	0.54	0.21	0.62	0.38	0.13	0.65	-	-	0.57	0.18
123	0.85	0.02	0.53	0.47	0.18	0.54	-	-	0.56	0.19
156	0.59	0.16	0.85	0.15	0.16	0.58	-	-	0.34	0.45
157	0.54	0.22	0.70	0.30	0.14	0.64	-	-	0.56	0.19
167	0.39	0.39	0.75	0.25	0.10	0.73	-	-	0.50	0.25
189	0.16	0.72	0.96	0.04	0.07	0.80	-	-	0.29	0.53
Σ ndl-PCBs (ng/g ww)	0.10	0.83	<i>0.93</i>	<i>0.07</i>	0.16	0.57	-	-	0.04	0.93
28	0.01	0.98	0.29	0.71	0.15	0.60	-	-	0.90	0.01
52	-0.56	0.19	0.09	0.91	0.27	0.36	-	-	0.61	0.15
101	-0.47	0.29	0.98	0.02	0.31	0.27	-	-	-0.16	0.73
138	0.47	0.29	0.83	0.17	0.05	0.87	-	-	0.30	0.52
153	-0.02	0.96	0.96	0.04	0.28	0.32	-	-	-0.14	0.76
180	0.01	0.98	<i>0.94</i>	<i>0.06</i>	0.06	0.84	-	-	-0.06	0.90
Σ PBDEs (ng/g ww)	-0.24	0.60	0.25	0.75	0.30	0.30	-	-	0.04	0.93
28	-0.04	0.93	0.39	0.61	0.03	0.93	-	-	0.42	0.35
47	-0.05	0.92	0.02	0.98	0.35	0.23	-	-	0.06	0.91
99	-0.28	0.54	0.04	0.96	0.07	0.82	-	-	0.62	0.14
100	-0.30	0.51	0.64	0.36	0.24	0.41	-	-	-0.11	0.81
153	-0.61	0.15	<i>0.92</i>	<i>0.08</i>	0.11	0.71	-	-	0.26	0.58
154	<i>-0.69</i>	<i>0.09</i>	<i>0.94</i>	<i>0.06</i>	0.17	0.56	-	-	-0.28	0.54
183	<i>-0.73</i>	<i>0.07</i>	<i>0.92</i>	<i>0.08</i>	0.05	0.87	-	-	-0.54	0.22
Σ PFAS (ng/g ww)	0.20	0.67	0.49	0.51	0.00	0.99	-	-	0.76	0.05
PFHxS	0.10	0.83	<i>0.92</i>	<i>0.08</i>	0.42	0.14	-	-	0.08	0.86
PFHpS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PFOS	0.19	0.69	0.49	0.51	0.02	0.95	-	-	0.78	0.04
PFOA	-0.87	0.33	-	-	0.02	0.98	-	-	0.89	0.30
PFNA	-1.00	0.03	-	-	0.15	0.85	-	-	0.59	0.60
PFDA	0.45	0.31	0.32	0.68	0.08	0.79	-	-	0.57	0.18
PFUnA	0.56	0.19	0.03	0.97	0.24	0.42	-	-	0.37	0.42
PFDoA	0.53	0.23	0.55	0.45	0.30	0.30	-	-	0.10	0.84
PFTTrDA	-	-	-	-	0.26	0.74	-	-	-	-
PFTeDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.6. Relationships between endocrine related gene expression and contaminant impregnation

The correlations are presented in Table 7 (for silver females) and 8 (for silver males). In silver females, 3 out of the 4 genes studied (Deio 2, TSH β and Vtg) presented several correlations with contaminant loads. In particular, TSH β mRNA levels were significantly correlated to numerous PCBs, especially the dl-PCBs 77, 118, 123, 156 and 157 and the ndl-PCBs 101, 138 and 153. A significant positive correlation with one PBDE (PBDE-28) and a negative correlation with the 4t-OP were also found. Strong positive correlations were found between Vtg mRNA levels and 4 out of the 7 PBDEs studied (PBDE-28, 47, 100 and 153). Vtg mRNA expression was also positively correlated to several PFAS but this result was mainly explained by two individuals highly contaminated. Moreover, PCB-126 and PCB-169 are positively correlated to Vtg mRNA levels. For Deio 2 mRNA expression, significant negative correlations are found with the PCB-167, the BPA and two mPAHs (2OH-fluo and 2-OHNa) while a positive correlation is found with the 4t-OP. For the two thyroid receptors (TR α and TR β), no strong correlations are found except for TR β mRNA levels that are positively correlated with 2OH-fluo and negatively correlated with PBDE-99.

In silver males, several correlations are found with the Vtg (Table 8). Indeed, Vtg mRNA levels are negatively correlated to numerous PCBs, either dl-PCBs (169 and 156) or ndl-PCBs (138 and 180), and strongly positively correlated to the dl-PCB-77 ($p < 0.05$). A strong negative correlation is also found with the PFTrDA ($p < 0.05$). TR α and Deio 2 mRNA levels are both negatively correlated to the PBDE-154.

Table 7 : Correlation coefficients (R) and p-values of the relationships between Deiodinase 2 (Deio 2), thyroid receptors (TR α and TR β), thyroid stimulating hormone (TSH β) and vitellogenin (Vtg) mRNA expression and organic contaminant concentrations (PCB, PBDE, PFC, BPA, AP, mHAP) in silver female eels collected in the Loire estuary. Italic and bold characters indicate significant Pearson correlation coefficient (p<0.05). Italic characters indicate signification with p=0.05-0.1.

	Deio 2		TR α		TR β		TSH β		Vtg	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Σ PCBs (ng/g ww)	-0.35	0.20	-0.33	0.24	0.15	0.59	0.68	0.01	0.20	0.50
Σ dl-PCBs (ng/g ww)	-0.40	0.14	-0.31	0.27	0.20	0.48	0.54	0.05	0.11	0.72
77	0.17	0.54	-0.08	0.77	-0.44	0.10	0.53	0.05	0.22	0.45
81	-0.03	0.92	-0.19	0.49	-0.02	0.95	0.12	0.69	-0.18	0.53
126	-0.07	0.82	-0.35	0.20	-0.18	0.52	-0.01	0.97	0.68	0.01
169	-0.12	0.67	-0.39	0.15	-0.08	0.77	-0.21	0.47	0.61	0.02
105	-0.40	0.14	-0.28	0.32	0.24	0.38	0.42	0.13	-0.02	0.96
114	-0.37	0.18	-0.34	0.21	0.15	0.59	0.45	0.11	0.09	0.75
118	-0.39	0.16	-0.29	0.30	0.16	0.56	0.57	0.03	0.11	0.70
123	0.00	0.99	-0.37	0.17	-0.04	0.88	<i>0.46</i>	<i>0.10</i>	-0.02	0.93
156	-0.41	0.13	-0.41	0.13	0.13	0.64	0.52	0.06	0.29	0.31
157	-0.39	0.16	-0.30	0.27	0.25	0.37	0.52	0.06	0.04	0.89
167	-0.48	0.07	-0.11	0.69	0.36	0.19	<i>0.45</i>	<i>0.10</i>	0.11	0.71
189	-0.18	0.52	-0.28	0.31	0.12	0.67	0.32	0.27	0.34	0.24
Σ ndl-PCBs (ng/g ww)	-0.34	0.22	-0.33	0.24	0.14	0.62	0.70	0.01	0.21	0.46
28	0.18	0.52	-0.08	0.77	0.00	0.99	0.19	0.51	-0.22	0.44
52	-0.06	0.84	0.02	0.94	0.22	0.44	0.30	0.29	-0.39	0.17
101	0.06	0.82	-0.15	0.59	-0.03	0.92	0.59	0.03	-0.07	0.82
138	-0.38	0.17	-0.25	0.36	0.25	0.37	0.61	0.02	0.05	0.86
153	-0.36	0.18	-0.25	0.36	0.01	0.97	0.78	0.00	0.32	0.27
180	-0.22	0.44	-0.44	0.10	0.16	0.57	0.36	0.20	0.34	0.23
Σ PBDEs (ng/g ww)	0.00	0.99	-0.41	0.13	-0.16	0.57	0.14	0.62	0.68	0.01
28	-0.10	0.72	0.01	0.97	-0.17	0.54	<i>0.50</i>	<i>0.07</i>	0.77	0.00
47	0.00	1.00	-0.40	0.14	-0.18	0.52	0.07	0.80	0.70	0.01
99	0.30	0.28	0.11	0.69	-0.50	<i>0.06</i>	-0.30	0.29	0.37	0.19
100	-0.09	0.76	-0.42	0.12	-0.02	0.93	0.31	0.28	0.50	0.07
153	0.20	0.47	-0.29	0.30	-0.32	0.24	0.32	0.27	0.63	0.02
154	0.17	0.54	-0.23	0.40	0.02	0.95	0.43	0.12	0.26	0.36
183	0.15	0.59	-0.27	0.33	-0.30	0.27	-0.11	0.72	0.12	0.68
Σ PFC (ng/g ww)	-0.36	0.19	-0.20	0.47	0.17	0.55	0.26	0.38	0.20	0.50
PFHxS	-0.04	0.89	-0.43	0.14	0.03	0.92	-0.23	0.48	0.24	0.45
PFHpS	-0.05	0.94	-0.76	0.14	-0.54	0.35	-0.13	0.87	-0.07	0.91
PFOS	-0.39	0.15	-0.17	0.55	0.23	0.40	0.31	0.29	0.07	0.82
PFOA	0.06	0.91	0.34	0.45	-0.53	0.22	-0.36	0.49	<i>0.68</i>	<i>0.10</i>
PFNA	0.31	0.46	-0.62	0.10	-0.43	0.29	-0.52	0.23	<i>0.64</i>	<i>0.09</i>
PFDA	0.08	0.80	-0.19	0.55	-0.23	0.47	0.18	0.60	<i>0.58</i>	<i>0.05</i>
PFUnA	-0.13	0.64	-0.24	0.39	-0.11	0.68	0.03	0.92	0.64	0.01
PFDoA	-0.07	0.80	-0.28	0.31	-0.22	0.44	-0.08	0.79	0.68	0.01
PFTTrDA	0.25	0.58	-0.12	0.78	-0.55	0.16	-0.41	0.37	0.77	0.03
PFTeDA	0.73	0.16	0.78	0.12	-0.35	0.56	0.52	0.48	0.35	0.57
BPA (ng/mL)	-0.63	<i>0.10</i>	-0.02	0.96	0.34	0.40	-0.34	0.41	-0.34	0.41
Σ APs (ng/mL)	-0.45	0.19	0.20	0.57	0.34	0.36	-0.21	0.62	0.34	0.47
4t-BP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4t-OP	<i>0.60</i>	<i>0.07</i>	-0.06	0.87	-0.42	0.23	-0.81	0.01	0.28	0.47
4n-NP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4p-NP	-0.47	0.17	0.21	0.57	0.37	0.32	-0.23	0.58	-0.42	0.35
Σ mPAHs (ng/mL)	-0.48	0.16	-0.20	0.58	0.48	0.16	-0.50	0.17	-0.25	0.51
1-OHPhe	-0.34	0.34	-0.23	0.52	0.30	0.40	-0.47	0.20	-0.06	0.88
1-OHPyr	-0.27	0.45	-0.16	0.66	0.38	0.28	-0.56	0.12	-0.16	0.69
2-OHF	-0.86	0.00	-0.19	0.60	0.70	0.02	-0.29	0.44	-0.52	0.15
2-OHNa	-0.75	0.02	-0.23	0.55	0.48	0.19	-0.38	0.36	-0.56	0.15

Table 8 : Correlation coefficients (R) and p-values of the relationships between Deiodinase 2 (Deio 2), thyroid receptors (TR α and TR β), thyroid stimulating hormone (TSH β) and vitellogenin (Vtg) mRNA expression and organic contaminant concentrations (PCB, PBDE, PFC, BPA, AP, mHAP) in silver male eels collected in the Loire estuary. Italic and bold characters indicate significant Pearson correlation coefficient (p<0.05). Italic characters indicate signification with p=0.05-0.1.

	Deio 2		TR α		TR β		TSH β		Vtg	
	R	p	R	p	R	p	R	p	R	p
Σ PCBs (ng/g ww)	-0.22	0.46	-0.17	0.56	-0.12	0.69	0.07	0.82	<i>-0.47</i>	<i>0.09</i>
Σ dl-PCBs (ng/g ww)	0.23	0.43	0.05	0.87	0.09	0.77	0.06	0.83	<i>-0.30</i>	0.29
77	0.28	0.34	0.02	0.94	-0.11	0.72	0.16	0.58	<i>0.56</i>	<i>0.04</i>
81	0.26	0.40	0.11	0.71	-0.03	0.93	0.11	0.71	-0.05	0.87
126	0.09	0.77	-0.17	0.56	0.14	0.63	0.38	0.18	-0.24	0.42
169	-0.29	0.32	-0.27	0.35	0.09	0.76	0.41	0.15	<i>-0.46</i>	<i>0.10</i>
105	0.28	0.34	0.11	0.70	0.14	0.64	0.05	0.85	-0.27	0.35
114	0.33	0.25	0.07	0.81	0.08	0.79	0.05	0.86	-0.36	0.21
118	0.28	0.34	0.09	0.77	0.11	0.71	0.04	0.90	-0.25	0.38
123	0.08	0.80	-0.03	0.92	0.01	0.99	-0.01	0.97	-0.21	0.46
156	0.07	0.81	-0.12	0.68	-0.02	0.94	0.16	0.58	<i>-0.48</i>	<i>0.08</i>
157	0.03	0.92	-0.06	0.84	0.01	0.97	0.04	0.88	-0.39	0.17
167	-0.10	0.74	-0.10	0.73	-0.04	0.89	0.12	0.67	-0.40	0.15
189	-0.31	0.28	-0.37	0.19	-0.21	0.47	0.27	0.35	-0.41	0.14
Σ ndl-PCBs (ng/g ww)	-0.33	0.24	-0.23	0.44	-0.17	0.56	0.06	0.83	<i>-0.49</i>	<i>0.08</i>
28	0.34	0.23	0.20	0.48	0.23	0.43	-0.26	0.38	0.40	0.15
52	-0.06	0.83	0.07	0.81	0.23	0.43	-0.45	0.10	0.33	0.24
101	0.19	0.52	0.19	0.51	-0.12	0.69	-0.43	0.13	<i>0.46</i>	<i>0.10</i>
138	-0.14	0.62	-0.07	0.81	-0.09	0.76	0.08	0.77	<i>-0.56</i>	<i>0.04</i>
153	-0.43	0.13	-0.20	0.49	-0.06	0.84	0.08	0.79	-0.44	0.11
180	-0.40	0.15	<i>-0.48</i>	<i>0.09</i>	-0.40	0.16	0.19	0.51	<i>-0.49</i>	<i>0.07</i>
Σ PBDEs (ng/g ww)	-0.15	0.61	-0.25	0.38	-0.09	0.76	-0.05	0.86	-0.10	0.73
28	0.37	0.19	0.18	0.53	0.09	0.77	-0.35	0.22	0.00	0.99
47	-0.02	0.94	-0.22	0.45	-0.08	0.78	-0.07	0.80	-0.06	0.84
99	-0.18	0.54	0.02	0.94	0.32	0.26	-0.07	0.80	0.13	0.66
100	-0.35	0.22	-0.24	0.42	-0.08	0.79	0.08	0.78	-0.27	0.35
153	-0.32	0.26	-0.36	0.21	-0.09	0.76	-0.11	0.71	-0.07	0.80
154	<i>-0.52</i>	<i>0.06</i>	<i>-0.47</i>	<i>0.09</i>	-0.44	0.12	-0.01	0.97	-0.06	0.85
183	-0.38	0.18	0.11	0.72	0.30	0.31	-0.20	0.50	-0.07	0.81
Σ PFAS (ng/g ww)	0.00	1.00	-0.12	0.67	-0.01	0.97	0.06	0.83	0.02	0.94
PFHxS	0.06	0.83	-0.25	0.39	-0.33	0.24	-0.06	0.83	0.07	0.82
PFHpS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PFOS	0.00	0.99	-0.11	0.70	0.00	0.99	0.05	0.86	0.04	0.89
PFOA	0.17	0.75	-0.08	0.89	-0.14	0.79	-0.09	0.87	0.61	0.20
PFNA	-0.27	0.73	-0.35	0.65	0.63	0.37	-0.35	0.65	0.54	0.47
PFDA	-0.02	0.95	0.05	0.86	0.08	0.80	0.26	0.36	-0.12	0.68
PFUnA	-0.03	0.92	0.00	1.00	0.02	0.96	0.26	0.38	-0.27	0.35
PFDoA	-0.13	0.66	0.02	0.95	0.16	0.58	0.24	0.42	-0.38	0.18
PFTTrDA	-0.15	0.85	-0.67	0.33	-0.75	0.25	0.89	0.11	<i>-0.97</i>	<i>0.03</i>
PFTeDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4. DISCUSSION

The data reported new information on thyroid status of European eels according to gender and developmental stage and suggest some endocrine-related effects consistent with their organic contaminant body burdens. Few studies reported the TH levels in European eels according to the developmental stage. High levels of TT4 in migratory female eels (mean of 17.3 ± 1.11 ng/mL) were found by Marchelidon et al. (1999), compared to sedentary eels (mean of 12.5 ± 0.63 ng/mL). An activation of thyroid function during silvering process, similar to those described during smoltification in salmonids was proposed. In our study, similar TT4 levels were observed (means of 17.4 ± 5.9 ng/mL for silver females and 11.9 ± 13.1 ng/mL for yellow ones). The high heterogeneity of YB eels for TT4 could be noticed implying some physiological specificity of these eels as previously noticed by Blanchet et al. (2014).

Hormonal profiles of European eels were more specifically studied during the transition phase of silvering by Van Ginneken et al. (2007) in Lake Grevelingen in Western Europe. A slight increase thyroid activity was found to occur in spring at the onset of the silvering process. Since a minimum activity in summer and a maximum activity in winter and spring were observed in many fish living at these latitudes, it is not clear whether these changes were related to silvering (Dufour et al., 2009). The authors suggested that THs and growth hormone were thus not important for gonadal development in the autumn, as a minimum activity was observed. Our results on FT4 in silver female individuals sampled during autumnal downstream migration were similar to those of this previous study but significant higher TT4 and lower FT4/TT4 levels were found. However no relationships were highlighted between TH levels, GSI and Vtg mRNA expression in silver females. On the contrary, GSI and Vtg transcripts appeared highly correlated to the increase of FT4/TT4 in silver males, suggesting a potential gender difference in endocrine controls involved in silvering process.

Other recent results have shown that thyrotropin (TSH β) mRNA levels and plasma T4 in silver females were weakly increased during silvering, suggesting that the thyrotropic axis is poorly implicated in the neuroendocrine control of the silvering (Aroua et al., 2005). The weak variations observed could be required in the increased activity of silver eels related to their migratory behavior (Durif et al., 2009).

The determination of free TH versus TH bound to plasma thyroid-hormone binding proteins revealed very high percentages of T4 circulating in the blood plasma of silver and yellow eels (>99.9% and >99.5% respectively). In teleosts, about 99% of circulating T4 is bound

reversibly to plasma proteins and transthyretin (TTR) was known to be the major THBP in the blood plasma (Carr and Patiño, 2011; Cyr and Eales, 1996). Lower FT4/TT4 ratio observed in silver individuals (mainly for males) compared to yellow eels corroborated the lower thyroid activity already mentioned for this stage.

No difference of FT3/FT4 molar ratios was shown between silver females and yellow individuals from Varades site. These ratios however were significantly increased in yellow eels from sampling locations more highly contaminated, Haute-Indre and Bellevue. As all of T3 circulating in plasma results from peripheral mono deiodination of the outer aromatic ring of T4, variations of T3/T4 ratio may reflect changes in the deiodination of T4 and/or metabolism (Carr and Patiño, 2011). Deiodination is carried out in peripheral tissues by deiodinase enzymes Deio 1 and Deio 2. These reactions are essential to the regulation of thyroidal status, because T3 is known to be the most potent form in regulating gene transcription (Blanton and Specker, 2007). However, in this study, no correlation was found between FT3/FT4 ratios and Deio 2 mRNA levels in silver females. In yellow eels, high FT3/FT4 ratios exhibited by YHI and YB eels were related to lower FT4 and higher FT3 levels in the blood plasma. These observations were associated with higher concentrations of PCB and PBDE, as underlined by significant correlations between several congeners with FT4 levels and FT3/FT4. Among correlated PCBs, mainly penta- and hexachlorinated congeners were observed. Eight of them were dioxin-like PCBs presenting either a co-planar (non-ortho PCBs 126 and 169) or a non co-planar shape (mono-ortho PCBs 105, 114, 118, 123, 157 and 167). PCB 123 was the most correlated congener whatever to FT4 or FT3/FT4. Except the higher chlorinated congener # 180, the ndl-PCBs (#28, 52, 101, 138 and 153) which were the most abundant in eel muscles (Couderc et al., 2014) appeared as much correlated to FT4 and FT3/FT4 ratio as ndl-ones. No or weak relationships was noticed with FT3 and TT4, as well as for this last parameter, no marked inter-site difference.

Regarding PBDEs, inverse relationships, mainly explained by individuals of Bellevue and Haute-Indre, were also observed between six tri – to hexa-brominated congeners (28, 47, 99, 100, 153, 154) and FT4 levels. The PBDE 100, penta-halogenated as PCB 123, was the most correlated. The relationships with FT3/FT4 were less pronounced as two congeners remained significant. Such changes in thyroid homeostasis dependent on the environmental location could reveal contaminant-related alterations in the peripheral deiodination and/or metabolism

of T4. Some recent studies reported halogenated contaminant-related thyroid effects in wild fish populations (Brar et al., 2010; Jenkins et al., 2014; Simmons et al., 2014). Brar et al. (2010) characterized the thyroid endocrine-related effects and their association to accumulated contaminants in two fish species (*Leptocottus armatus* and *Cymatogaster aggregata*) sampled from different locations in San Francisco Bay. In individuals of both species sampled around industrialized areas of the bay, plasma concentrations of T4 were significantly reduced relative to fish from less contaminated sites. Though plasma T3 levels also varied significantly by location, the highest T3/T4 ratios were found in specimens presenting the highest hepatic PBC burdens. A large number of PCB congeners, both dl- and ndl-ones, exhibited significant inverse correlations with T4 levels in both species. T3/T4 ratio and T3 levels, in the case of sculpin, were in contrast positively correlated with PCB loads. Fewer correlations were also noticed between THs and hepatic PAHs burdens in both species. Furthermore, sculpin exhibited some significant positive relationships, between T3 levels as well as T3/T4 ratio with chlorinated pesticides including DDT and chlordanes. This study is considered to provide some of the most convincing results demonstrating a temporal correlation between exposure to PCBs and altered deiodination and/or metabolism in wild fish populations (Carr and Patiño, 2011). The potential role of PCB or hydroxylated metabolites in altering 5'-deiodinase activity in fish has been suggested but it is not confirmed by all laboratory experiments (Adams et al., 2000; Buckman et al., 2007; Carr and Patiño, 2011; Simmons et al., 2014). Adams et al. (2000) demonstrated an enhancement of hepatic but not brain 5'-deiodinase following intraperitoneal injection with PCB 77 in immature American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). But direct exposure to PCB of liver microcosmes produced no effect on deiodination (Adams et al., 2000). Brown et al. (2004b) observed increased thyroid epithelial cell height and plasma T4 level but no effect on deiodination in lake trout after a long-term exposure to another co-planar dl-PCB (# 126) (*Salvelinus namaycush*). These responses may also result in part from enhanced hepatic T4 glucuronidation. Indeed, in teleosts as in other vertebrates, dl-PCBs that have a planar configuration similar in structure to dioxins were known to be potent activators of Ah receptor and thus affect TH clearance and metabolism. These effects were associated to the activation of cytochrome P450 1A and 2B or competition for the binding to plasma THBP resulting in decreased concentrations of plasma T4 and less frequently with decreased T3 (Brouwer et al., 1998; Brown et al., 2004a; Giesy et al., 2006). In recent studies, Simmons et al. (2014) and Gilroy et al. (2012) suggested that PCBs are likely being hydroxylated *in vivo*, resulting in increased bioactivity at endocrine receptors. These authors found histological evidence of

thyroid de-activation in male brown bullhead with high dl-PCB body loads and modifications in T4 and T3 deiodinase activities. Multiple mechanisms involving a competition for binding sites on THBP, an antagonist interaction of OH-PCBs with the 5'deiodinase and/or an agonist interaction between (OH)-PCB analogs of T4 and TSH receptors were proposed to explain the constancy of plasma T4 levels associated to a T3 decrease.

Few studies focused on ndl-PCB effects on thyroid function in fish. Buckman et al. (2007) demonstrated that some of these congeners which are known to induce CYP2B activity in mammals (#87, 99, 101, 153, 180, 183 and 194) could induced, in high concentrations, EROD activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) via the CYP 1A but did not appear to affect any measured index of thyroid status. Alteration of TH levels via competitive binding to TTR has also been proposed, resulting to affect T4 turnover and feedback signaling to the HPT axis (Brouwer et al., 1998; Brar et al, 2010)

In addition, our data demonstrated high relations between brominated flame retardants PBDE and thyroid status as all congeners, except the heptabrominated #183, were related to decrease of FT4 and in a lesser extent to the enhancement of FT3/FT4 ratio. Even if PBDE levels in yellow eel muscles were on average 125 times lower than PCB levels (Couderc et al., 2014), it was notable that correlations were observed for 6 out of 7 congeners analyzed. PBDE 100 (2,2',4,4',6 penta brominated diphenyl ether) which was very similar to THs and represented the second most important congener in yellow eel muscle (Couderc et al., 2014), exhibited the highest association with reduced T4 level and increased T3/T4 ratio. The inverse correlations with FT3/FT4 were maintained only for the most represented congeners. Hydroxylated PBDEs are structurally very similar to thyroid hormones. Their potential for competition for TTR binding has been demonstrated by many studies (for review: Pearce et al. 2009, Costa and Giodarno, 2007). Displacement of T4 from TTR may lead to its increased glucuronidation and a consequent decreased level of T4. In teleosts, little information not always consistent was available on the effects of PBDE (Torres et al., 2013). Dietary BDE-47 depressed plasma T4 but not T3 and altered TH signaling at multiple levels of the HPT axis in fathead minnows(Lema et al., 2008). In contrast, an experimental study on European flounder (*Platichthys flesus*) or zebrafish found no significant effects of the commercial mixture PBDE-71 on the thyroid status (Kuiper et al., 2008). Torres et al. (2013) showed no effect of PBDE 47 on thyroid status and pubertal development of zebrafish, underlining the disparity in

thyroid effects of PBDE among teleost species. More constancy seems to be obtained in studies involving embryo or larvae stages. Yu et al. (Yu et al., 2010) demonstrated a decrease of T4 in zebrafish embryo following exposure to PBDE 71 (1-10 µg/L). As mRNA modulation of genes encoding proteins involved in TH synthesis as well as proteins involved in TTR synthesis was observed, the authors suggested multiple mechanisms of PBDE implying increased hepatic elimination and displacement of TTR. Similar conclusions were expressed by Chan et al. (2012)(2012) who indicated that BDE-47 affects the HPT axis in zebrafish embryo on different levels of thyroid hormone regulation. Regarding recent available field studies, Jenkins et al. (2014) found no correlation between PBDE congeners and thyroid parameters (T4, T3 and thyrocyte height) in male largescale suckers (*Catostomus macrocheilus*), whereas Jarque et al. (2014) demonstrated that highest hepatic deio 2mRNA levels in trout were correlated with the highly-brominated PBDE body burdens. Following our results, further research on deiodinase activities in liver of eels are required to go into PBDE effects in depth.

In contrast to correlations between TH and several PCB and PBDE congeners, fewer positive relationships with APs were noticed. FT3 and FT3/FT4 ratio appeared weakly related to 4 p-NP levels in bile of yellow eels, 4 p-NP being the most abundant detected AP (Couderc et al., 2014). These correlations were weak and rather inconsistent with the little information available on NP effects. In rodents, NP was known to inhibit thyroid peroxidases catalyzing iodination of T3 and T4 (Schmutzler et al., 2004). In fish, some laboratory studies, but not all, demonstrated alteration of thyroid function by NP. Exposure to NP reduced T4 levels in adult male shubunkins (*Carassius auratus*) without affecting T3 and thyroid histopathology (Zaccaroni et al., 2009). THs were proposed by these authors as early markers of NP effect. McCormick et al. (2005) noted decreased T4 levels further to intraperitoneal injection of NP in Atlantic salmon, with no change on T3 levels. By contrast, dietary 4-NP treatment for 4 weeks did not significantly influence plasma T4 and T3 levels during smoltification of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (Keen et al., 2005).

The present study also noted inverse relationships between BPA, one PAH metabolite (2-OHNa) and FT3, as well as FT3/FT4 ratio; whereas FT4 and TT4 seemed to be not related to these contaminant concentrations. These results were mainly linked to individuals from

Varades which exhibited higher BPA and mPAH levels relative to YB and YHI (Couderc et al., 2014). Consequently, these results must be interpreted with caution as it could be the result of a confounding effect of PCB and PBDE on TH levels detailed above. As only T3 level appeared to be reduced in function of BPA and 2-OHNa levels, these results may suggest effects on deiodinase activities. To our knowledge, no similar results were reported in the literature. BPA was indeed known to inhibit TR-mediated transcription by acting as an antagonist of T3 (Moriyama et al., 2002)ss. *In vivo* rodent exposure demonstrated that BPA bind more specifically to the TR β inhibiting negative feedback of THs and leading to enhanced T4 levels with unchanged serum TSH (Zoeller et al., 2005). In zebrafish, the effects of BPA were examined at environmentally pertinent dose (10^{-9} M). Alteration of gene expression involved in TH synthesis and of thyroid specific transcriptional factors was observed as well as a direct effect on thyroid follicular cell (Gentilcore et al., 2013). Regarding PAHs, effects on thyroid system were expected via induction of AhR-mediated pathways (Brar et al., 2010). In their field study, these authors observed few positive relationships between T3 and PAH levels in liver. In *A. Anguilla*, Teles et al. (2005)(2005) found that β -naphthoflavone (exposure to 2.7 μ M during 24 to 48 h), a PAH-like compound, alters the normal functioning of the HPT by decrease significantly plasma T4 levels, whereas TSH and T3 remained constant.

In contrast to yellow eels, silver eels exhibited significantly less correlations between thyroid hormones and contaminant body burdens. In silver females, scarce and weak inverse relationships could be noted between the congeners 123, 180 and FT4/TT4, whereas in males, enhanced FT4 and FT3 levels were associated with a couple of PCB congeners (81, 123, 189, 101 and 153). In both sexes, these correlations were nearly significant with the ndl-PCB sum. No other correlations were found with the rest of organic examined contaminants in silver females, whereas males depicted few positive associations between PFOS and PFAS sum and FT4/TT4 ratios. Several effects of PFAS on the HPT axis were reported in literature (Lau et al., 2007). Several evidence were notably in favour of the competition for the binding to TTR (Weiss et al., 2009). It was however notable that analyses of FT3 and FT4/TT4 done in silver males concerned only 4 and 7 individuals respectively, which implied caution in considering these data. The differences between yellow and silver stages could be related to the lower thyroid activity observed in silver individuals, as discussed earlier. On the other hand, a redistribution of contaminants bioaccumulated during the continental juvenile stage was suggest to occur during the lipid mobilization required for reproductive migration and sexual

maturation (Geeraerts and Belpaire, 2010). We could suppose that this phenomenon induce some differences in the evaluation of potential relationships, in silver eels, between contaminant loads and THs, relative to yellow eels.

Concerning mRNA levels and their relationships with contaminant impregnation in these silver individuals, main correlations were noticed for TSH β gene expression which was significantly correlated to numerous PCBs (either dl-PCBs or ndl-PCBs) and to PBDE 28 in silver females. Chevrier et al. (2007) also found that several PCBs were positively associated with neonatal TSH levels in humans. Yu et al. (2010) suggested that the elevation in the TSH β mRNA levels can be attributed to the reduced negative feedback from the hypothalamus and pituitary following TH levels decline. Previous studies actually found an elevation in TSH β mRNA after different PBDE exposure or mixtures consistent with this reduced negative feedback (Chen et al., 2012; Darnerud and Sinjari, 1996; Lema et al., 2008; Zhao et al., 2013). In our study, even if some weak and inverse relationships could be noted between some PCB congeners and FT4/TT4, the TSH β mRNA levels seemed to be not related to TH levels in silver females.

Deio 2 is a hepatic enzyme that plays a major role in the control of the intracellular concentration of T3 in teleost fishes. Its mRNA levels are regulated in fish liver by circulating thyroid hormones (Orozco and Valverde, 2005). In the present study, the mRNA levels of Deio 2 were shown to be negatively correlated to 2-OHF and 2-OHNa and in a lesser extent to PCB-167 and BPA in silver females. In silver males, only a weak and inverse correlation with PBDE 154 was found. As in yellow eels, 2-OHNa was also related to a reduced FT3/FT4 ratio in silver females ($p < 0.08$) which was consistent with low levels of Deio 2 transcripts and suggesting a down regulation of gene encoding for Deio 2. In literature, little is the information on effects of contaminant on Deio 2 mRNA expression. Laboratory experiments showed that Deio 2 transcript levels were significantly reduced after a combined exposure to PCB 153 and p,p'-DDE in rats (Liu et al., 2014)(Liu et al., 2014). Noyes et al. (2013) also found that mRNA levels of the hepatic Deio 2 enzyme were up-regulated by the presence of PBDE 209 in laboratory conditions in adult fathead minnows (*Pimephales promelas*), likely in compensation to hypothyroidism. In contrast, Picard-Aitken et al. (2007) found that hepatic Deio 2 mRNA levels were increased in wild walleyes (*Sander vitreus*) from the most polluted site. This finding was however divergent with plasma hormone data and the effects of experimentally induced hyperthyroidism on fish deiodinase expression (Picard-Aitken et al. 2007).

TR α and TR β mRNA levels exhibited some weak negative correlations to PBDEs (either PBDE-99 in females or PBDE-154 in males) and a positive one to 2-OHF (in females). This last relationship may be linked to the inverse correlation depicted between TR β and Deio 2 in these individuals. According to PCA analyses, TR α was also related to an increase of FT4/TT4 ratio in both sexes. In addition to effects on circulating THs, recent *in vitro* and laboratory animal evidence suggests that several contaminants can affect TH receptor (TR) activity and TH responsive gene expression (Zoeller, 2005). THs (primarily through the biologically active form of T3) function as signaling molecules that interact with two nuclear receptors, TR α and TR β and alter their transcription activation and repression activities (Yen and Chin, 1994). Indeed, the genes coding for TRs themselves contain TREs (Thyroid Response Elements), so that transcripts for TR α and TR β are autoinduced by T3 (Liu et al., 2014; Lema et al., 2008). This autoinduction means that TR transcripts are potential markers for assessing TH-induced activation of gene transcripts in target tissues (Opitz et al., 2006). Pacyniak et al. (2007) indicated that PBDE 47, 99 and 209 interact with the mouse pregnane X receptor (PXR) and for human, the nuclear steroid and xenobiotic receptor (SXR). The SXR interacts with the corepressor SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid receptors) (Takeshita et al., 2002) and PBDE-induced impacts on SXR might contribute to changes in TR gene transcription (Lema et al., 2008). Kojima et al. (2009) also found an antagonistic activity of PBDE 90 on TRs since significant inhibitions of both TR α and TR β -mediated transcriptional activities were found.

Regarding hepatic Vtg mRNA levels, strong positive correlations were found with two dl-PCBs (126, 169), 4 out of the 7 PBDEs studied (28, 47, 100, 153) and 3 PFAS (PFUnA, PFDoA, PFTrDA) in silver females. In males, Vtg mRNA levels were associated to increased FT4/TT4 ratio. Opposed correlations with two PCB congeners, 77 and 138, were shown to be significant correlated. Nearly significant inverse relationships could be noticed with ndl-PCB and PCB sums, some other PCBs (156, 169, 180) and one PFAS. Vtg mRNA transcripts have been already detected in European eel individuals not inclined to express it (undifferentiated and yellow individuals, silver males) (Blanchet-Letrouvé et al., 2013). However, the low Vtg expression and the absence of impact on gonad histology did not allow the authors to conclude as any endocrine disruption. In our study, all silver males exhibited Vtg mRNA transcripts. Even though the mean Vtg level exhibited by males was obviously lower to that one found for silver females, a high variability existed for females and 4/14 males exhibited higher Vtg levels than the minimum value depicted by females. These findings consolidated

the unexpected Vtg expression in silver males as previously found by Blanchet-Letrouvé et al. (2013). However, excepted the PCB 77, the inverse relations observed with PCB body burdens in males suggested a potential repression of Vg mRNA expression. Opposed effects between congeners may be attributable to the difference in structure and related toxicity. The coplanar PCB 77 was known as one of the most potent activator of the Ah-receptor and could directly activate estrogen receptor α (ER α) through AhR-ER cross-talk activation leading to a contemporary increase of Vtg expression (Calo et al., 2010; Mortensen and Arukwe, 2008). On the other hand, a repression of VTG expression were also noticed in flounder following exposure to low doses of PBDE mixture implying ER antagonist activity of some congeners or their hydroxylated metabolites (Williams et al., 2013).

On the contrary, in silver females, mainly PBDE loads appeared to be strongly related to Vtg transcripts suggesting potential estrogenic effects. These effects may be related to activation of ER by agonist congeners or inhibition of estrogen sulfotransferase resulting in indirect increased of estradiol bioavailability in target tissues (Kester et al., 2000; Williams et al., 2013).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to express their special thanks to the region Pays de la Loire, the SMIDAP (Syndicat Mixte pour le Développement de l'Aquaculture et de la Pêche en Pays de la Loire) and the AADPPMFEDLA (Association Agréée Départementale des Pêcheurs Professionnels Maritimes et Fluviaux Eau Douce de Loire-Atlantique) for their technical and financial support.

REFERENCES

- Adams BA, Cyr DG, Eales JG. Thyroid hormone deiodination in tissues of American plaice, *Hippoglossoides platessoides*: characterization and short-term responses to polychlorinated biphenyls (PCBs) 77 and 126. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 2000; 127: 367-378.
- Amilhat E, Fazio G, Simon G, Manetti M, Paris S, Delahaut L, et al. Silver European eels health in Mediterranean habitats. *Ecology of Freshwater Fish* 2013; 23: 49-64.
- Aroua S, Schmitz M, Baloche S, Vidal B, Rousseau K, Dufour S. Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. *Neuroendocrinology* 2005; 82: 221-232.
- Belpaire C, Geeraerts C, Roosens L, Neels H, Covaci A. What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience. *Environment International* 2011; 37: 354-364.
- Belpaire C, Goemans G. The European eel *Anguilla anguilla*, a rapporteur of the chemical status for the water framework directive? *Life and Environment* 2007; 57: 235-252.
- Belpaire C, Goemans G, Geeraerts C, Quataert P, Parmentier K. Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 2008; 65: 1483-1491.
- Blanchet-Letrouvé I, Lafont A-G, Poirier L, Baloche S, Zalouk-Vergnoux A, Dufour S, et al. Vg mRNA induction in an endangered fish species (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013; 97: 103-113.
- Blanchet-Letrouvé I, Zalouk-Vergnoux A, Vénisseau A, Couderc M, Le Bizec B, Elie P, et al. 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* 2014; 472: 562-571.
- Blanton ML, Specker JL. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 2007; 37: 97-115.

- Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebæk NE, Main KM. Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology* 2006; 154: 599-611.
- Boëtius I, Boëtius J. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1980; 1: 1-28.
- Brar NK, Waggoner C, Reyes JA, Fairey R, Kelley KM. Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures. *Aquatic Toxicology* 2010; 96: 203-215.
- Brouwer A, Morse DC, Lans MC, Gerliénke Schuur A, Murk AJ, Klasson-Wehler E, et al. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicology and Industrial Health* 1998; 14: 59-84.
- Brown SB, Adams BA, Cyr DG, Eales JG. Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2004a; 23: 1680-1701.
- Brown SB, Evans RE, Vandenbyllardt L, Finnson KW, Palace VP, Kane AS, et al. Altered thyroid status in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to co-planar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Aquatic Toxicology* 2004b; 67: 75-85.
- Buckman AH, Fisk AT, Parrott JL, Solomon KR, Brown SB. PCBs can diminish the influence of temperature on thyroid indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 2007; 84: 366-378.
- Bultel E, Lasne E, Acou A, Guillaudeau J, Bertier C, Feunteun E. Migration behaviour of silver eels (*Anguilla anguilla*) in a large estuary of Western Europe inferred from acoustic telemetry. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 2014; 137: 23-31.
- Calo M, Alberghina D, Bitto A, Lauriano ER, Lo Cascio P. Estrogenic followed by anti-estrogenic effects of PCBs exposure in juvenile fish (*Spaurus aurata*). *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48: 2458-63.
- Carr JA, Patiño R. The hypothalamus–pituitary–thyroid axis in teleosts and amphibians: endocrine disruption and its consequences to natural populations. *General and Comparative Endocrinology* 2011; 170: 299-312.
- Chan WK, Chan KM. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA. *Aquatic Toxicology* 2012; 108: 106-11.
- Chen Q, Yu L, Yang L, Zhou B. Bioconcentration and metabolism of decabromodiphenyl ether (BDE-209) result in thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology* 2012; 110-111: 141-148.
- Chevrier J, Eskenazi B, Bradman A, Fenster L, Barr DB. Associations between prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and neonatal thyroid-stimulating hormone levels in a Mexican-American population, Salinas Valley, California. *Environmental Health Perspectives* 2007; 115: 1490-1496.

- Chiba I, Sakakibara A, Goto Y, Isono T, Yamamoto Y, Iwata H, et al. Negative correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in seals from the coast of Hokkaido, Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2001; 20: 1092-1097.
- CITES. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Consideration of Proposals for Amendment of Appendices I and II. Fourteenth Meeting of the Conference of the Parties. The Hague, The Netherlands, 3–15 June 2007. 2007: 39 p.
- Couderc M, Poirier L, Zalouk-Vergnoux A, Kamari A, Blanchet-Letrouvé I, Marchand P, et al. Occurrence of POPs and other persistent organic contaminants in the European eels (*Anguilla anguilla*) from the Loire estuary, France. *Science of The Total Environment* 2014; accepted with minor revisions.
- Cyr DG, Eales JG. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1996; 6: 165-200.
- Darnerud P, Sinjari T. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroxine and TSH blood levels in rats and mice. *Organohalogen Comp* 1996; 29: 316-319.
- De Groef B, Van der Geyten S, Darras VM, Kuhn ER. Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates. *Gen Comp Endocrinol* 2006; 146: 62-8.
- Dekker W. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* 2003; 10: 365-376.
- Derveaux S, Vandesompele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* 2010; 50: 227-30.
- Dong W, Macaulay LJ, Kwok KW, Hinton DE, Stapleton HM. Using whole mount in situ hybridization to examine thyroid hormone deiodinase expression in embryonic and larval zebrafish: a tool for examining OH-BDE toxicity to early life stages. *Aquatic Toxicology* 2013; 133: 190-9.
- Dufour S, van den Thillart G, Rankin JC. Spawning migration of the European eel: reproduction index, a useful tool for conservation management. Vol 30: Springer; 2009.
- Elie P, Girard P. Effets des micropolluants et des organismes pathogènes chez l'anguille européenne *Anguilla anguilla* L.1758. Collection Etude CEMAGREF 2009; 128: 121.
- European Commission. Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union* 2008; L 348: 84-97.

- European Commission. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Union 2013; L 226: 1-17.
- Frame GM, Robertson LW, Hansen LG. The current state-of-the-art of comprehensive, quantitative, congener-specific PCB analysis, and what we now know about the distributions of individual congeners in commercial Aroclor mixtures. In: Robertson LW, LG H, editors. PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects. Lexington, KY: University Press of Kentucky; 2001. p. 3-9.
- Gasparic MB, Cankar K, Zel J, Gruden K. Comparison of different real-time PCR chemistries and their suitability for detection and quantification of genetically modified organisms. BMC Biotechnol 2008; 8: 1472-6750.
- Geeraerts C, Belpaire C. The effects of contaminants in European eel: a review. Ecotoxicology 2010; 19: 239-266.
- Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, et al. Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. Toxicology 2013; 304: 21-31.
- Giesy JP, Kannan K, Blankenship AL, Jones PD, Newsted JL. Toxicology of PCBs and related compounds. In: Norris DO, Carr, J.A. (Eds.), editor. Endocrine Disruption: The Biological Basis for Health Effects in Humans and Wildlife. New York: Oxford University Press,; 2006. p. 245-331.
- Gilroy EA, Muir DG, McMaster ME, Darling C, Campbell LM, de Solla SR, et al. Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites in wild fish from Wheatley Harbour Area of Concern, Ontario, Canada. Environ Toxicol Chem 2012; 31: 2788-97.
- Hall AJ, Green NJL, Jones KC, Pomeroy PP, Harwood J. Thyroid hormones as biomarkers in grey seals. Marine Pollution Bulletin 1998; 36: 424-428.
- Hornung RW, Reed LD. Estimation of average concentration in the presence of nondetectable values. Applied Occupational and Environmental Hygiene 1990; 5: 46-51.
- ICES. Report of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL), 3 – 9 September 2012, Copenhagen, Denmark. No. ICES CM 2012/ACOM:18. , 2012, pp. 824.
- ICES. Advice November 2013: Widely distributed and migratory stocks - European eel. ICES Advice 2013 2013; Book 9: 1-7.
- Jarque S, Bosch C, Casado M, Grimalt JO, Raldua D, Pina B. Analysis of hepatic deiodinase 2 mRNA levels in natural fish lake populations exposed to different levels of putative thyroid disrupters. Environmental Pollution 2014; 187: 210-3.
- Jenkins JA, Olivier HM, Draugelis-Dale RO, Eilts BE, Torres L, Patino R, et al. Assessing reproductive and endocrine parameters in male largescale suckers (*Catostomus macrocheilus*) along a contaminant gradient in the lower Columbia River, USA. Science of The Total Environment 2014; 484: 365-78.

- Keen PL, Higgs DA, Hall KJ, Ikonomou M. Effects of dietary exposure of 4-nonylphenol on growth and smoltification of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Sci Total Environ* 2005; 349: 81-94.
- Kester MH, Bulduk S, Tibboel D, Meinl W, Glatt H, Falany CN, et al. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs. *Endocrinology* 2000; 141: 1897-900.
- Kohrle J. The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000; 57: 1853-63.
- Kojima H, Takeuchi S, Uramaru N, Sugihara K, Yoshida T, Kitamura S. Nuclear hormone receptor activity of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives* 2009; 117: 1210-1218.
- Kuiper RV, Vethaak AD, Cantón RoF, Anselmo H, Dubbeldam M, van den Brandhof E-J, et al. 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* 2008; 73: 195-202.
- Lau C, Anitole K, Hodes C, Lai D, Pfahles-Hutchens A, Seed J. Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences* 2007; 99: 366-394.
- Lema SC, Dickey JT, Schultz IR, Swanson P. Dietary exposure to 2, 2', 4, 4'-Tetrabromodiphenyl Ether (PBDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain. *Environmental Health Perspectives* 2008; 116: 1694-1699.
- Lethimonier C, Flouriot G, Valotaire Y, Kah O, Ducouret B. Transcriptional Interference Between Glucocorticoid Receptor and Estradiol Receptor Mediates the Inhibitory Effect of Cortisol on Fish Vitellogenesis. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 1763-1771.
- Liu C, Ha M, Li L, Yang K. PCB153 and p,p'-DDE disorder thyroid hormones via thyroglobulin, deiodinase 2, transthyretin, hepatic enzymes and receptors. *Environmental science and pollution research international* 2014; DOI 10.1007/s11356-014-3093-3.
- MacCrimmon HR, Claytor RR. Meristic and morphometric identity of Baltic stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Zoology* 1985; 63: 2032-2037.
- Marchelidon J, Le Belle N, Hardy A, Vidal B, Sbaihi M, Burzawa-Gérard E, et al. Étude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison : application à la caractérisation du stade argenté. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 1999; 355: 349-368.
- McCormick SD, O'Dea M F, Moeckel AM, Lerner DT, Bjornsson BT. Endocrine disruption of parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and 17beta-estradiol. *Gen Comp Endocrinol* 2005; 142: 280-8.

- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87: 5185-5190.
- Mortensen AS, Arukwe A. Activation of estrogen receptor signaling by the dioxin-like aryl hydrocarbon receptor agonist, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) in salmon in vitro system. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 227: 313-24.
- Noyes PD, Hinton DE, Stapleton HM. Accumulation and Debromination of Decabromodiphenyl Ether (BDE-209) in Juvenile Fathead Minnows (*Pimephales promelas*) Induces Thyroid Disruption and Liver Alterations. *Toxicological Sciences* 2011; 122: 265-274.
- Noyes PD, Lema SC, Macaulay LJ, Douglas NK, Stapleton HM. Low level exposure to the flame retardant BDE-209 reduces thyroid hormone levels and disrupts thyroid signaling in fathead minnows. *Environmental Science & Technology* 2013; 47: 10012-10021.
- Opitz R, Lutz I, Nguyen N-H, Scanlan TS, Kloas W. Analysis of thyroid hormone receptor β mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 212: 1-13.
- Orozco A, Valverde RC. Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid* 2005; 15: 799-813.
- Pacyniak EK, Cheng X, Cunningham ML, Crofton K, Klaassen CD, Guo GL. The Flame Retardants, Polybrominated Diphenyl Ethers, Are Pregnane X Receptor Activators. *Toxicological Sciences* 2007; 97: 94-102.
- 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*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 2007; 352: 244-256.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 2004; 26: 509-15.
- Picard-Aitken M, Fournier H, Pariseau R, Marcogliese DJ, Cyr DG. Thyroid disruption in walleye (*Sander vitreus*) exposed to environmental contaminants: Cloning and use of iodothyronine deiodinases as molecular biomarkers. *Aquatic Toxicology* 2007; 83: 200-211.
- Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Björnsson BT, Einarsdottir IE, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2001; 130: 447-459.
- Quadroni S, Galassi S, Capoccioni F, Ciccotti E, Grandi G, De Leo G, et al. Contamination, parasitism and condition of *Anguilla anguilla* in three Italian stocks. *Ecotoxicology* 2013; 22: 94-108.

- Reckordt M, Ubl C, Wagner C, Frankowski J, Dorow M. Downstream migration dynamics of female and male silver eels (*Anguilla anguilla* L.) in the regulated German lowland Warnow River. *Ecology of Freshwater Fish* 2014; 23: 7-20.
- Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, et al. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004; 205: 95-102.
- Simmons DBD, McMaster ME, Reiner EJ, Hewitt LM, Parrott JL, Park BJ, et al. Wild fish from the Bay of Quinte Area of Concern contain elevated tissue concentrations of PCBs and exhibit evidence of endocrine-related health effects. *Environment International* 2014; 66: 124-137.
- Sumpter JP, Jobling S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 1995; 103: 173-178.
- Szabo DT, Richardson VM, Ross DG, Diliberto JJ, Kodavanti PRS, Birnbaum LS. Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups. *Toxicological Sciences* 2009; 107: 27-39.
- Tabuchi M, Veldhoen N, Dangerfield N, Jeffries S, Helbing CC, Ross PS. PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). *Environ Health Perspect* 2006; 114: 1024-31.
- Takeshita A, Taguchi M, Koibuchi N, Ozawa Y. Putative role of the orphan nuclear receptor SXR (steroid and xenobiotic receptor) in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics. *J Biol Chem* 2002; 277: 32453-8.
- 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: 175-185.
- Teles M, Oliveira M, Pacheco M, Santos MA. Endocrine and metabolic changes in *Anguilla anguilla* L. following exposure to [beta]-naphthoflavone--a microsomal enzyme inducer. *Environment International* 2005; 31: 99-104.
- Tesch FW. *The eel*. Oxford: Blackwell Science; 2003.
- Torres L, Orazio CE, Peterman PH, Patino R. Effects of dietary exposure to brominated flame retardant BDE-47 on thyroid condition, gonadal development and growth of zebrafish. *Fish Physiol Biochem* 2013; 39: 1115-28.
- Van Den Thillart G, Van Ginneken V, Körner F, Heijmans R, Van Der Linden R, Gluvers A. Endurance swimming of European eel. *Journal of Fish Biology* 2004; 65: 312-318.
- Van der Geyten S, Toguyeni A, Baroiller JF, Fauconneau B, Fostier A, Sanders JP, et al. Hypothyroidism induces type I iodothyronine deiodinase expression in tilapia liver. *Gen Comp Endocrinol* 2001; 124: 333-42.

- Van Ginneken V, Durif C, Dufour S, Sbaihi M, Boot R, Noorlander K, et al. Endocrine profiles during silvering of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) living in saltwater. *Animal Biology* 2007; 57: 453-466.
- Weiss JM, Andersson PL, Lamoree MH, Leonards PEG, van Leeuwen SPJ, Hamers T. Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicological Sciences* 2009; 109: 206-216.
- Weltzien F-A, Pasqualini C, Vernier P, Dufour S. A quantitative real-time RT-PCR assay for European eel tyrosine hydroxylase. *General and Comparative Endocrinology* 2005; 142: 134-142.
- Williams TD, Diab AM, Gubbins M, Collins C, Matejusova I, Kerr R, et al. Transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) liver to a brominated flame retardant mixture. *Aquatic Toxicology* 2013; 142–143: 45-52.
- Yen PM, Chin WW. New advances in understanding the molecular mechanisms of thyroid hormone action. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 1994; 5: 65-72.
- Yu L, Deng J, Shi X, Liu C, Yu K, Zhou B. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic–pituitary–thyroid axis of zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology* 2010; 97: 226-233.
- Zaccaroni A, Gamberoni M, Mandrioli L, Sirri R, Mordenti O, Scaravelli D, et al. Thyroid hormones as a potential early biomarker of exposure to 4-nonylphenol in adult male shubunkins (*Carassius auratus*). *Science of The Total Environment* 2009; 407: 3301-3306.
- Zhao X, Wang S, Li D, You H, Ren X. Effects of perchlorate on BDE-47-induced alteration thyroid hormone and gene expression of in the hypothalamus–pituitary–thyroid axis in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2013; 36: 1176-1185.
- Zoeller RT. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005; 242: 10-15.
- Zoeller RT, Bansal R, Parris C. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 2005; 146: 607-612.

III.4. Conclusion

Dans cette partie nous avons étudié la qualité du milieu estuarien au moyen d'une espèce sentinelle, l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) puis nous avons recherché d'éventuelles associations entre les contaminants détectés chez cette espèce et des perturbations de son système thyroïdien.

Lors de la recherche de contaminants sur l'anguille, nous avons analysé 53 composés organiques parmi lesquels des PCB, PBDE, PFAS, AP, métabolites de HAP et le BPA. L'état physiologique des poissons influençait fortement les résultats obtenus. Leurs corrections par rapport à la masse grasseuse des individus dans le cas des analyses effectuées sur les muscles, ou par rapport à la concentration en protéines lorsque l'analyse portait sur la bile, étaient les plus appropriées même si ce mode d'expression des résultats atténuait les différences entre les groupes d'anguilles étudiés.

L'étude des variations spatiales a été entreprise avec l'analyse des anguilles jaunes qui sont considérées comme d'excellentes indicatrices des pressions chimiques spécifiques d'un site (Belpaire *et al.*, 2008). Les concentrations en PCB, PFAS, OH-HAP et AP entre les individus des trois sites n'étaient pas significativement différentes ($p < 0,05$). Néanmoins, pour les PCB et les AP, les niveaux mesurés étaient plus faibles chez les individus pêchés à Varades même si cette différence avec les autres sites n'était pas significative. La contamination en PBDE était plus importante chez les individus prélevés aux abords de Nantes, en particulier pour ceux de Haute-Indre. Au contraire, la contamination en BPA était plus importante chez les anguilles de Varades, le site le plus en amont de l'estuaire pointant une source probable à proximité de cette zone.

L'influence du stade sexuel a également été investiguée. Les anguilles argentées étaient moins contaminées en PCB et AP que les anguilles jaunes prélevées aux abords de l'agglomération Nantaise (Bellevue et Haute-Indre). Dans le cas des PBDE, PFAS, OH-HAP les anguilles argentées ne présentaient pas de différences notables avec les valeurs de concentrations mesurées chez les anguilles jaunes. Pour le BPA, les anguilles argentées avaient des concentrations dans l'absolu très faibles mais uniquement par rapport aux anguilles jaunes de Varades.

L'étude des profils n'a pas vraiment permis de caractériser des sources ou origines précises des pollutions dans l'estuaire. Une forte variabilité de concentrations mesurées entre les

individus pêchés sur les mêmes sites pourrait expliquer : (1) la faible différence des moyennes des valeurs ; (2) le caractère non significatif des différences entre les sites de pêches mais aussi entre les stades sexuels. Cette variabilité pourrait être notamment due au fait que dans les habitats estuariens, la sédentarité serait moins prononcée que dans les habitats d'eau douce plus en amont (Daverat *et al.*, 2004).

Concernant l'influence du genre étudiée chez les anguilles argentées, pour les PCB et les PFAS, aucune différence n'a été observée que ce soit en termes de concentrations ou de profils de contaminants. Cependant pour les PBDE, les femelles présentaient des niveaux de contamination supérieurs aux mâles mais néanmoins des profils similaires.

La contamination mesurée sur l'ensemble des anguilles de l'estuaire les situait, pour les PCB, PBDE et PFAS, dans des niveaux moyens par rapports aux autres études européennes entreprises sur cette espèce. Les concentrations de métabolites de HAP et AP étaient relativement faibles par rapport aux données européennes alors que le BPA présentait des niveaux plutôt similaires à ceux généralement mesurés chez les anguilles européennes.

Toutes les anguilles (jaunes et argentées) prélevées dépassaient l'EU EQS biota pour la somme des PBDE fixée par la directive cadre sur l'eau (European Commission, 2013). Les trois quarts des anguilles dépassaient également l'UE EQS biota du PFOS fixée par cette même directive.

La valeur de TEQ totale fixée par les autorités européennes à 10 pg WHO₂₀₀₅ TEQ/g ww PCDD/F TEQ + dl-PCBs TEQ, qui correspond à une limite réglementaire maximale pour les poissons gras de rivières destinés à la commercialisation et à la consommation, était dépassée pour 7 anguilles jaunes sur les 30 prélevées (Van den Berg *et al.*, 2006). Elles provenaient uniquement des sites de Bellevue (4/10) et Haute-Indre (3/10). Les anguilles argentées présentaient des valeurs de TEQ relativement proches du maximum, néanmoins seuls deux individus sur les quinze dépassaient cette valeur. Des anguilles jaunes pêchées aux abords de Nantes présentaient également des niveaux de contaminations supérieurs à la limite réglementaire fixée par la commission européenne pour les PCB-ndl à 300 ng/g de poids frais. Ainsi 6/10 des individus de Bellevue et 4/10 de ceux de Haute Indre excédaient cette valeur alors qu'aucune des anguilles argentées et des anguilles jaunes de Varades ne la dépassaient. Compte tenu des valeurs de contamination retrouvées dans les anguilles prélevées dans l'estuaire, des recommandations de consommation ont été proposées. En effet, sur les 45 anguilles prélevées, 13 présentaient au moins une valeur supérieure aux réglementations en

vigueur et devraient donc être considérées comme impropres à la consommation pour l'Homme.

Lors de l'étude du statut thyroïdien en fonction du stade sexuel et du site de prélèvement, aucune différence de concentration plasmatique de la T4 totale n'a été observée entre les 3 groupes d'anguilles jaunes. Les valeurs obtenues étaient très variables au sein des groupes en particulier pour les poissons prélevés sur le site de Bellevue. Les mâles et les femelles argentées avaient des concentrations en T4 et T3 libre inférieures aux anguilles jaunes. Une influence du site d'échantillonnage a été constatée. Les anguilles de Haute-Indre et Bellevue présentaient des niveaux de T3 libre plus importants que ceux de la T4 libre, conduisant à des rapports T3 libre/T4 libre plus élevés chez ces deux groupes. L'étude du rapport de la T4 libre /T4 totale indiquait que moins de 0,02 à 0,52% de la T4 circule à l'état libre (non liée à des protéines de transport) dans le sang.

L'étude de l'expression de gènes spécifiques de la fonction thyroïdienne chez les anguilles argentées a révélé des niveaux d'expression de l'ARN messager de la Deio 2 (désiodase de type 2) et Vtg plus élevés chez les femelles que chez les mâles (respectivement de 1,6 à 20,4 fois plus élevés pour la Deio 2 et la Vtg). L'expression de l'ARNm des TR était, chez les femelles inférieures à celle des mâles mais seulement significativement différente pour le TR β . Aucune différence entre les deux sexes n'a été observée dans l'expression de la TSH β .

Des liens ont pu également être établis entre les paramètres biométriques, le statut thyroïdien et l'expression des gènes. Ainsi, le GSI et l'expression de la Vtg apparaissaient fortement corrélés avec l'augmentation du rapport T4 libre/T4 totale chez les mâles argentés. Au contraire, aucune relation entre le statut thyroïdien, le GSI et l'expression de la Vtg n'était constatée pour les femelles argentées.

Des relations entre l'homéostasie thyroïdienne et les concentrations de contaminants chez les anguilles ont pu être mises en évidence. Ainsi chez les anguilles jaunes, des corrélations négatives ont été constatées entre les niveaux de T4 libre plasmatique et les concentrations de 12 PCB mesurées dans les muscles. La concentration plasmatique en T4 libre et le rapport T3 libre/T4 libre étaient corrélés positivement avec la totalité des PCB exceptés les congénères 156 et 28. Chez les anguilles argentées femelles, aucune association entre les concentrations en PCB et en T4 totale plasmatique n'a été constatée. Cependant des corrélations négatives entre le ratio T4 libre/T4 totale et les concentrations de 3 congénères de PCB (123,156 et 180) ont été relevées. Peu de corrélations entre le statut thyroïdien et les concentrations en PCB

mesurées ont été observées chez les mâles argentés. Ces derniers résultats sont à prendre avec précaution car l'analyse, notamment des HT libres, a porté sur un nombre d'individus limité (n=4 à 7).

Des corrélations similaires à celles obtenues avec les PCB ont été pointées avec les niveaux de PBDE mesurés chez les anguilles jaunes. Ainsi, la plupart des congénères de PBDE (BDE 28, 47, 99, 100, 153 et 154) étaient corrélés négativement avec la concentration plasmatique de T4 libre.

Au contraire des PCB et PBDE, les PFAS n'ont révélé aucun lien entre les concentrations mesurées dans les muscles et les concentrations des HT chez les anguilles jaunes et les femelles argentées.

Chez les anguilles jaunes, le BPA était quant à lui inversement corrélé au niveau de la T3 libre ainsi qu'au rapport T3 libre/T4 libre. La somme des AP et du 4 p-NP était associée positivement au rapport T3 libre/T4 libre. Le statut thyroïdien des anguilles femelles argentées ne semblait pas être affecté par les concentrations de BPA, des AP et des métabolites de HAP.

De même que le statut thyroïdien, l'expression des gènes spécifiques de la fonction thyroïdienne était perturbée par les concentrations en contaminants. Ainsi, chez les anguilles femelles argentées, 3 des 4 gènes étudiés (Deio 2, TSH β et Vtg) présentaient des corrélations avec la charge de contaminants mesurées chez celles-ci. Notamment, l'expression de la TSH β était positivement corrélée avec 8 des 18 PCB analysés mais aussi avec le PBDE 28 et négativement avec le 4t-OP. L'expression de la Vtg était corrélée avec 5 des 7 PBDE investigués mais également avec les PCB 126 et 169. Aucune corrélation de l'expression des deux récepteurs thyroïdiens (TR α et TR β) avec les contaminants n'a été mise en évidence, excepté pour le TR β dont le niveau d'expression était corrélé positivement avec un métabolite de HAP (2OH-fluo). Chez les mâles argentés, plusieurs corrélations ont été relevées avec la Vtg. Ainsi, l'expression de cette dernière était négativement corrélée avec certains PCB parmi lesquels les congénères 169, 156, 138 et 180 mais également positivement avec le congénère 77.

Parmi les composés étudiés, les PCB et les PBDE apparaîtraient donc comme étant les principaux contributeurs des perturbations de l'homéostasie des HT et de l'expression génique spécifique du système thyroïdien des anguilles.

**Chapitre IV : Evaluation du risque
sanitaire lié à la consommation de
poissons contaminés par des polluants
organiques persistants**

IV.1. Introduction et contexte de l'étude

Dans les chapitres précédents, nous avons mis en évidence la présence de contaminants de type PT à la fois dans les sédiments de l'estuaire de la Loire et chez une espèce de poisson évoluant dans ces eaux, l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*). Dans les deux cas, la détermination du potentiel de perturbation a montré des effets négatifs sur la fonction thyroïdienne. La structure chimique des hormones thyroïdiennes, leur synthèse, leur signalisation et leur régulation sont hautement conservées chez les vertébrés. Des facteurs environnementaux qui influent sur la fonction thyroïdienne d'une espèce donnée peuvent affecter celle d'autres espèces animales, y compris l'Homme (Bergman *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2009). Le système thyroïdien est fortement impliqué dans la régulation du métabolisme, de la croissance et du développement, et particulièrement dans le développement périnatal du système nerveux central des mammifères (cf I.1.2.2.d)). La période périnatale est notamment critique pour le développement du système nerveux des mammifères (Ahmed *et al.*, 2008; Koibuchi, 2008; Zoeller and Crofton, 2000). Ainsi dans le but d'estimer le risque sanitaire chez l'Homme d'une consommation, au cours de la gestation et de la lactation, de poissons de rivière nous avons décidé d'établir et de valider un protocole *in vivo*, nous permettant de déceler des effets délétères ou anomalies du développement neurologique chez le juvénile dont la mère aurait été exposée au cours de la gestation et de la lactation.

Le choix du modèle

De nombreuses preuves permettent d'affirmer que les HT jouent un rôle similaire dans le développement du cerveau chez l'animal et l'Homme (Zoeller and Rovet, 2004). Cela indique clairement que les rongeurs constituent des modèles adaptés de tests pour fournir des informations nécessaires en termes de santé publique (Bergman *et al.*, 2013). Le choix de l'espèce animale a essentiellement reposé sur l'examen critique de la littérature. Parmi les rongeurs, le rat nous est apparu comme incontournable étant donné la facilité relative de son élevage, et sa capacité d'apprentissage nécessaire aux tests neurocomportementaux (Bowers *et al.*, 2004; Carr *et al.*, 2003; Costa and Giordano, 2007; Gonçalves *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2001; Kubo *et al.*, 2003; Kuriyama *et al.*, 2005; Meerts *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2007). Ainsi, d'après la littérature, le rat constitue le « meilleur » modèle pour travailler sur des perturbations du développement neurologique (Ahmed *et al.*, 2010). De plus, le rat nouveau-né nous est apparu une évidence pour étudier le développement

du cerveau et sa dépendance à l'homéostasie thyroïdienne (Legrand, 1986; Schwartz *et al.*, 1997). Le rat naît avec un cerveau relativement peu développé et avec l'axe HPT pas encore entièrement mature (Oppenheimer and Schwartz, 1997). Le cerveau du rat à la naissance est au même stade que le cerveau humain à 5-6 mois de gestation et le cerveau du rat à 10 jours d'âge postnatal est équivalent à celui de l'Homme à la naissance (Ahmed *et al.*, 2008; Portefield and Hendrich, 1993). Ainsi, l'étude des effets de substances chimiques sur le développement du cerveau et de l'axe HPT dans les premiers jours après la naissance de la progéniture peut donc offrir indirectement la possibilité d'étudier l'impact de composés sur le développement du cerveau des êtres humains. A titre d'exemple, une étude de Gonçalves *et al.* (2010) utilisant des rats dans des conditions quasi similaires, a permis de montrer des déficiences de la mémoire et du comportement dépendantes du sexe, causées par l'exposition au Bisphenol A pendant l'organogenèse et la différenciation du cerveau.

Le choix de la substance

Plusieurs classes de composés chimiques sont aujourd'hui suspectées ou sont même avérées être des perturbateurs du fonctionnement de la thyroïde (cf I.2.2). Afin de pouvoir valider le protocole, il était nécessaire de trouver une substance ubiquitaire ou quasi ubiquitaire de l'environnement, connue pour être un PE et dont les recherches comme potentiel PT étaient peu nombreuses mais suffisantes pour espérer obtenir des réponses aux tests de neurodéveloppements et valider ainsi le protocole. Après analyse des différentes substances chimiques et des études existantes à leur sujet, notre choix s'est porté sur le nonylphénol. Ce composé fait partie de la famille des alkylphénols (cf I.3.4.). Il est présent dans l'ensemble des compartiments environnementaux tels que l'eau, le sol ou l'air (Soares *et al.*, 2008; Vazquez-Duhalt *et al.*, 2005). Il est également classé comme PE du fait de sa capacité à perturber le système endocrinien notamment par sa capacité mimétique des œstrogènes (Jobling *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 1991; White *et al.*, 1994). Concernant son potentiel à perturber le système thyroïdien, peu d'études sur le mammifère ont été réalisées en ce sens. Elles mettent en évidence dans la plupart des cas la capacité du NP à perturber l'homéostasie thyroïdienne ainsi que de causer certains dommages sur la glande thyroïde (Kim *et al.*, 2002; Schmutzler *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2007). Quelques études se sont également intéressées aux effets du NP sur les fonctions neuromotrices et/ou cognitives du rat sans toutefois parvenir à relier les résultats obtenus à des perturbations de la fonction thyroïdienne (Flynn *et al.*, 2002; Jie *et al.*, 2010; Negishi *et al.*, 2004). Suite à cette sélection, deux doses d'exposition ont été retenues. Une dose à 50 mg/kg/jour qui correspond à la NOAEL (dose

sans effet adverse observable) chez le juvénile (United States Environmental Protection Agency (US EPA), 2009) et une dose de 200 mg/kg/jour légèrement inférieure à la dose maximum tolérée qui n'induit pas une toxicité excessive chez le juvénile (Nagao *et al.*, 2001).

Ce chapitre présente donc au travers d'un article, les différents résultats obtenus à l'issue des tests réalisés sur le rat. Durant cette expérimentation, nous avons administré par voie orale le 4-n-nonylphénol. Le gavage a été réalisé sur des femelles durant la gestation et la lactation. Un suivi individuel a été réalisé sur chaque femelle (prise de poids, condition de mise bas, nombre et état des petits). De même, après la mise bas un suivi des jeunes a également été entrepris (croissance, mortalité, ouverture des yeux, éruption des incisives, dosage des hormones). L'évaluation des effets sur le développement périnatal du système nerveux a été réalisée à l'aide de tests neurocomportementaux couramment utilisés : Fox battery, Homing test, Open Field et Morris water maze. Les tests de la « Fox's battery » ont permis d'évaluer l'activité sensorimotrice liée à la maturation physique et cérébrale du jeune rat (Fox, 1965; Heuland *et al.*, 2010). Le test du « Homing » a été utilisé afin d'évaluer le comportement exploratoire et les capacités locomotrices des jeunes rats (Scattoni *et al.*, 2005). L'« Open Field » a permis de mesurer le comportement exploratoire, l'activité locomotrice et la réponse émotionnelle liés à l'exposition à un nouvel environnement (Lubics *et al.*, 2005). Enfin le test du « Morris Water Maze » a été utilisé pour évaluer la capacité d'apprentissage, la spatialisation et la mémoire à court et long terme des rats (Morris, 1984).

IV.2. Article 3

➤ *Accepté dans le journal NeuroToxicology*

Neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol exposure during gestational and breastfeeding period on F1 rats

Mickaël Couderc,^{*,†,‡,1} Allison Gandar,^{*} Abderrahmane Kamari,^{*} Yohann Allain,[§] Aurore Zalouk-Vergnoux,^{*} Christine Herrenknecht,^{*} Bruno Le Bizec,[†] Catherine Mouneyrac,^{*,‡} and Laurence Poirier ^{*}

^{*} LUNAM Université, Université de Nantes, MMS, EA 2160, 9 rue Bias, Nantes, F-44035, France

[†] LUNAM Université, Oniris, Laboratoire d'Étude des Résidus et Contaminants dans les Aliments (LABERCA), Nantes, F-44307, France

[‡]LUNAM Université, Université Catholique de l'Ouest, 3, Place André Leroy, Angers, F-49000, France

[§] LUNAM Université, Université de Nantes, FED 4203, INSERM UMS 016, UMS C 3556, Structure Fédérative de Recherche François Bonamy, Nantes, F-44035, France

¹ To whom correspondence should be addressed at Laboratoire MMS, EA 2160, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 9 Rue Bias, 44035 Nantes, France. Tel.: +336-69-55-22-98. E-mail: mickael.couderc@univ-nantes.fr or mikacouderc@yahoo.fr

ABSTRACT

Nonylphenols (NP) are endocrine-disruptors known to be widely present in our environment. This study evaluated the effects of 4-n-NP on neurobehavioral development and memory capacity after perinatal exposure on the offspring rats. Dams were gavaged with 4-n-NP (0, 50 and 200 mg/kg/day) from gestational day 5 to postnatal day (PND) 21. Dams exposed to the higher dose lost weight during gestation and had a longer gestational duration. Juvenile female pups of the 200 mg 4-n-NP/kg/day group were lighter. Their thyroid somatic index (TSI) was also affected. For male pups, a decrease of TSI at weaning for the 200 mg 4-n-NP/kg/day group and an increase of GSI for the 50 mg 4-n-NP/kg/day group were observed. Physical maturation (incisives and eyes) were likewise affected. In open field (OF) tests, females were more active than males. In the first OF (PND 36), a treatment effect was observed only for males, particularly for the high dose group, which became as active as females. The second OF (PND 71) showed few differences between groups (treated *vs* control), the gender difference whatever the dose was not abolished. In the Morris water maze test, the study of the first 30 s showed that females (200 mg/kg/day) were mainly affected. Their performances were improved by 4-n-NP. These effects were particularly important for the first short-term memory test and observed to a lesser extent in the second evaluation of the long-term memory (PND 69). These data showed that perinatal 4-n-NP exposure induced behavioral and neuro-developmental impairments from 50 mg/kg/day.

KEY WORDS: 4-n-nonyphenol; offspring rats; neurobehavioral development; learning and memory capacity

1. INTRODUCTION

Nonylphenol (NP) is an alkylphenol (AP) classified as an endocrine disrupter due to its ability to mimic natural estrogens and disrupt the endocrine systems of higher organisms (Soares et al., 2008). It originates principally from the degradation of alkylphenolethoxylates (APE) which are widely used as industrial nonionic surfactants in detergents (80 % of the use), as emulsifying agents in latex paints and pesticide formulations, and in textile and personal-care product industries (Martínez-Zapata et al., 2013; Vazquez-Duhalt et al., 2005).

The term "nonylphenol" is a generic name corresponding to various chemical forms: 2, 3 or 4 nonylphenol. Due to the difference in branching of nonyl group and substitution position, there is theoretically 211 isomers of nonylphenol (Robinson et al., 1976). The main technical nonylphenol, generally called nonylphenol (NP) or 4-nonylphenol (4-NP) or p-nonylphenol (p-NP), corresponds to complex mixtures of para-substituted isomers where the chain alkylated can be in linear or ramified form. The para-substituted linear form was identified by 4-n-NP.

The estrogenic properties of p-alkylated phenolic compounds were recognized as early as 1938 (Dodds et al., 1938). These estrogenic activities have been demonstrated only since the 90s both *in vitro* (Soto et al., 1991) and *in vivo* (Jobling et al., 1996). NP was found to mimic 17 β -oestradiol by competing for the binding site of the estrogen receptor, due to its structural similarity (White et al., 1994). NP and octylphenol (OP) are also considered to have antiandrogenic activity which affects aromatase activity and function of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) (Bonfeld-Jørgensen et al., 2007; Lee et al., 2003). The para-position of the phenolic OH-group and the branched aliphatic side chain appear to be determinant to exhibit endocrine activity (Tabira et al., 1999).

Recent studies have shown the presence of NP in different environmental compartments such as river water, sediments, soil, and atmosphere as well as in biosphere (Soares et al., 2008; Vazquez-Duhalt et al., 2005). Humans may be exposed to NP and OP *via* a variety of daily activities. In particular, the leaching and contamination of NP from food wrapping films, water and food-contacting plastics, toys, foods and personal care products have been extensively studied during the last decade (Chang et al., 2012; Kawamura, 2010; Soares et al., 2008). Assessment of human exposure levels are available for several sources including diet (0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$), food containers (2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) and environmental sources (5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (Bolt et al., 2001; European Union, 2002). The human impregnation was evidenced by several

authors. Calafat et al. (2005) detected 4-n-NP in 51 % of the urine samples examined ($\geq 0.1 \mu\text{g/L}$) in a human reference population in the United States. Kawaguchi et al. (2004) measured concentrations of NP around 0.2 - 0.3 ng/mL in human (Japanese) plasma samples and ranging from 0.62 to 1.95 ng/mL in urine samples. Ademollo et al. (2008) reported a NP concentration from 16 to 56 ng/mL in breast milk collected in Italian women.

NP has been reported to induce various other adverse toxic effects on reproductive, immune, digestive, hemopoietic functions and central nervous system (CNS) (Jie et al., 2013a). The endocrine system is in close interaction with the CNS. The CNS development is directly regulated by endogenous hormones and also indirectly by hormonally regulated events occurring during early development (Jie et al., 2013a). Neurotoxic properties of NP have been shown on F1 generation rodents. Negishi et al. (2004) showed irreversible loss of capacity to react to behavioral stimuli for a 0.1 mg/kg/day dose on rats. In a recent study using Sprague Dawley rats exposed to 200 mg/kg/day NP dose during a placental critical period for the CNS development, Jie et al. (2010) noted learning and memory capacity and neurobehavioral alterations.

The potential toxicity of NP has not been completely characterized yet. Especially limited is the information concerning neurobehavioral effects of NP in offspring rodents after subchronic or chronic exposure. The aim of the present study was to assess the effects of NP on F1 generation rats after prenatal and breastfeeding exposure to this pollutant. Moderate and high doses of 4-n-NP (50-200 mg/kg bw/day) were used to evaluate whether chronic exposure would lead to developmental and behavioral alterations in offspring. The lower dose (50 mg/kg/day) is included in the range of developmental rat No Observed Adverse Effect Level (NOAEL; 43-64 mg/kg/day) for offspring (United States Environmental Protection Agency (US EPA), 2009). The highest dose (200 mg/kg/day) is close to the maximum tolerated dose which will not induce excessive offspring toxicity (Nagao *et al.*, 2001). These doses were higher than human exposure estimates but their use provided essential information on the adverse effects of NP on mammal development for risk assessment.

In order to cover a wide critical period for placental and postnatal developments of pups, in particular concerning neurobehavioral development, exposure was conducted during 39 days starting from gestational day 5 (GD 5) to the postnatal day 21 (PND 21). The detection of the potential alterations was performed by a battery of tests *i.e.* Fox battery, homing test, open field test and Morris water maze test. These last two tests were performed two times, with

pubertal pups and then young adults, to estimate the capacity of recovery from developmental defects following exposure to 4-n-NP. Male and female offspring rats were analyzed separately to measure the treatment effect; the gender difference was also investigated to determine possible consequences on sex differentiation.

2. MATERIALS AND METHODS

Test substances

The test substance 4 n-nonylphenol (4-n-NP) (>98 %, CAS. 104-40-5, Alfa Caesar) was purchased from Interchim. The substance was dissolved in corn oil (CAS. 8001-30-7, Sigma Aldrich).

Animals and Treatment

In this study, all experiments were performed in accordance with the recommendations of the European Communities Council Directive (86/609/EEC), the French laws and the guide for Care and Use of Laboratory Animals. The Structure Fédérative de Recherche François Bonamy has received French legal approval for experiments on living vertebrate animals (Arrêté préfectoral #C 44 015 dated October 2003). Animal experimentation conducted in this study was authorized by the French Direction of Veterinary Services (#A44).

Twenty four female Sprague Dawley rats (RjHan:SD) at day 3 of pregnancy, were purchased from specialized breeder Janvier (Le Genest Saint Isle, France). The day of arrival, females were randomly distributed by pairs in three groups and housed in semitransparent polycarbonate cages. Animals were maintained under controlled room temperature ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), relative humidity (30-70 %) and light-dark cycle (12:12). Food (Special Diets Service 841201 EXT.M20) and water were available *ad libitum*.

Two days after arrival, corresponding at gestational day (GD) 5, females were weighed (279 ± 17 g) and identified by ear tag identification (Harvard Apparatus). From that day until the end of lactation, corresponding to post natal day 21 (PND 21), females were gavaged daily at the same time with 0 (control), 50 or 200 mg of 4-n-nonylphenol/kg bw. The dose administered was adjusted daily in function of the weight of the animal. For the control group, force-feeding was realized under the same conditions (2 ml/kg bw/day) as exposed animals but the solution of 4-n-NP was replaced by not spiked oil corn.

Delivery, weaning and postnatal development

At GD 20, females were isolated and placed in individual cages until the end of lactation.

The day of delivery (PND 0), the number, mortality of pups and the percentage of males and females (female/male sex ratio) were registered for each mother. The reproduction success (RS) was calculated as follows:

$$RS (\%) = \frac{\text{Total number of birth pups} - (\text{number of still birth} + \text{number of dead pups during PND 0 - 2})}{\text{Total number of birth pups}}$$

In the following days (PND 2), pups were sexed and the number of pups was adjusted to 3 males and 3 females per dam. All other pups were weighed and euthanized. The pups were weighed daily between PND 2 to PND 21, then every three days until PND 41 and once a week until PND 71.

At PND 22, one female and one male pup were randomly selected from each litter, anesthetized (isoflurane (Abbott, Rungis, France) in air (1.5 %, 1 l/min)) and killed by intracardiac puncture. The dams were also euthanized this day.

At the end of the study, corresponding to young adult (PND 75), all F1 juveniles were weighed and sacrificed following the same method as used in PND 21.

Autopsy and organ samples

All animals, except pups sacrificed at PND 2, were anesthetized with isoflurane (concentration was adjusted to animals) and sacrificed by cardiac puncture. After euthanasia, autopsy was performed to determine whether macroscopic organ abnormalities were noticeable. Liver, gonads and muscle from the hind legs were removed, weighed and stored at -20°C. Weights of liver, thyroid and gonads were used to determine the hepato-somatic index (HSI), the thyroid-somatic index (TSI) and the gonado-somatic index (GSI), respectively. No autopsies and organ harvesting were performed on pups sacrificed at PND 2.

Examination of physical and neurobehavioral development (PNDs 2–21)

Animals were tested for physical maturation, neurological reflexes and motor coordination, as described earlier by Fox et al. (1965) in the Fox's battery with some adaptations. These tests were performed daily from PND 2 to PND 21.

Physical maturation

The maturation assessment of physical characteristics was performed daily on all pups. Day of appearance of each of the following parameters was noted: opening eyes, eruption of upper and lower incisors, and the auditory startle which corresponds to the first response to a clapping sound.

Neurological reflexes and motor coordination

At PND 2, two males and two females were randomly chosen per litter. The pups were differentiated using a methylene blue marking until their ears were sufficiently large to apply ear tags.

The tests were carried out at regular hours every day, taking care to alternate groups (control, 50 mg/kg and 200 mg/kg). Pups were removed from their litter for testing and then returned to their cage with their mother and brothers / sisters.

Limb grasping

The fore- or hind limbs were stroked with a thin rod. The day when the pup grasped the rod was noted.

Crossed extensor reflex

When the left hind paw of the animal was trapped, an extension of the right hind paw was observed corresponding to the crossed extension reflex. The day of the disappearance of this reflex was recorded.

Gait

The young rat was dropped off in the center of a circle 13 cm in diameter on a polycarbonate plate. When the animal had its forelimbs outside the circle, the test was considered successful and it was considered to be negative when the animal didn't leave the circle for 30 s. This test

was conducted daily from PND 2 to PND 19. The first successful day and the time necessary to leave the circle were recorded.

Negative geotaxis

The pup was placed head pointing down on a 20° inclined board. The rear paws were placed in the middle of the 30 cm long board. The day when the animal turned around and the time required to climb the inclined board were recorded. If the rat did not succeed this task (turning and climbing) during 60 s of observation, the test was considered negative. The test was carried out daily from PND 4 to PND 16.

Behavioral experiments

Homing

Homing test evaluated exploratory behavior and locomotor ability of young pups. This test exploited moreover the strong tendency of the immature neonate to maintain body contact with its mother and siblings, which required intact sensory, olfactory, motor and ultrasonic capabilities. The experimentation was done according to the method described by Šlamberová et al. (2006) with minor modifications. It was performed on PND 14. One male and one female from each litter were randomly selected and were used for other behavioral tests and neurocognitive development. The apparatus consisted of a polycarbonate cage (46 x 29 x 15 cm) divided in 2 compartments. One containing nest bedding and the other one divided in 4 equal in size zones (10 x 15 cm). Litter was removed from the cage from where the pup came and then placed in compartment "litter", separated from the rest of the arena by a removable panel. Before starting the test, an acclimatization period of 2 min was performed, during which the young rat was placed in the litter box area. For the test, the panel was removed and the pup was placed in the opposite zone from the litter. A video recording was performed for 120 s, beyond this time if the rat did not reach the litter box, the test was considered negative.

The video tracking system (Ethovision XT, Noldus) tracked: latency (time to join the litter zone), number of zones visited, immobility, mobility, high mobility and movements. The latency is mainly linked to the olfactory orientation, especially in this study because pups tested had eyes closed.

Open field (OF)

Locomotor activity, exploratory behavior and emotional responses following exposure to a novel environment were assessed using the open field test at PND 36 and PND 71. The rats used were the same as those used for the homing test. The open field was a cubic box (70 x 70 x 70 cm) on an opaque polycarbonate plate. The floor was divided into nine areas. The area in the middle (46 x 46 cm) was considered the center of the box and the other eight areas surrounding were designated as borders (4 corners 12 x 12 cm, 4 middle borders 12 x 46 cm). Animals were placed individually in the center, always with the head in the same direction and were recorded during 10 min. The following parameters were measured with the video tracking system (Ethovision XT, Noldus): number of zones visited, immobility, mobility, high mobility, movement, velocity, distance traveled, time in the center area and time in the border areas (thigmotaxis). During the observation period, the number of droppings (faeces), rearing/leaning (the number of times the rat stood on its hind legs / placed one or two forelimbs on the wall of the arena) and grooming (the number of times the rat washed itself) was also noted.

Learning and memory tests

Morris Water Maze (MWM)

The Morris Water Maze test was used to assess spatial learning. The protocol was slightly modified according to Morris et al. (1984). It was performed twice at the age of PNDs 26-34 and PNDs 61-69 to determine the evolution with time of these capabilities. The two rats selected for this test were the same as those used for the homing and open field tests. The MWM consisted of a circular pool 170 cm in diameter and 60 cm in height. Water was renewed daily and the water level in the pool was set at 30 cm. The water temperature was adjusted according to the age of rats: 27°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) for PNDs 26-34 and 24°C ($\pm 0.5^\circ\text{C}$) for PNDs 61-69. The pool was divided into four equal quadrants or zones numbered 1 to 4 in the clockwise direction (see Supplementary data: Figure I). In the middle of quadrant 4 a clear platform (13 cm x 13 cm) was installed 2 cm below the water level. Around this platform a zone called platform zone was defined. Visual markers were placed on the walls around the pool to allow the rat to orient itself during the test.

The test was conducted in two stages: assessment of short-term memory (STM) and long-term memory (LTM). Each stage consisted of a training period which allowed the assessment of the capacity of spatial learning, followed by the memory test.

Training period for the short-term memory test extended from PNDs 26-29. It consisted of three trials per day and per rat, with a maximum duration of 60 s per trial. Before each trial, the rat was placed on the submerged platform during 15 s and then it was placed in the pool. Each trial was done starting from a different quadrant of the platform and each rat did a trial every 25-30 min. If the rat did not find the platform in the allotted time, the test was considered negative. In this case, the rat was guided to the platform and was only out of the water when he was on it. In this way, search behavior and storing the position of the platform in the pool was strengthened.

On the fourth day of training, 25-30 min after the last training, the platform was removed and the rat was placed during 90 s in the water in a front quadrant where the platform was located. This last trial of the first stage was used to assess the short-term memory.

Training for long-term memory (PNDs 30-33 and PNDs 65-68) followed the same method as the training for the short-term memory but the trial to assess the memory was realized 24 hours after the last trial of the fourth day of training (PND 34 and PND 69).

The video tracking system (Ethovision XT, Noldus) was used to track “latency to first” (time to join the platform or the platform zone the first time), total distance moved, number of zones visited and two parameters of spatial orientation such as meander and heading to point (HTP). Meander measured the change in direction of movement of a rodent relative to the distance moved by that rodent. Heading to point was used to determine the heading angle error *i.e.* the deviation from a direct line from starting point to center of the platform.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed with a data analysis software system STATISTICA 7 (StatSoft, Inc.). All analyses were conducted using the litter as the unit of analysis. To evaluate effects, each dose group (50 mg/kg/day and 200 mg/kg/day) was compared to the control group. The gender differences were analyzed per treatment group.

For all data, factorial analyses of variance (ANOVAs) were used to determine the effects of the treatment and the gender as well as the interaction between these two factors. The

conditions for applying parametric tests, *i.e.* homogeneity of variance and normality, were verified using Bartlett and Shapiro tests respectively. Otherwise, Kruskal-Wallis ANOVA (KW) test was performed. Appropriate post hoc tests, Least Significant Difference Fisher (LSD Fisher) or Multiple Comparisons of P-values (MCP), followed when there was significant $p < 0.05$.

Concerning the homing test, a Cox-Mantel model based on the Kaplan-Meier method of estimation of censored data was used to compare the latency between the different exposure conditions. In the case of MWM trainings, a general linear model (GLM) with repetition was conducted to evaluate the repeated measures.

3. RESULTS

Effects on pregnancy

General indices (total weight of dams during gestation: A, and lactation: B, gonado-somatic index: C, hepato-somatic index: D) of the three groups of dams: control (0 mg/kg/day), 50 (50 mg/kg/day) and 200 (200 mg/kg/day) are illustrated in Figure 1. Daily gavages with 4-n-NP from GD 5 until day 21 of lactation adversely affected the dams during pregnancy, significantly at the highest dose tested. A significant ($p < 0.05$) effect of 4-n-NP exposure was observed on relative weight gain of females exposed to the highest dose of 4-n-NP (200 mg/kg/day). They lost weight during gestation whereas the total weight of individuals from control group and middle dose group increased ($p < 0.001$). This weight loss occurred in the first days of exposure (GDs 5 to 7). This effect was no longer observed during the two following gestational weeks. Overall, during lactation, no significant effect on weight gain was depicted ($p > 0.05$). However, females from the group exposed to the highest 4-n-NP dose lost significantly less weight compared to the control during the third week of lactation ($p < 0.05$).

GSI and HSI of females exposed to 200 mg/kg/day of 4-n-NP tended to increase. However this trend was not significant compared to other groups ($p > 0.05$).

The average gestational duration was 21.75 ± 0.46 days for control group. The exposure to 4-n-NP (highest dose) led to a significant increase of this duration (22.25 ± 0.46 days; $p < 0.01$). The reproduction success also tended to decrease (not significantly) compared to controls

(100 ± 0.00 , 99.04 ± 2.72 and 86.06 ± 26.00 for controls, 50 and 200 groups respectively). Female/male sex-ratio (control group: 1.46 ± 1.12 ; 50 group: 1.61 ± 1.96 ; 200 group: 1.65 ± 1.44) and total number of pups (control group: 12.88 ± 2.10 ; 50 group: 11.38 ± 3.02 ; 200 group: 12.38 ± 3.11) did not significantly differ between the treatment groups.

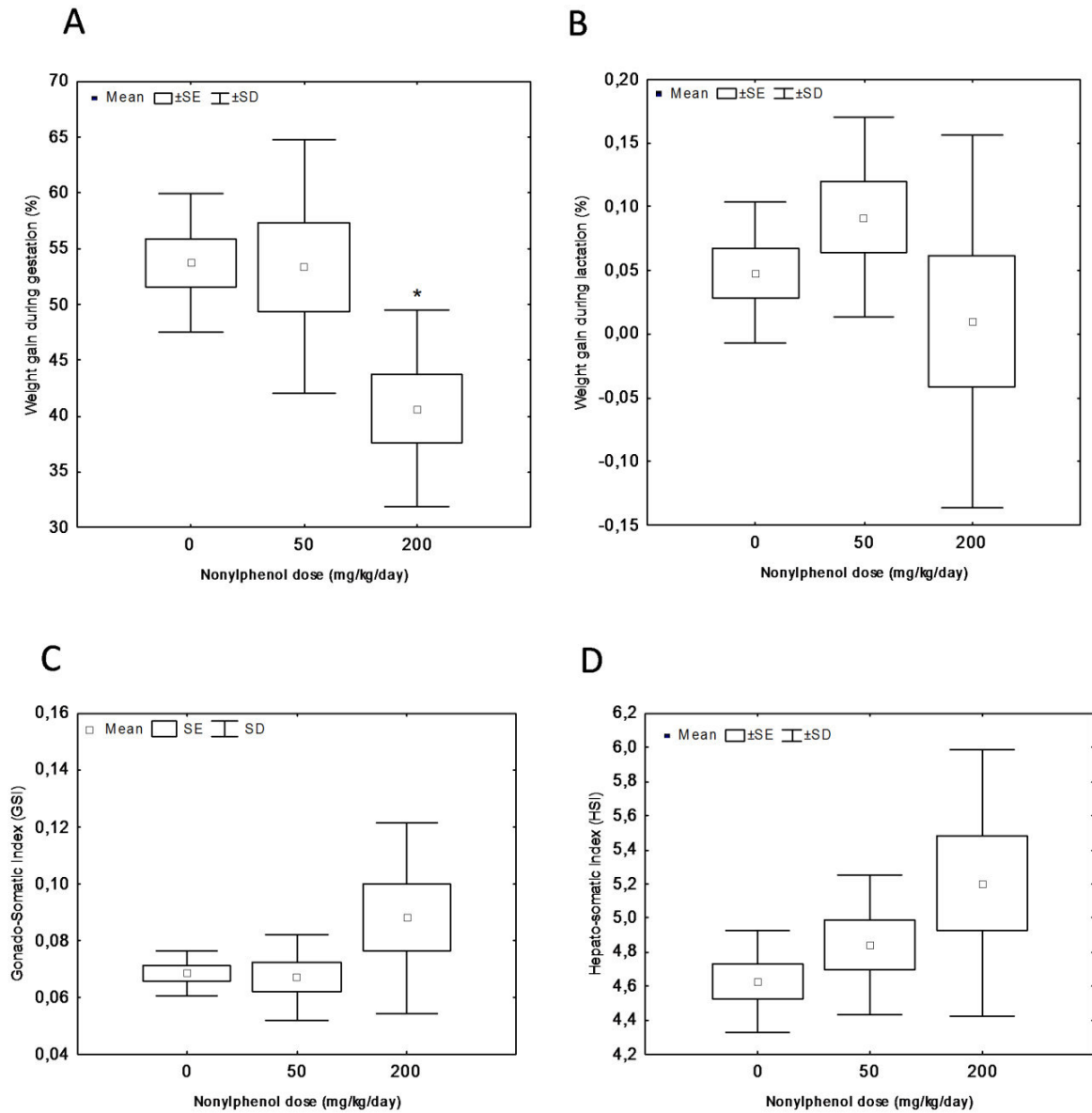


Figure 1. General morphological indices for the three groups of dams: 0 mg/kg/day (control), 50 mg/kg/day (50) and 200 mg/kg/day (200). Weight gain during gestation (A) and lactation (B). Gonado-somatic (C) and hepato-somatic (D) indices.

Values are expressed as mean \pm standard error and \pm standard deviation. (n=8 per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared with control.

Somatic and neurobehavioral development of F1 generation

Growth

General indices of pup growth were presented in Figure 2. Concerning females, body weight was affected by 4-n-NP treatment during the breastfeeding period ($p < 0.05$). In particular, 200 mg/kg/day female treated pups were lighter than the controls and the other treated group ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ at PND 2 and PND 21 respectively). The weight gain was however not influenced by 4-n-NP exposure during this period. On the other hand, after weaning, the weight gain decreased in treated groups, significantly only for 50 mg/kg/day group ($p < 0.01$).

Concerning males, no significant effect of the different treatments was observed on body weight from PNDs 2 to 75.

No significant differences between male and female pup growth appeared during breastfeeding but the weight gain of males was significantly higher than that of females from weaning to PND 75 (young adults) ($p < 0.001$).

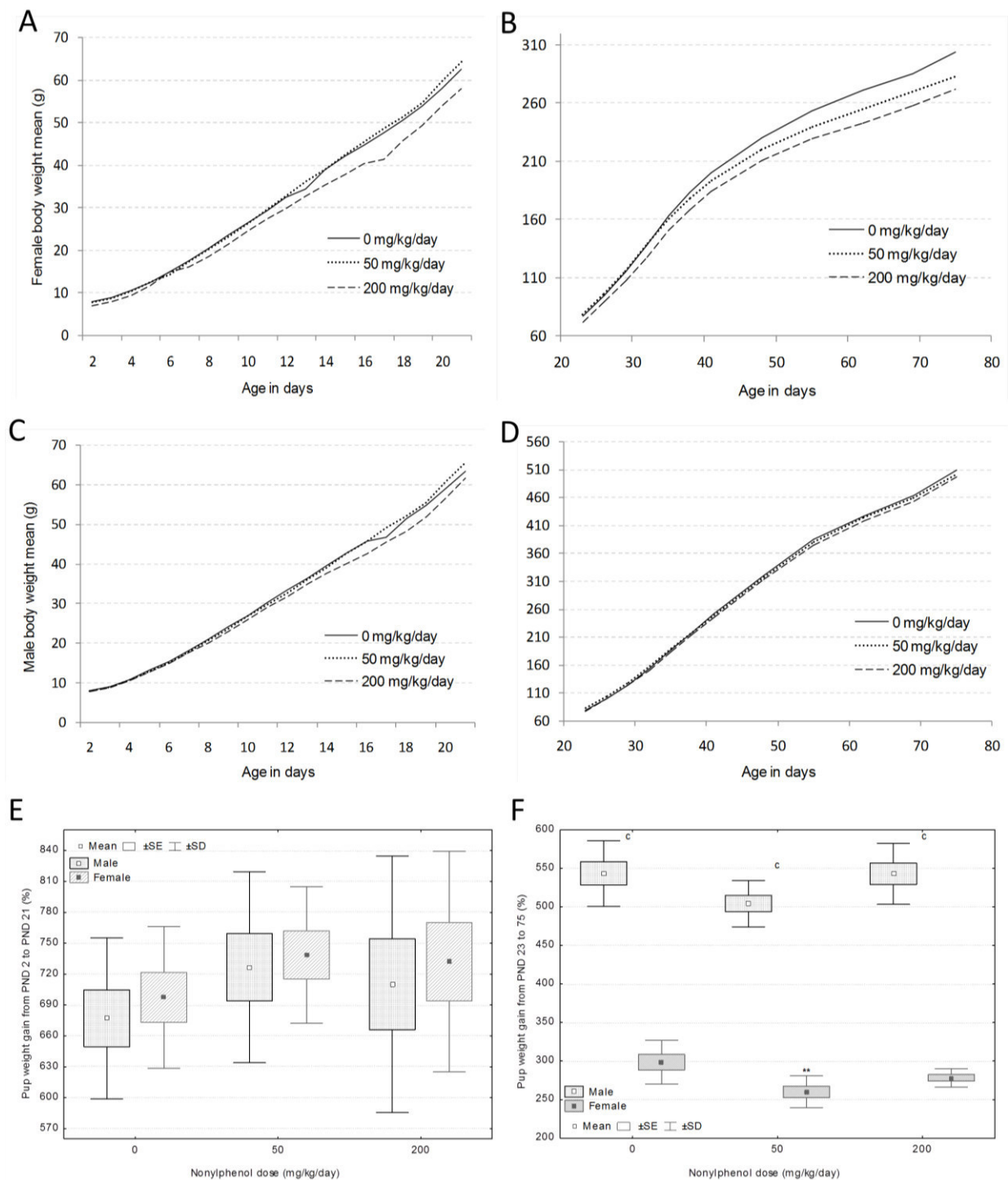


Figure 2. General indices of pup growth. Evolution of mean female body weight during the lactation (PND 2 to PND 21) (A) and throughout the PND 23–75 period (B). Evolution of mean male body weight during the lactation (C) and from PND 23 to PND 75 (D). Pup weight gain for male (in black) and female (in grey) during the lactation (E) and from PND 23 to PND 75 (F). The weights were measured daily for lactation and weekly for the PND 23–75 period. Weight gain values are expressed as mean \pm standard error and \pm standard deviation. (n=8 per sex group). * p <0.05, ** p <0.01 and *** p <0.001 compared with control. Letter indicated gender differences by treatment groups: ^a p <0.05, ^b p <0.01 and ^c p <0.001.

Somatic indices (TSI, GSI, HIS)

The Figure 3 presented the evolution of biological indices according to treatment and age.

4-n-NP led to a significant TSI decrease ranging from 39 to 80 % for weaning female pups and female young adults. At PND 21 (end of breastfeeding), this effect was significant only for female offspring exposed to the highest dose ($p < 0.01$) but at PND 75 the effect was significant in both treated females. No significant effect was observed on HSI and GSI at either age.

Concerning males, TSI tended also to decrease (from 39 % for 50 group to 84 % for 200 group compared to controls) during weaning. This decrease was only significant for the 200 group at PND 21 ($p < 0.01$). An effect of treatment was observed on GSI at weaning; pups from 50 group having a greater GSI (+41%) than controls and 200 group ($p < 0.05$). No effect of exposure was observed on HSI, whatever the age ($p > 0.05$).

Regarding the gender differences, the TSI of females was significantly higher than those of males in controls and 200 group only at PND 75 ($p < 0.05$). At the same time, the HSI was lower for females for the same exposure condition (0 and 200) ($p < 0.05$). The GSI of males was significantly higher than those of females regardless of age and treatment.

Detailed information about organ and body weights is listed in Table I (Supplementary data)

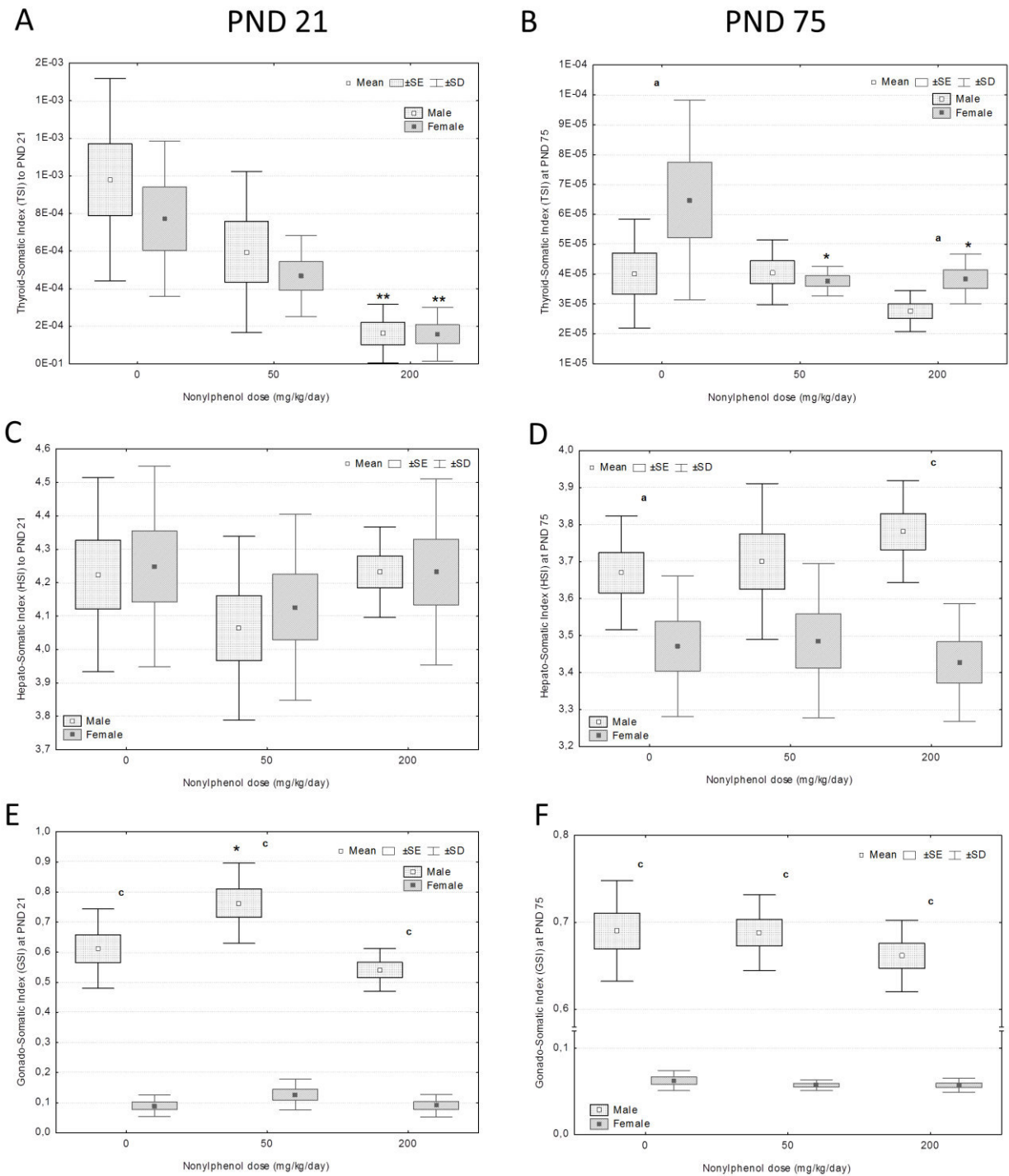


Figure 3. General biological indices of pups. Thyroid-somatic index (TSI) for male and female measured at weaning (PND 21) (A) and PND 75 (B). Hepato-somatic index (HSI) for male and female measured at PND 21 (C) and PND 75 (D). Gonado-somatic index (GSI) for male and female at PND 21 (E) and PND 75 (F). Index values are expressed as mean \pm standard error and \pm standard deviation. (n = 8 per sex and treatment group to PND 21 and to PND 75). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 compared with control. Letter indicated gender differences by treatment groups: ^a p<0.05, ^b p<0.01 and ^c p<0.001.

Physical maturation and sensorimotor development

The study of the sensorimotor development and physical maturation parameters showed no significant effect of sex and interaction of sex and treatment ($p > 0.05$). For this reason, the results of males and females were combined to study the effect of treatment. Regarding these parameters, no data on sensorimotor development allowed to evidence alterations in the ontogenic profile of the 4-n-NP perinatally-exposed rats (Table 1). Significant effects were noticed on eyes opening and superior incisor eruption for pups perinatally-exposed to 200 mg/kg/day ($p < 0.05$). Inferior incisors tended to erupt also earlier ($p < 0.1$). All responses based on sensorimotor coordination were not affected by treatment. No significant effect of treatment was observed on auditory startle test.

Table 1

Day of appearance on pups of physical and sensorimotor signs in control group and in the two nonylphenol exposed groups (50 mg/kg/day and 200 mg/kg/day).

		Days of appearance		
		0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day
<i>Physical maturation</i>				
	Upper incisors eruption	9.6 ± 0.4	9.3 ± 0.3	9.0 ± 0.5*
	Lower incisors eruption	9.5 ± 0.4	9.5 ± 0.4	9.1 ± 0.7
	Eye opening	15.6 ± 0.6	15.4 ± 0.4	14.9 ± 0.7*
	Auditory startle	12.5 ± 0.4	12.2 ± 0.3	12.6 ± 0.5
<i>Sensorimotor development</i>				
	Forelimb grasp	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.2	3.7 ± 0.8
	Hindlimb grasp	6.3 ± 0.9	5.8 ± 0.7	6.5 ± 1.5
	Crossed extensor reflex	14.6 ± 0.5	14.6 ± 0.4	14.2 ± 0.7
	Negative geotaxis	5.5 ± 0.5	5.6 ± 0.7	6.0 ± 0.5
	Negative geotaxis + ascent	12.9 ± 1.2	12.7 ± 0.9	13.2 ± 1.1
	Gait	6.6 ± 0.6	6.5 ± 0.7	6.7 ± 0.8

Days of appearance values are expressed as mean ± standard deviation. (n = 8 per treatment group). *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 compared with control.

Behavioral tests

- Homing test

No significant differences between control and treated groups were observed in homing performance assessed on PND 14 for mobility parameters, distance travelled, latency, velocity, linearity of the travel and the number of zones visited (data not shown).

- Open field test

During the open field test, the locomotor activity and the exploratory behavior of pups were investigated at PNDs 36 and 71 (Table 2 A and B).

On PND 36, no significant differences were observed between the female groups for all measured behavioral/activity parameters ($p > 0.05$, Table 2 A). Males, particularly those of the highest exposed group (200 mg/kg/day) were more active compared with controls. For this group, a significant increase was shown for the total distance moved, the velocity, the cumulative time of mobility, high mobility and movement, the frequency of mobility and immobility periods and for rearing/leaning ($p < 0.05$). A significant decrease was observed for two parameters, the frequency of immobility and the cumulative time without movements ($p < 0.05$). For the males exposed to the lowest dose (50 mg/kg/day), the same differences were observed for the frequency of immobility and mobility and for the durations of movement and no movement periods. No significant effects were observed on the number of visited zones, the time spent in the central and border zones (thigmotaxis) and on stress parameter (faeces).

For the majority of the measured parameters, a gender difference has been found in control group, female being more active ($p < 0.05$). This difference decreased significantly according to the 4-n-NP dose of exposure. No differences between males and females were observed for pups exposed to 200 mg/kg/day ($p > 0.05$).

At PND 71, only the high mobility duration and frequency were increased for the 50 mg/day/kg exposed male group ($p < 0.05$, Table 2 B). The females of the 200 mg/day/kg exposed group presented a higher frequency of high mobility period compared to control group ($p < 0.05$). Regarding gender influence, the differences observed between males and females were constant whatever the exposure condition, except for the frequencies in borders and center of the arena ($p > 0.05$). In all cases, females presented higher activities than males.

Table 2

Open-field tests data at PND 36 (A) and PND 71 (B)

(A)	MALE			FEMALE			
	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	
Total distance moved (cm)	4246 ± 629	4832 ± 582	5147 ± 586 **	5619 ± 684^c	5825 ± 625^b	5557 ± 946	
Mean velocity (cm/s)	7.08 ± 1.05	8.06 ± 0.97	8.59 ± 0.98 **	9.40 ± 1.14^c	9.70 ± 1.04^b	9.27 ± 1.58	
Mean distance to wall (cm)	14.7 ± 2.2	14.9 ± 1.0	15.6 ± 1.1	15.4 ± 0.6	15.1 ± 1.3	15.0 ± 1.0	
Visited zones number	29.9 ± 20.0	35.4 ± 15.2	43.8 ± 15.5	54.1 ± 12.5^a	49.5 ± 18.0	52.3 ± 19.5	
In zone	In border duration (s)	519 ± 79	512 ± 26	492 ± 42	500 ± 18^a	500 ± 40	511 ± 31
	In border frequency	37.3 ± 20.8	42.6 ± 10	50.4 ± 14.8	54.5 ± 15.2	46.1 ± 15.6	47.0 ± 11.2
	In center duration (s)	81.5 ± 79.0	88.0 ± 26.5	107 ± 42.57	99.8 ± 18.1^a	100 ± 41	88.3 ± 31.2
	In center frequency	37.0 ± 20.6	42.9 ± 11.0	50.3 ± 15.1	54.6 ± 15.4	46.0 ± 15.6	47.0 ± 11.2
Mobility	Immobile duration (s)	466 ± 29	442 ± 27	417 ± 30 **	408 ± 34^b	393 ± 26^b	398 ± 45
	Immobile frequency	360 ± 63	437 ± 59 *	466 ± 45 **	438 ± 69^a	500 ± 56^a	460 ± 70
	Mobile duration (s)	132 ± 30	156 ± 26	181 ± 29 **	189 ± 31^b	204 ± 26^b	198 ± 43
	Mobile frequency	365 ± 64	445 ± 66 *	483 ± 53 ***	458 ± 86^a	519 ± 56^a	487 ± 84
	Highly mobile duration (s)	0.93 ± 0.88	1.35 ± 1.12	2.27 ± 1.65 *	3.00 ± 2.81	3.10 ± 1.54^a	4.21 ± 2.58
	Highly mobile frequency	7.50 ± 5.18	12.9 ± 10.5	24.4 ± 18.2	25.5 ± 23.8	25.9 ± 10.3^a	38.0 ± 25.4
Movement	Moving duration (s)	335 ± 40	393 ± 29 **	402 ± 24 ***	400 ± 34^b	427 ± 23^a	400 ± 45
	Not moving duration (s)	265 ± 40	206 ± 30 **	198 ± 24 ***	200 ± 34^c	173 ± 23^a	200 ± 45
Stress	Number of faeces	2.25 ± 2.55	1.50 ± 1.93	2.25 ± 2.43	2.38 ± 2.67	1.50 ± 2.14	1.88 ± 2.75
Rearing/leaning		49.1 ± 16.7	63.4 ± 17.0	69.6 ± 13.3 *	72.9 ± 16.9^a	70.3 ± 16.9	72.1 ± 20.8
Grooming		3.63 ± 1.60	2.75 ± 1.39	4.25 ± 2.05	3.25 ± 1.67	4.00 ± 3.51	3.50 ± 1.41

(B)	MALE			FEMALE		
	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day
Total distance moved (cm)	4035 ± 927	4283 ± 859	4523 ± 890	5962 ± 1013^b	5931 ± 713^c	5875 ± 586^b
Mean velocity (cm/s)	6.73 ± 1.55	7.14 ± 1.43	7.54 ± 1.48	9.94 ± 1.69^b	9.89 ± 1.19^c	9.80 ± 0.97^b
Mean distance to wall (cm)	9.02 ± 2.22	9.73 ± 1.31	8.98 ± 1.06	9.60 ± 0.78	9.48 ± 0.91	9.28 ± 0.64
Visited zones number	27.5 ± 18.0	34.1 ± 18.8	31.1 ± 19.2	58.9 ± 11.5^c	66.5 ± 14.3^b	65.0 ± 18.1^b
In zone	In border duration (s)	139 ± 95	186 ± 64	144 ± 52	172 ± 39	174 ± 37
	In border frequency	44.6 ± 17.8	58.6 ± 18.8	59.6 ± 14.4	70.5 ± 12.3^b	59.5 ± 11.1
	In center duration (s)	461 ± 95	414 ± 64	456 ± 51	428 ± 39	426 ± 37
	In center frequency	44.6 ± 17.5	59.4 ± 18.7	59.9 ± 14.6	71.3 ± 12.5^b	60.0 ± 11.1
Mobility	Immobile duration (s)	409 ± 38	404 ± 28	393 ± 25	363 ± 29^a	358 ± 15^b
	Immobile frequency	1184 ± 145	1235 ± 95	1243 ± 71	1206 ± 83	1238 ± 68
	Mobile duration (s)	190 ± 38	193 ± 27	204 ± 24	228 ± 28^a	232 ± 14^b
	Mobile frequency	1180 ± 144	1224 ± 93	1234 ± 68	1204 ± 71	1224 ± 70
	Highly mobile duration (s)	1.15 ± 0.74	3.53 ± 3.24[*]	3.22 ± 3.20	8.87 ± 2.90^c	10.2 ± 3.3^b
	Highly mobile frequency	9.25 ± 4.98	31.8 ± 27.2[*]	31.9 ± 30.4	80.8 ± 24.5^c	96.9 ± 27.3^b
Movement	Moving duration (s)	191 ± 39	196 ± 28	207 ± 25	237 ± 29^a	242 ± 15^b
	Not moving duration (s)	409 ± 38	404 ± 28	393 ± 25	363 ± 29^a	358 ± 15^b
Stress	Number of faeces	1.13 ± 2.10	0.88 ± 2.47	0.50 ± 1.07	0.50 ± 1.41	0.00 ± 0.00
Rearing/leaning		57.1 ± 12.6	67.4 ± 20.0	73.8 ± 22.2	93.0 ± 14.7^c	91.4 ± 15.0^a
Grooming		3.88 ± 2.47	3.50 ± 2.20	5.75 ± 2.19	2.88 ± 1.46	3.38 ± 1.69

Values are mean ± SD; n =8. *p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 significantly different compared with control. Letter indicated gender differences by treatment groups (control, 50 and 200 mg/kg/day) : ^a p<0.05, ^b p<0.01 and ^c p<0.001.

Learning and memory tests

Short- and long-term memories have been investigated using a Morris Water Maze test. This test, including training and memory test steps, was performed on pups during two periods: between PNDs 26 to 34 and PNDs 61 to 69. Results of both training and memory test were illustrated in Tables 3 to 6.

Morris Water Maze 1 (PNDs 26-34)

- Training periods

During the first training period (PNDs 26-29), no significant effect of treatment, sex and interaction treatment*sex were observed on all measured parameters (GLM with repetition, $p>0.05$) (Table 3). On the other hand, the majority of parameters (latency, total distance, number of visited zones, HTP) were significantly influenced by the day, the trial and the interaction day*trial ($p<0.01$). The parameter meander only decreased significantly in function of the day ($p<0.001$).

The second training period (PNDs 30-33) presented several similarities with the first training period (Table 3). No significant effect of treatment, sex and interaction treatment*sex were observed on measured parameters ($p>0.05$). Only the day, the trial and the interaction day*trial influenced the number of visited zones, the latency and the total distance ($p<0.01$). No significant effects were showed on meander and HTP parameters ($p>0.05$).

Table 3

Training periods analysis table by Generalized Linear Model (GLM) with repetition for the first Morris Water Maze.

		Latency	Total distance	Number of visited zones	Meander	Heading To Point
Training PND 26-29	Treatment	0.572	0.948	0.923	0.582	0.778
	Sex	0.853	0.872	0.855	0.783	0.859
	Treatment*Sex	0.485	0.771	0.463	0.091	0.857
	Day	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	Trial	<0.001	<0.001	<0.001	0.514	<0.01
	Day*Trial	<0.01	<0.001	<0.001	0.391	<0.001
	Day*Trial*Treatment*Sex	0.747	0.658	0.090	0.384	0.628
Training PND 30-33	Treatment	0.207	0.146	0.177	0.445	0.445
	Sex	0.430	0.534	0.496	0.480	0.480
	Treatment*Sex	0.502	0.472	0.350	0.894	0.894
	Day	<0.001	<0.001	<0.01	0.186	0.186
	Trial	<0.001	<0.001	<0.001	0.347	0.347
	Day*Trial	<0.001	<0.001	<0.01	0.644	0.644
	Day*Trial*Treatment*Sex	0.557	0.527	0.390	0.879	0.879

Values presented are *p-value*. $p < 0.05$ in bold.

- Short- and long-term memory tests

Considering the whole time (90 s) of the short- and long-term memory tests, no effect of treatment and sex has been shown. To enhance the sensibility in the effect detection, the test duration has been fractioned into three periods of 30 s each. Effects of treatment and sex have been observed during the first thirty seconds (Table 4 A). Females exposed to 200 mg/kg/day showed better short-term memory performances than the control group. The distance to the platform was decreased ($p < 0.01$) and the time spent in the zone 4 and in the zone of the platform was significantly higher (respectively $p < 0.01$ and $p < 0.05$) compared to controls. Regarding the gender differences, the females were more distant from the platform zone in the control group ($p < 0.01$) and spent less time in zone 4 and in the platform zone ($p < 0.05$). These gender differences were not found for either groups of rats exposed to 4-n-NP (50 and 200 mg/kg/day). No effect of the 4-n-NP treatment was found during the two other periods (30-60 s and 60-90s).

During the first 30 s of the long-term memory test, no significant difference was observed for exposed males, whatever the dose tested, compared to the control group ($p > 0.05$, Table 4 B). For female pups, an increase of the average degree of the HTP parameter was found for the both doses tested ($p < 0.05$) and the females of the 50 mg/kg/day group visited more zones than control ($p < 0.05$). A gender difference has been also observed between control males and females on the HTP parameter, females showing a lower value ($p < 0.05$).

Table 4.

Morris Water Maze short-term memory (STM) (A) and long-term memory (LTM) (B) tests.

(A)	MALE			FEMALE		
	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day
Total distance moved (cm)	925 ± 151	917 ± 158	858 ± 115	941 ± 97	917 ± 131	917 ± 108
Total distance to zone platform (cm)	6222 ± 2657	6618 ± 1220	5975 ± 2097	7888 ± 1948^b	6262 ± 885	5404 ± 683^{**}
Number of visited zones	10.8 ± 3.0	11.5 ± 2.4	9.63 ± 1.60	11.3 ± 1.6	10.1 ± 3.0	9.88 ± 4.02
Velocity Mean cm/s	31.1 ± 5.1	30.8 ± 5.3	28.8 ± 3.9	31.6 ± 3.3	30.8 ± 4.4	30.8 ± 3.6
In zone						
In zone 4 duration (s)	14.0 ± 5.8	13.4 ± 3.0	15.2 ± 3.3	10.5 ± 4.2^a	13.1 ± 2.6	16.3 ± 2.8^{**}
In zone 4 latency to the first (s)	3.73 ± 5.62	3.25 ± 2.54	3.70 ± 2.34	6.40 ± 6.50	2.53 ± 2.19	3.83 ± 3.50
In zone platform duration (s)	3.17 ± 1.12	1.93 ± 0.94	2.78 ± 1.88	1.83 ± 1.07^a	2.13 ± 0.72	2.80 ± 0.78[*]
In zone platform latency to the first (s)	4.43 ± 2.86	4.95 ± 4.53	4.85 ± 2.52	9.75 ± 9.76	3.68 ± 2.33	5.73 ± 4.33
Mean meander (deg/cm)	7.20 ± 5.41	8.27 ± 5.80	10.6 ± 8.3	11.8 ± 13.7	7.22 ± 3.60	9.77 ± 10.66
Mean heading to point (deg)	110 ± 32	103 ± 20	93.4 ± 27.4	99.3 ± 30.8	100 ± 14	95.2 ± 20.6

(B)	MALE			FEMALE		
	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day
Total distance moved (cm)	932 ± 184	963 ± 69	913 ± 143	923 ± 91	997 ± 108	942 ± 148
Total distance to zone platform (cm)	7076 ± 2103	8253 ± 1828	7730 ± 1729	8456 ± 1625	6890 ± 1567	7708 ± 1962
Number of visited zones	11.0 ± 3.7	11.9 ± 2.4	10.5 ± 1.3	9.88 ± 1.25	12.3 ± 2.7 *	10.6 ± 2.6
Velocity Mean cm/s	31.3 ± 6.2	32.3 ± 2.3	30.7 ± 4.8	31.0 ± 3.1	33.5 ± 3.6	31.7 ± 5.0
In zone						
In zone 4 duration (s)	12.0 ± 3.7	10.6 ± 3.6	11.7 ± 3.8	10.2 ± 4.3	12.5 ± 3.4	9.63 ± 3.51
In zone 4 latency to the first (s)	2.90 ± 2.08	3.45 ± 2.66	3.95 ± 2.31	4.78 ± 2.54	3.18 ± 1.51	6.68 ± 7.22
In zone platform duration (s)	2.15 ± 0.98	1.70 ± 0.34	2.25 ± 1.27	1.77 ± 0.72	2.10 ± 1.13	1.63 ± 0.99
In zone platform latency to the first (s)	4.53 ± 2.93	4.25 ± 2.82	4.90 ± 2.75	5.60 ± 2.42	4.00 ± 1.80	7.90 ± 7.86
Mean meander (deg/cm)	10.6 ± 11.8	11.30 ± 7.20	8.33 ± 5.55	11.1 ± 6.9	7.08 ± 4.80	6.88 ± 5.48
Mean heading to point (deg)	100 ± 12	86.9 ± 19.2	92.0 ± 29.0	66.9 ± 31.8 ^a	97.1 ± 22.6 *	93.6 ± 14.0 *

The data were obtained during the first thirty seconds of these tests. The MWM STM was realized at PND 29 and the MWM LTM at PND 33. Values are mean ± SD; n = 8.

*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 significantly different compared with control. Letter indicated gender differences by treatment groups (control, 50 and 200 mg/kg/day) : ^a p<0.05, ^b p<0.01 and ^c p<0.001.

Morris Water Maze 2 (PNDs 61-69)

- Training periods

For the first training period (PNDs 61-64), no effect of treatment, sex and interaction sex*treatment were obtained (GLM with repetition, $p>0.05$) (Table 5). Effects of day, trial and interaction day*trial were established for the total distance, the latency and the number of zones visited ($p<0.05$). The parameters HTP and meander were influenced only by the day and the trial ($p<0.05$).

The training period prior to the long-term memory test showed different results (Table 5). Only the trial influenced the total distance moved and the number of visited zones ($p<0.05$).

- Short- and long-term memory tests

During the total time of the short-term memory test, no significant effect of the treatment was found (data not shown). Gender differences were depicted on the total distance moved and the velocity ($p<0.05$) in control and 50 mg/kg/day groups. In both cases, females traveled more distance and were faster than males. This difference was not found between males and females in the 200 mg/kg/day groups. Considering results obtained every 30 s, no effect of treatment was observed whatever the time (Table 6). From 0 to 30 s, the analysis of the gender influence in the same group showed that total distance moved and velocity were significantly higher for control and 200 mg/kg/day females ($p<0.05$) compared to males.

Regarding the long-term memory, no effect of treatment and sex was found, except for the 200 mg/kg/day females which reached the platform zone earlier than controls (control: 11.06 ± 11.54 s and 200 mg/kg/day: 3.20 ± 1.06 s) ($p<0.05$). Significant effects of treatment were noticed during the first 30 s of the test (Table 6). The 200 mg/kg/day exposed males presented a significantly lower value of meander parameter compared to controls ($p<0.05$). The females exposed to 4-n-NP (both doses) spent significantly more time in zone 4 and were closest to the platform zone ($p<0.05$). Moreover, females exposed to the highest dose spent significantly more time in the platform zone ($p<0.05$). Regarding the total distance moved and velocity, the 50 mg/kg/day female group moved less and slower than control females ($p<0.05$). No differences between male and female were found whatever the dose of exposure ($p>0.05$).

Table 5.

Training periods analysis table by Generalized Linear Model (GLM) with repetition for the second Morris Water Maze.

		Latency	Total distance	Number of visited zones	Meander	Heading To Point
Training PND 61-64	Treatment	0.327	0.241	0.321	0.322	0.684
	Sex	0.857	0.365	0.664	0.877	0.398
	Treatment*Sex	0.598	0.628	0.740	0.969	0.677
	Day	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.001
	Trial	<0.05	<0.01	<0.001	<0.01	<0.001
	Day*Trial	<0.001	<0.001	<0.001	0.107	0.585
	Day*Trial*Treatment*Sex	0.272	0.503	0.742	0.197	0.211
Training PND 65-68	Treatment	0.556	0.511	0.487	0.441	0.750
	Sex	0.313	0.634	0.584	0.883	0.806
	Treatment*Sex	0.114	0.390	0.610	0.897	0.931
	Day	0.637	0.707	0.693	0.884	0.407
	Trial	0.071	<0.05	<0.001	0.725	0.351
	Day*Trial	0.216	0.245	0.294	0.681	0.153
	Day*Trial*Treatment*Sex	0.260	0.139	0.256	0.265	0.729

Values presented are *p-value*. $p < 0.05$ in bold.

Table 6.

Morris Water Maze short-term memory (STM) (A) and long-term memory (LTM) (B) tests.

(A)	MALE			FEMALE		
	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day
Total distance moved (cm)	815 ± 135	797 ± 95	750 ± 92	948 ± 106^a	864 ± 133	907 ± 145^a
Total distance to zone platform (cm)	5784 ± 1424	6747 ± 940	6402 ± 1118	7052 ± 1575	7506 ± 773	6681 ± 879
Number of visited zones	12.1 ± 3.0	9.38 ± 2.13	10.1 ± 3.8	12.0 ± 3.7	11.3 ± 3.0	12.4 ± 2.5
Velocity Mean cm/s	27.3 ± 4.5	26.8 ± 3.2	25.2 ± 3.0	31.8 ± 3.6^a	29.01 ± 4.47	30.4 ± 4.9^a
<i>In zone</i>						
In zone 4 duration (s)	13.3 ± 3.7	11.6 ± 2.7	13.1 ± 2.5	10.7 ± 3.7	10.3 ± 2.3	11.7 ± 2.7
In zone 4 latency to the first (s)	2.40 ± 1.80	3.03 ± 1.58	3.95 ± 2.04	2.65 ± 1.12	3.35 ± 1.59	2.53 ± 1.00
In zone platform duration (s)	2.88 ± 1.65	1.93 ± 0.96	2.45 ± 1.32	1.93 ± 1.12	2.00 ± 0.76	2.58 ± 1.32
In zone platform latency to the first (s)	4.10 ± 3.57	3.95 ± 1.70	5.03 ± 2.17	4.55 ± 1.63	4.20 ± 1.99	4.08 ± 2.87
Mean meander (deg/cm)	12.7 ± 14.7	8.53 ± 3.70	7.23 ± 4.34	8.63 ± 5.48	10.7 ± 5.0	6.60 ± 4.33
Mean heading to point (deg)	100.8 ± 38.7	94.5 ± 50.3	105 ± 31	78.0 ± 33.6	87.8 ± 50.1	101 ± 36

(B)	MALE			FEMALE		
	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day
Total distance moved (cm)	798 ± 152	781 ± 100	833.88 ± 149.45	914 ± 100	802 ± 57 *	879 ± 109
Total distance to zone platform (cm)	7662 ± 1463	7846 ± 1437	7090 ± 1241	8801 ± 1254	7469 ± 946 *	7197 ± 1052 **
Number of visited zones	9.88 ± 2.90	9.75 ± 1.04	10.3 ± 1.8	11.3 ± 2.6	9.25 ± 3.24	12.1 ± 2.2
Velocity Mean cm/s	26.8 ± 5.1	26.21 ± 3.34	28.0 ± 5.0	30.7 ± 3.4	26.9 ± 1.9 *	29.49 ± 3.67
<i>In zone</i>						
In zone 4 duration (s)	8.05 ± 4.40	9.10 ± 3.38	10.8 ± 3.4	7.03 ± 2.54	10.5 ± 2.8 *	10.6 ± 2.8 *
In zone 4 latency to the first (s)	4.03 ± 3.09	4.45 ± 3.82	3.35 ± 2.95	4.70 ± 3.55	3.78 ± 3.51	2.55 ± 1.19
In zone platform duration (s)	1.13 ± 0.76	1.45 ± 0.83	1.80 ± 0.92	0.95 ± 0.75	2.03 ± 1.21	2.25 ± 1.50 *
In zone platform latency to the first (s)	8.08 ± 9.15	5.20 ± 3.78	4.08 ± 3.04	5.78 ± 7.70	4.80 ± 3.28	3.20 ± 1.06
Mean meander (deg/cm)	14.0 ± 5.5	10.4 ± 4.9	8.06 ± 4.18 *	9.53 ± 5.15	14.29 ± 8.64	8.23 ± 6.01
Mean heading to point (deg)	91.5 ± 25.7	100 ± 25	81.5 ± 29.8	96.7 ± 19.8	92.0 ± 10.9	95.2 ± 6.1

The data were obtained during the first thirty seconds of these tests. The MWM STM was realized at PND 64 and the MWM LTM at PND 69. Values are mean ± SD; n = 8.

*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 significantly different compared with control. Letter indicated gender differences by treatment groups (control, 50 and 200 mg/kg/day) : ^a p<0.05, ^b p<0.01 and ^c p<0.001.

4. DISCUSSION

This study aimed to evaluate the effects of 4-n-NP on neurobehavioral development and memory capacity after placental and breastfeeding exposure on the offspring rats.

Maternal and offspring reproductive toxicity

Exposure to 4-n-NP at 200 mg/kg/day induced a longer gestational period and a diminution of the relative weight gain of dams during gestation as previously observed by Chapin et al. (1999) in F2 generation exposed to equivalent NP dose in diet and Nagao et al. (2001) for rats exposed to 250 mg/kg/day by gavage. Ferguson et al. (2000), Hossaini et al. (2001) and Negishi et al. (2004) found no effect of NP on gestational duration and maternal weight gain during gestation for diet exposure from 25 to 2000 ppm or for gavage exposure at lower doses (0.1 to 75 mg/kg/day).

Pup number per litter and sex ratio were constant, as previously observed by Ferguson et al. (2000), Negishi et al. (2004) and Takagi et al. (2004). On the contrary, other authors (Chapin et al., 1999; Jie et al., 2010) demonstrated a significant decrease on mean litter size and live pup number per litter following an *in utero* exposure to dose from 50 mg/kg/day.

Due to chemical structure similarities, NP mimics 17 β -oestradiol (White et al., 1994), especially involved in development, maturation and maintenance of female sex characteristics, but also in neuroendocrine and skeletal systems (Soares et al., 2008; Vazquez-Duhalt et al., 2005). Moreover, antiandrogenic activity of NP led to impairments of male reproductive system development by multistep activation of the androgen receptor (Lee et al., 2003).

In our experiment, 4-n-NP led to an increase of the GSI at weaning for males exposed to 50 mg/kg/day. This effect was however not observed at the highest dose and disappeared at PND 75. Exposure to 80 and 200 4-n-NP mg/kg/day is associated with decreases of testicular and prostate weight, changes in plasma testosterone levels, decreases sperm number and motility (El-Dakdoky and Helal, 2007; Jie et al., 2010). In contrast, Chapin et al. (1999), Hossaini et al. (2001) and Negishi et al. (2004) observed limited effects on the reproductive male system via dietary and gavage.

The female GSI was not impacted by treatment which is in accordance with Chapin et al. (1999). On the other hand these authors observed a consistent effect for the GSI for F2 generation.

Growth, somatic and physical maturation

NP treatment did not affect the male growth from birth to young adult, as previously observed (Negishi et al., 2004). In contrast, maternal exposure (200 mg 4-n-NP /kg/day) seemed to inflect female growth *in utero*. This weight difference was recovered just after weaning. For pups exposed to 50 mg 4-n-NP /kg/day, a growth alteration could be noted during PNDs 23 to 75. Offspring body weight associated to a food consumption decrease was demonstrated by Ferguson et al., (2000) beginning at PND 28 until PND 77. In our experiment, a maternal food consumption defect could be excluded since growth alterations were observed only for female offspring.

A constant dose-related decrease of TSI could be noticed in both sexes until PND 75. This result need further research to determine 4-n-NP influences on thyroid structure and activity in offspring.

An early onset of developmental landmarks (eyes and incisors) was highlighted in offspring exposed to the highest dose. Jie et al. (2010) and Jie et al. (2013b) found opposite effects, male offspring exposed to equivalent or higher 4-n-NP doses spending more time to perform developmental landmarks. In our experiment, the early onset of developmental landmarks was related to the increase of gestational duration, an increase which was not observed by these last authors.

Neurobehavior and sensorimotor development

No effects on the postnatal reflexes were found.

The homing test revealed that 4-n-NP did not impact the olfactory abilities. Moreover, locomotion did not seem to be affected suggesting that 4-n-NP altered only the postural motor movements, without affecting the "pointed" locomotion necessary to achieve the test, as highlighted by Šlamberová et al. (2006) with methamphetamine.

During the OF test, an increase time spent in the border area (thigmotaxis) has been considered as a sign of anxiety. No anxiogenic effect was revealed in this study. A gender effect on exploratory behavior was noticeable, females being more active than males. 4-n-NP

increased activity and exploratory behavior of males, so that the gender difference disappeared in 200 mg/kg/day group. To our best knowledge, the effect of maternal exposure to NP during gestation and lactation on the activity of juveniles was previously investigated only for 10 mg/kg/day, and showed no significant effect (Negishi et al., 2004). A causative relationship between NP and motor hyperactivity has already been reported by Masuo et al. (2004b) after an intracisternal administration (8.7 mM) in 5-day-old male rats. Adverse effects on the developing brain causing a deficit in dopaminergic neurons and resulting in motor hyperactivity were observed by this author at 4 weeks old. Masuo et al. (2004a) indicated the possibility to create an animal model with neurodevelopmental disorders such as attention-deficit activity disorder (ADHD) after a NP exposure during the early life. Furthermore, an intracisternal administration of endocrine disruptors including NP (8.7 mM) into 5-day-old male rats was shown to induce significant hyperactivity at 4-5 week-old (Ishido et al., 2005). In our study, the pre- and postnatal exposure periods corresponded to critical periods for brain development and sexual differentiation. Gender differences of OF behavior could be abolished by androgen or estrogen in the neonatal period (Stevens and Goldstein, 1981). Feminizing effect of 4-n-NP, observed in this study by the hyperactivity of male exposed rats, could be due to impairments of brain development *via* anti-androgenic action through monoamine systems at least in part. These abnormalities disappeared for young adults. This could be explained by some carry-over effects from the first experiment leading to decreased sensitivity in the second testing but also by a potential ability to recover of juvenile rats. This second hypothesis could be evaluated by testing different offspring at both age periods.

Learning, spatial orientation and memory function

According to Flynn et al. (2002), a maternal exposure to 10 mg/kg/day during gestation and lactation induced no change in learning and memory abilities of pups. Transplacental exposures to 50 and 100 mg/kg/day did not affect performances of memory functions of offspring males (Jie et al., 2013b). Sprague-Dawley rats exposed from 50 to 200 mg/kg/day during embryo development (GD 9-15) induced nerve behavioral and memory capacity alterations in male offspring (Jie et al., 2010).

In our study, results of the first 30 s highlighted effects of 4-n-NP, particularly for females, unlike the results of the OF.

In the first MWM STM test, highest exposed females were closer and spent more time in the platform zone. Gender differences for these parameters were significant only for controls. Several studies demonstrated consistent male advantage in hippocampal tests, particularly robust for SD rats tested in MWM (D'Hooge and De Deyn, 2001; Jonasson, 2005). Gender differences disappeared for exposed groups, female performance becoming similar to males. These observations indicated a sex and dose-response relationship.

During the first MWM LTM test (PND 33), few effects have been found indicating that long-term memory has been potentially less affected than short-term memory. A dose-response relationship was found only for the HTP parameter. Gender difference observed in controls was abolished by 4-n-NP.

The better STM of pubertal females was not noted in young adults which could be notably due to, as described for OF test, a decreased sensitivity during the second testing. However, an enhancement of LTM was revealed for 4-n-NP-treated young adult females.

The absence of effects for males and the improved spatial memory abilities of exposed females were described for other estrogenic molecules. Correiri et al. (2007) mentioned that EE2 hypermasculinized the neural circuits underlying spatial memory abilities in adult male rats. Masculinization of sexually dimorphic neural structures such as hippocampal tissue has been recognized to be under synergistic effects of perinatal androgens and estrogens (Isgor and Sengelaub, 2003). Consequently a perinatal gonadal steroid sensitive period has been defined for the organization of sex differences in adult spatial navigation and hippocampal morphology. The masculinization of treated females could result from an estrogenic action of NP during this critical window. No hypermasculinization of treated males has been demonstrated. This gender difference could be explained by metabolism differences, NP being more extensively metabolized in male compared to females (Green et al., 2003). The estrogen-like effects could be due to an increase of 4-n-NP bioavailability occurring, following metabolic saturation.

Furthermore, a significant effect was noticed on the TSI at PND 21 and 75, indicating potential impairments of the thyroid system. Thyroid hormones play a consistent role in development of certain cholinergic and dopaminergic systems in the central nervous system (Porterfield, 2000). The cholinergic fibers projecting from the hippocampus to the basal forebrain are important in memory and learning. A well-functioning cholinergic system was shown to be a pre-requisite for performance on spatial learning tasks in rodents (Schwegler

and Crusio, 1995). Few reports on the effects of NP on the thyroid system were available (Jie *et al.*, 2013a). Exposure to NP, increased the thyroid-stimulating hormone level in male rats exposed to 50 mg/kg/day but no impact on thyroid weight was observed (Nagao *et al.*, 2001). In a recent study, Xie *et al.* (2013) had reported that the NP may lead to thyroid dysfunction notably one decrease in serum level of free tri- and tetra-iodothyronine (FT3 and FT4) and an increase of the TSH in a dose-dependent manner. These authors also revealed histological and morphometric abnormalities in thyroid follicular cells. Further investigations on the histopathology and thyroid hormones on rats from this study must be performed to characterize the thyroid-disruptor potential of 4-n-NP.

CONCLUSION

Transplacental and lactational exposure to 4-n-NP induced behavioral and neuro-developmental impairments in offspring. The adverse behavioral and neuro-motor effects were observed particularly during the first open field showing a motor hyperactivity in males, probably due to an anti-androgenic action. Learning, spatial orientation and memory function evaluated in MWM may indicate a masculinization of females due to an estrogenic action. This effect was no longer observed for young adults. However better performance in the LTM MWM for young adult females seemed to be induced by the 4-n-NP treatment.

FUNDING

This work was supported by the Pays de la Loire region and GENESIA foundation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Dr Guus Bongers for his scientific and technical help on tracking software. The technical assistance of Claire Favreau, Emilie Perrat and Mathias Theriault is gratefully acknowledged. The authors thank Dr Françoise Redini and Pr Jean-Claude Desfontis for their scientific advice and Darci Couderc for the English language revision of the manuscript.

REFERENCES

- Ademollo N, Ferrara F, Delise M, Fabietti F, Funari E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ Int* 2008; 34: 984-987.
- Bolt HM, Janning P, Michna H, and Degen GH. Comparative assessment of endocrine modulators with oestrogenic activity: I. Definition of a hygiene-based margin of safety (HB MOS) for xeno-oestrogens against the background of European developments. *Arch Toxicol* 2001; 74:649-662.
- Bonefeld-Jørgensen EC, Long M, Hofmeister MV, Vinggaard AM. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environ Health Perspect* 2007; 115:69-76.
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 2005; 113:391-395.
- Chang MS, Shen JY, Yang S-H, Wu GJ. Determination of three endocrine disrupting chemicals, triclosan, 4-n-nonylphenol, and di-n-butyl phthalate using stir bar sorptive extraction in samples of different matrices. *Toxicol Environ Chem* 2012; 94:1027-1033.
- Chapin RE, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G. The effects of 4-nonylphenol in rats: a multigeneration reproduction study. *Toxicol Sci* 1999; 52:80-91.
- Corrieri L, Della Seta D, Canoine V, Fusani L. Developmental exposure to xenoestrogen enhances spatial learning in male rats. *Horm Behav* 2007; 51:620-625.
- D'Hooge R and De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36:60-90.
- Dodds EC, Goldberg L, Lawson W, Robinson R. Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* 1938; 141:247-248.
- European Union European Union Risk Assessment Report, 4-Nonylphenol (branched) and nonylphenol. 2nd Priority list (2002). Volume 10.
- El-Dakdoky MH, Helal MA. Reproductive toxicity of male mice after exposure to nonylphenol. *Bull Environ Contam Toxicol* 2007; 79:188-191.
- Ferguson SA, Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR. Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure. *Neurotoxicol Teratol* 2000; 22:583-591.
- Flynn KM, Newbold RR, Ferguson SA. Multigenerational exposure to dietary nonylphenol has no severe effects on spatial learning in female rats. *Neurotoxicology* 2002; 23:87-94.

- Fox WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav* 1965; 13:234-235.
- Green T, Swain C, Van Miller JP, Joiner RL. Absorption, bioavailability, and metabolism of para-nonylphenol in the rat. *Regul Toxicol Pharmacol* 2003; 38:43-51.
- Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Frandsen H, Larsen JJ. In utero reproductive study in rats exposed to nonylphenol. *Reprod Toxicol* 2001; 15:537-543.
- Isgor C and Sengelaub DR. Effects of neonatal gonadal steroids on adult CA3 pyramidal neuron dendritic morphology and spatial memory in rats. *J Neurobiol* 2003; 55:179-190.
- Ishido M, Morita M, Oka S, Masuo Y. Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regul Pept* 2005; 126:145-153.
- Jie X, JianMei L, Zheng F, Lei G, Biao Z, Jie Y. Neurotoxic effects of nonylphenol: a review. *Wien Klin Wochenschr* 2013a; 125:61-70.
- Jie X, Yang W, Jie Y, Hashim JH, Liu XY, Fan QY, Yan L. Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth Defects Res, Part B* 2010; 89:418-428.
- Jie Y, Fan QY, Binli H, Biao Z, Zheng F, JianMei L, Jie X. Joint neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol and estradiol on F1 male rats. *Int J Environ Health Res* 2013b; 23:321-330.
- Jobling S, Sumpter JP, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ Toxicol Chem* 1996; 15:194-202.
- Jonasson Z. Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 28:811-825.
- Kawaguchi M, Inoue K, Sakui N, Ito R, Izumi SI, Makino T, Okanouchi N, Nakazawa H. Stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the measurement of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in human biological samples. *J Chromatogr B* 2004; 799:119-125.
- Kawamura Y. Endocrine disruptors in food contact articles and baby toys with their transition. *Kokuritsu Iyakuhiin Shokuhin Eisei Kenkyūjo hōkoku* 2010; 128:17-26.
- Lee HJ, Chattopadhyay S, Gong EY, Ahn RS, Lee K. Antiandrogenic Effects of Bisphenol A and Nonylphenol on the Function of Androgen Receptor. *Toxicol Sci* 2003; 75:40-46.
- Martínez-Zapata M, Aristizábal C, Peñuela G. Photodegradation of the endocrine-disrupting chemicals 4n-nonylphenol and triclosan by simulated solar UV irradiation in aqueous solutions with Fe(III) and in the absence/presence of humic acids. *J Photochem Photobiol A* 2013; 251:41-49.

- Masuo Y, Ishido M, Morita M, Oka S. Effects of Neonatal Treatment With 6-Hydroxydopamine and Endocrine Disruptors on Motor Activity and Gene Expression in Rats. *Neural Plast* 2004a; 11:59-76.
- Masuo Y, Morita M, Oka S, Ishido M. Motor hyperactivity caused by a deficit in dopaminergic neurons and the effects of endocrine disruptors: a study inspired by the physiological roles of PACAP in the brain. *Regul Pept* 2004b; 123:225-234.
- Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11:47-60.
- Nagao T, Wada K, Marumo H, Yoshimura S, Ono H. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod Toxicol* 2001; 15:293-315.
- Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranlycypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 2004; 112:1159-1164.
- Porterfield SP. Thyroidal dysfunction and environmental chemicals--potential impact on brain development. *Environ Health Perspect* 2000; 108:433-438.
- Robinson RW, Harry F, and Balaban AT. The numbers of chiral and achiral alkanes and monosubstituted alkanes. *Tetrahedron* 1976; 32:355-361.
- Schwegler H and Crusio WE. Correlations between radial-maze learning and structural variations of septum and hippocampus in rodents. *Behav Brain Res* 1995; 67:29-41.
- Šlamberová R, Pometlová M, Charousová P. Postnatal development of rat pups is altered by prenatal methamphetamine exposure. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 2006; 30:82-88.
- Soares A, Guieysse B, Jefferson B, Cartmell E, Lester JN. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ Int* 2008; 34:1033-1049.
- Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ Health Perspect* 1991; 92:167-173.
- Stevens R and Goldstein R. Effects of neonatal testosterone and estrogen on open-field behaviour in rats. *Physiol Behav* 1981; 26:551-553.
- Tabira Y, Nakai M, Asai D, Yakabe Y, Tahara Y, Shinmyozu T, Noguchi M, Takatsuki M, Shimohigashi Y. Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur J Biochem* 1999; 262:240-245.
- Takagi H, Shibutani M, Masutomi N, Uneyama C, Takahashi N, Mitsumori K, Hirose M. Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch Toxicol* 2004; 78:97-105.

United States Environmental Protection Agency (US EPA), Hazard Characterization Document. Screening-level hazard characterization: Alkylphenols category. 2009; 1-55.

Vazquez-Duhalt R, Marquez-Rocha F, Ponce E, Licea AF, Viana MT. Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Appl Ecol Environ Res* 2005; 4:1-25.

White R, Jobling S, Hoare S, Sumpter J, Parker M. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 1994; 135:175-182.

Xi Y, Li D, and San W. Exposure to the endocrine disruptor nonylphenol alters structure and function of thyroid gland in rats. *Regul Pept* 2013; 185:52-56.

SUPPLEMENTARY DATA

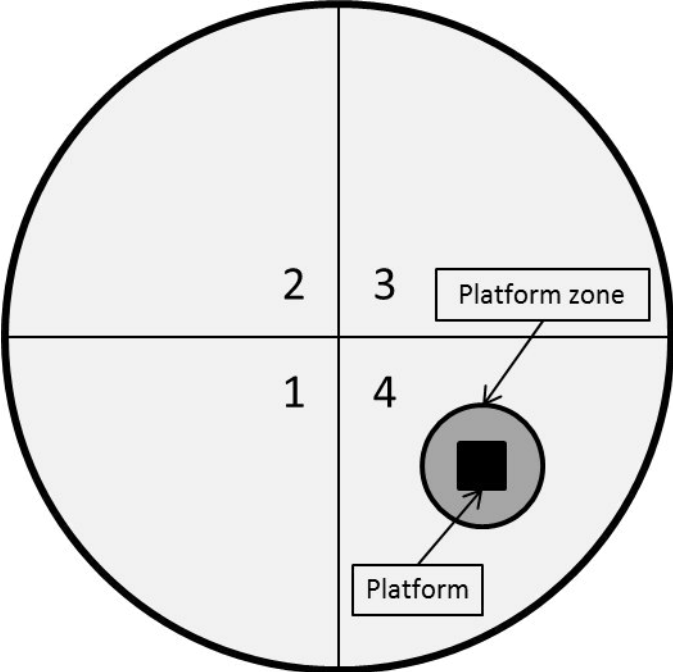


Figure I: Illustration of the Morris Water Maze

Table I

Organ weights and body weight of pups at PND 21 and PND 75.

	MALE			FEMALE			
	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	0 mg/kg/day	50 mg/kg/day	200 mg/kg/day	
PND 21	Body weight (g)	67,99 ± 7,20	70,55 ± 5,62	68,43 ± 7,15	67,86 ± 6,13	71,06 ± 3,61	65,01 ± 6,95
	Thyroid weight (mg)	65,27 ± 35,06	42,81 ± 32,68	10,81 ± 9,88	52,47 ± 29,30	33,31 ± 15,13	10,08 ± 9,08
	Liver weight (g)	2,75 ± 0,33	2,77 ± 0,40	2,78 ± 0,30	2,76 ± 0,31	2,82 ± 0,26	2,63 ± 0,26
	Gonad weight (mg)	407,4 ± 58,0	534,1 ± 104,8	368,9 ± 67,2	62,36 ± 30,72	89,14 ± 34,79	58,94 ± 26,20
PND 75	Body weight (g)	508,5 ± 36,2	500,9 ± 17,3	496,6 ± 25,0	303,8 ± 18,9	283,5 ± 21,7	272,6 ± 17,5
	Thyroid weight (mg)	20,29 ± 7,87	20,31 ± 5,15	13,63 ± 3,40	19,10 ± 9,73	10,74 ± 1,70	9,53 ± 3,78
	Liver weight (g)	18,02 ± 1,70	17,91 ± 1,43	18,07 ± 0,96	10,21 ± 1,10	9,55 ± 1,05	9,03 ± 0,65
	Gonad weight (g)	3,48 ± 0,38	3,41 ± 0,18	3,25 ± 0,15	0,19 ± 0,04	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02

IV.3. Résultats additionnels

En complément de cette étude, les glandes thyroïdes des rats ont fait l'objet d'une observation histologique avec notamment la mesure de la taille des follicules thyroïdiens situés en périphérie de la glande (follicules « externes ») et ceux localisés dans sa partie centrale (follicules « internes »). Des analyses de concentrations plasmatiques d'hormones thyroïdiennes, T3 libre, T4 totale et TSH ont également été effectuées. Le matériel et méthode relatif à ces résultats est présenté en annexe 6. Les résultats obtenus sont décrits dans le Tableau 32.

Tableau 32. Résultats de l'étude histologique et des mesures de concentrations en hormones thyroïdiennes plasmatiques chez les femelles exposées et chez la génération F1 à deux âges différents [21 jours post-natals (PND21) et 75 jours post-natals (PND75)]. Tailles moyennes des follicules thyroïdiens internes et externes (en μm). Concentrations moyennes en hormones thyroïdiennes T3 libre, T4 totale et TSH.

	Traitement (mg/kg/j)	Taille Follicules Int. (μm)	Taille Follicules Ext. (μm)	Conc. T3 libre (pg/mL)	Conc. T4 totale (ng/mL)	Conc.TSH (ng/mL)
Mères	0	54,7 \pm 10,6	73,3 \pm 6,8	10,8 \pm 1,1	32,2 \pm 6,1	5,1 \pm 7,8
	50	53,2 \pm 10,0	72,8 \pm 9,1	9,6 \pm 0,8	41,3 \pm 10,9	1,7 \pm 0,7
	200	56,6 \pm 12,9	73,5 \pm 10,2	9,5 \pm 2,2	34,3 \pm 9,5	2,3 \pm 1,0
Femelles (PND21)	0	40,1 \pm 8,5	42,2 \pm 8,1	4,1 \pm 1,8	27,4 \pm 3,1	2,6 \pm 1,1
	50	41,8 \pm 7,7	40,8 \pm 6,4	3,6 \pm 0,4	25,8 \pm 2,7	3,4 \pm 1,5
	200	41,6 \pm 7,0	46,8 \pm 4,4	3,3 \pm 0,5	25,1 \pm 3,3	3,6 \pm 1,9
Mâle (PND21)	0	40,7 \pm 5,3	41,5 \pm 7,0	6,8 \pm 0,6	25,7 \pm 3,8	2,1 \pm 0,8
	50	41,1 \pm 10,7	42,3 \pm 11,2	7,2 \pm 0,7	26,3 \pm 2,4	2,5 \pm 0,7
	200	40,6 \pm 8,5	44,4 \pm 4,6	8,1 \pm 1,1*	25,8 \pm 3,7	1,8 \pm 0,4
Femelles (PND75)	0	51,9 \pm 7,6	55,5 \pm 11,0	5,0 \pm 0,8	40,9 \pm 10,4	2,1 \pm 0,3
	50	49,3 \pm 8,7	63,2 \pm 13,1	5,0 \pm 1,2	44,3 \pm 15,6	2,6 \pm 1,6
	200	56,4 \pm 10,6	72,1 \pm 14,5*	4,9 \pm 0,7	33,1 \pm 8,1	3,5 \pm 2,9
Mâle (PND75)	0	44,9 \pm 11,7	60,5 \pm 16,1	3,8 \pm 0,6	44,3 \pm 7,1	2,1 \pm 0,9
	50	43,3 \pm 7,3	57,0 \pm 15,8	4,2 \pm 0,4	44,3 \pm 11,2	2,4 \pm 1,0
	200	55,2 \pm 12,3	67,9 \pm 8,2	4,1 \pm 0,6	38,7 \pm 7,0	3,0 \pm 1,3

Les valeurs présentées sont sous la forme : moyenne \pm écart-type. n=8 par groupe de traitement et par genre. Les astérisques indiquent les différences significatives comparées au groupe contrôle (0mg/kg/j) : * p <0,05, ** p <0.01 et *** p <0,001.

Chez les mères exposées au 4-n-NP aucune différence significative n'a été mise en évidence pour chacun des paramètres étudiés par rapport au groupe de mères non exposées.

Chez les rats âgés de 21 jours, aucune différence n'a été observée entre les femelles du groupe contrôle et les deux groupes exposés au 4-n-NP. Chez les mâles du même âge, le groupe 200 mg/kg/j présentait une concentration en T3 libre ($8,1 \pm 1,1$ pg T3/mL) significativement supérieure au groupe contrôle ($6,8 \pm 0,6$ pg T3/mL) ($p=0,017$).

A 75 jours, les observations histologiques indiquaient des tailles significativement supérieures des follicules localisés en périphérie de la glande chez les femelles du groupe 200 mg/kg/j ($72,1 \pm 14,5$ μ m) comparées à celles obtenues pour le groupe contrôle ($55,5 \pm 11,0$ μ m) ($p=0,018$). Chez les mâles du même âge, aucune différence n'a été observée pour chacun des paramètres mesurés.

IV.4. Conclusion

Dans cette étude, nous avons évalué les effets d'une exposition périnatale au 4-n-nonylphénol (4-n-NP) sur le développement neurologique du juvénile.

Les mères exposées à la dose la plus élevée (200 mg/kg/j) ont été les seules affectées. Deux principaux effets ont pu être observés, l'allongement de la durée de la gestation et une perte de poids durant les premiers jours de cette période. Les autres paramètres mesurés notamment biométriques et le succès de reproduction n'ont indiqué que des tendances. Ainsi l'indice gonado-somatique (GSI) et l'indice hépato-somatique (HSI) seraient augmentés et le succès de reproduction diminuerait pour la plus forte dose par rapport aux mères du groupe contrôle. Le nombre de petits et le sex-ratio des portées n'ont toutefois pas été affectés par le traitement quelle que soit la dose d'exposition au 4-n-NP. Ces résultats indiqueraient une faible toxicité du nonylphénol pour les mères conformément aux résultats de la littérature.

Chez les juvéniles, les mesures biométriques ont révélé un poids plus faible des femelles du groupe 200 mg/kg/j durant la période d'allaitement sans toutefois affecter la croissance. Aucun effet n'a été constaté chez les mâles. Parmi les indices mesurés, l'indice thyroïdo-somatique (TSI) a également été affecté chez les deux sexes. Au sevrage, les jeunes mâles (200 mg/kg/j) présentaient un TSI plus faible que ceux du groupe contrôle, indiquant un poids plus faible de la glande thyroïde chez les individus de ce groupe. Chez les femelles, cette diminution était aussi observée au sevrage mais également et pour les deux groupes de traitement, chez les jeunes adultes à 75 jours post-natals (PND75). Le GSI (gonado-somatic index) était quant à lui significativement plus élevé chez les rats du groupe 50 mg/kg/j. Des

atteintes des organes reproducteurs ont également été notées mais celles-ci étaient limitées. Ainsi, le GSI s'est vu augmenté d'environ 41 % mais uniquement pour les mâles du groupe 50 mg/kg/j. Aucune variation de l'indice hépato-somatique (HSI) liée au traitement n'a pu être remarquée.

L'évaluation de la maturation physique des rats a montré une précocité pour le groupe exposé à la dose la plus élevée chez les deux sexes confondus, lors de l'ouverture des yeux mais aussi de l'apparition des incisives. L'activité sensorimotrice mesurée durant les 21 premiers jours des rats, n'a pas été altérée quelle que soit la dose de traitement utilisée. De la même manière, le test du « homing » n'a révélé aucune incidence de l'exposition sur les capacités motrices et sur le comportement des rats à 14 jours postnatals.

Au cours de deux tests de l'« Open Field », l'activité locomotrice et le comportement exploratoires des rats ont été évalués à 36 et 71 jours post-natals. Lors de ces tests, les femelles ont montré une activité plus importante que les mâles. Néanmoins lors du premier test de l'« Open Field » (PND 36), chez les groupes exposés, notamment celui ayant reçu la plus forte dose, les mâles ont vu leur activité atteindre des niveaux mesurés chez les femelles alors que celles-ci ne présentaient aucune différence pour chacun des paramètres mesurés et ce quelle que soit la dose d'exposition. Ce phénomène d'hyperactivité induite par le nonylphénol a été rapporté dans la littérature notamment chez les mâles. Le second test à 71 jours n'a mis en évidence que très peu de différences entre les groupes contrôles et les groupes exposés au NP. Contrairement aux résultats du premier test, la différence entre les femelles et les mâles était présente quel que soit le groupe.

Deux tests du « Morris water maze » effectués à 26-34 et 61-69 jours postnatals ont été utilisés pour évaluer les capacités d'apprentissage, de spatialisation et de mémoire à court et long terme des rats. Ceux-ci n'ont révélé aucun effet de l'exposition périnatale au 4-n-NP, que ce soit lors des entraînements (apprentissage) ou durant les tests de mémoire. Pour ces derniers, il a donc été décidé de diviser l'analyse des résultats de ces tests sur des périodes de 30 secondes (soit 3x30s). Lors de ce type de tests il est connu que les mâles ont de meilleures performances que les femelles. Néanmoins, l'analyse des 30 premières secondes du premier test de mémoire à court terme (PND 29) a permis de montrer un effet de l'exposition chez les femelles du groupe 200 mg. Les performances de celles-ci ont atteint celles des mâles, qui eux n'ont pas été affectés par l'exposition au 4-n-NP. Ce type d'effet a été observé à nouveau lors

du deuxième « Morris water maze » mais cette fois au cours du test de mémoire à long terme (PND 69).

L'étude histologique de la thyroïde a révélé une hypertrophie des follicules situés en périphérie de la glande thyroïde uniquement chez les femelles à 75 jours post-natales sans modification de l'homéostasie. Les dosages plasmatiques des hormones ont mis en évidence une concentration de T3 libre plus importante chez les mâles exposés à la dose la plus élevée (200 mg/kg/j) sans variations des autres hormones mesurées (T4 totale et TSH) ni d'anomalies histologiques de la glande thyroïde.

Au vu de l'ensemble des résultats, une exposition périnatale au nonylphénol a induit des effets sur le comportement et le neuro-développement des juvéniles dès 50 mg/kg/j. Ces effets ont particulièrement été observés lors du premier test de l'« Open Field » durant lequel les mâles ont montré une hyperactivité probablement induite par une action anti-androgénique du NP. Le test du « Morris water maze » a révélé une « amélioration » des performances chez les femelles exposées qui pourrait s'expliquer par une masculinisation induite par une action oestrogénique du NP comme observé pour d'autres composés tels que le 17 α -éthynylestradiol. Peu d'études publiées sont disponibles sur les effets du nonylphénol sur le système thyroïdien (Jie *et al.*, 2013). Les résultats obtenus par celles-ci (*e.g.* augmentation du poids de la thyroïde, diminution des concentrations des T3 et T4, augmentation de la concentration de la TSH, anomalies histologiques importantes de la glande thyroïde) pour des doses du même ordre ne semblent pas en accord avec nos observations (Nagao *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2007; Xi *et al.*, 2013). Néanmoins nos résultats semblent indiquer certaines altérations de l'homéostasie des HT (augmentation de la T3) mais aussi de la glande thyroïde (diminution du poids, follicules hypertrophiés)

Chapitre V : Conclusion Générale et perspectives

✓ *Etude du compartiment sédimentaire de l'estuaire : contamination et activité perturbatrice*

Durant une année, à chacune des 4 saisons, des sédiments ont été prélevés en divers sites échelonnés sur l'ensemble de l'estuaire de la Loire et sélectionnés notamment en fonction des différentes STEP identifiées aux abords de celui-ci. La présence d'agglomérations, d'un port, de différentes implantations industrielles et de zones agricoles dans l'estuaire est également à noter. En parallèle de l'analyse chimique de contaminants de type perturbateurs thyroïdiens, les extraits de sédiments ont été soumis à un test *in vitro* permettant d'estimer l'activité perturbatrice (*thyroid-like*) spécifique d'une protéine de transport des HT (TTR binding assay).

L'analyse des sédiments a porté sur 36 contaminants chimiques perturbateurs thyroïdiens suspectés ou avérés que sont les HAP, les AP, les PCB, les PBDE et le BPA. **Le BPA, les HAP et les PCB étaient détectés dans tous les échantillons de sédiments.** Dans l'ensemble, **quelques variations spatiales et temporelles des différents contaminants étaient observées, et ce, uniquement pour les prélèvements effectués en zone intertidale.** Les sites localisés en amont de l'estuaire, principalement Ancenis, présentaient des concentrations de PCB, PBDE et AP généralement supérieures aux concentrations trouvées aux sites situés en partie aval de l'estuaire, tout particulièrement Mindin. La contamination mesurée dans les vasières intertidales était supérieure à celle des vasières subtidales. Cela pourrait être expliqué par une profondeur plus importante des prélèvements effectués en vase subtidale. En effet, des gradients de contamination dans les sédiments ont déjà été observés (Mitra *et al.*, 1999). La granulométrie des sédiments pourrait aussi influencer ces concentrations. Les profils de contamination variaient peu dans l'estuaire, toutefois dans le cas des PBDE, trois congénères (BDE 100, 153 et 154) étaient uniquement présents sur le site d'Ancenis.

Le test TTR a permis de mettre en évidence des activités perturbatrices de la fixation des HT sur la protéine de transport TTR chez tous les extraits de sédiments prélevés dans les vasières intertidales et subtidales. Cependant, nous n'avons pas pu établir de lien évident entre l'activité *thyroid-like* mesurée et les teneurs des différents contaminants investigués dans l'estuaire. En effet, seuls **quelques HAP ainsi que le PCB 180 étaient corrélés positivement avec les résultats d'activités obtenus lors des tests, mais ces corrélations étaient relativement faibles.** L'analyse individuelle des points de prélèvements

indiquaient que les sites de Mindin et Donges contribuaient principalement à la mise en évidence de ces corrélations. Plusieurs raisons pourraient expliquer les faibles corrélations obtenues entre l'activité *thyroid-like* et les concentrations des contaminants dans les sédiments. D'une part, les méthodes d'extractions et de purifications employées pour les analyses des différents contaminants et pour le test TTR n'étaient pas similaires. D'autre part, les extraits de sédiments sont complexes. Les relations et/ou interactions entre les composés chimiques et naturels dans le biotope ne doivent pas être négligées dans l'analyse de ces résultats. L'intérêt d'effectuer les tests à partir du sédiment est justement de prendre en compte ce paramètre.

Les corrélations limitées entre les contaminants et les résultats d'activité *thyroid-like* ne semblent toutefois pas concorder avec la littérature qui indique que les PCB, les retardateurs de flamme (*e.g.* PBDE) et les composés phénoliques sont des compétiteurs des HT pour la liaison à la TTR (Kudo and Yamauchi, 2005; Kudo *et al.*, 2006; Meerts *et al.*, 2002; Meerts *et al.*, 2000; Purkey *et al.*, 2004; Yamauchi *et al.*, 2003). Néanmoins, si l'activité *thyroid-like* mesurée ne semble pas être associée à la majorité des contaminants investigués dans ce travail, elle pourrait avoir pour origine l'action d'autres composés présents dans les sédiments comme des phtalates, des métabolites de PCB, les PCDD, les PCDF ou encore des pesticides tels que le pentachlorophénol qui sont connus pour altérer la liaison de la T4 aux protéines de transport (Ishihara *et al.*, 2003; Lans *et al.*, 1993; van den Berg, 1990). Il serait intéressant notamment de rechercher dans les extraits sédimentaires, les métabolites et dérivés de PCB, ceux des retardateurs de flamme bromés et de composés phénoliques qui ont démontré de plus fortes affinités de liaison à la TTR que les composés parents correspondants (Meerts *et al.*, 2000). Les rôles de l'hydroxylation et de l'halogénéation seraient majeurs dans la toxicité pour la fonction thyroïdienne (Meerts *et al.*, 2000).

L'utilisation de capteurs passifs, dans le but de caractériser la contamination de la colonne d'eau, ne s'est pas révélée concluante. Cela est notamment dû au fait de la perte des deux tiers des capteurs suite à une forte crue de la Loire qui ne nous a pas permis de comparer les 3 sites de l'estuaire envisagés pour l'étude. D'autre part, l'utilisation de la phase Oasis HLB s'est avérée restrictive puisqu'une grande partie des composés analysés n'ont pas été détectés (*i.e.* 12 des 16 HAP, 2 des 7 PCB et l'ensemble des PBDE). Néanmoins lors du test TTR, les trois réplicats du site de Haute-Indre ont montré une activité similaire à celle des sédiments intertidaux du même site.

Parmi les perspectives possibles, il serait intéressant de déployer à nouveau des capteurs passifs et d'utiliser d'autres types de phases stationnaires qui permettraient de couvrir des gammes de polarité des composés plus larges (des composés avec des coefficients de partage d'une gamme plus étendue que ceux retenus sur la phase Oasis HLB). Il pourrait s'agir par exemple de capteurs à base de polymères, tels que le polyéthylène (PE), le polydiméthylsiloxane (PDMS) ou encore le polyoxyméthylène (POM) qui sont notamment utilisés pour les composés lipophiles (David *et al.*, 2009; Perron *et al.*, 2013; Rusina *et al.*, 2007).

Les extraits de sédiments et de capteurs passifs pourraient être utilisés pour d'autres tests *in vitro* tels que le TR-CALUX qui permet de mettre en évidence des compétiteurs de la fixation de la T3 au récepteurs des HT et d'en caractériser l'activité induite (effet agoniste ou antagoniste) (Bekki *et al.*, 2009; Jugan *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2013).

✓ *Etude du biota : contamination de l'anguille européenne et relation avec des marqueurs potentiels de perturbations thyroïdiennes*

L'utilisation de l'anguille comme espèce sentinelle de la contamination chimique de l'estuaire de la Loire a permis de constater **que les niveaux de contamination en PCB, PBDE et PFAS étaient de l'ordre de ceux généralement observés chez les anguilles évoluant dans d'autres cours d'eau européens. Les concentrations des AP et OH-PAH étaient par contre relativement moins importantes en comparaison aux données européennes alors que le BPA présentait des concentrations similaires à celles communément relatées.** Toutefois, il convient de souligner la **forte variabilité des concentrations de contaminants, notamment chez les anguilles jaunes, entre les individus prélevés sur une même zone et dans une moindre mesure chez les anguilles argentées.** Ces variations pourraient expliquer les faibles différences significatives observées entre les moyennes des valeurs obtenues entre les sites de prélèvements et les stades sexuels des anguilles. Une des principales hypothèses expliquant cette variabilité serait que dans les habitats estuariens, la sédentarité est moins prononcée que dans les habitats d'eau douce plus en amont. Daverat *et al.* (2004) ont observé que les anguilles européennes pouvaient présenter une alternance entre plusieurs zones de vie (mer, estuaire, rivière et étendues d'eau douce) et ne pas être strictement sédentaires durant le stade « jaune ». Il serait donc intéressant d'analyser les otolithes, une concrétion calcaire de l'oreille interne des poissons (Pannella, 1980), afin de confirmer ou non cette hypothèse. En effet, l'étude de la microchimie des otolithes (mesures successives des concentrations en Sr et

Ca) permet de déterminer les différentes salinités dans lesquelles les anguilles ont vécu tout au long de leur vie et donc de caractériser l'habitat et les migrations de celles-ci (Tsukamoto *et al.*, 1998). De plus, la lecture des otolithes nous permettrait également de déterminer l'âge des individus et d'étudier la contribution de celui-ci sur les paramètres biométriques mais également sur l'imprégnation et les profils des contaminants comme réalisé dans l'étude de Blanchet-Letrouvé *et al.* (2014).

La majorité des anguilles prélevées dépassaient les normes de qualité environnementale (EQS) spécifiques au biota fixées par l'Union Européenne et inscrites dans la directive cadre sur l'eau pour deux des familles ou composés (la somme des PBDE et le PFOS) analysés dans ce travail. Après l'étude des risques de consommation des anguilles de Loire, nous avons constaté qu'environ un tiers des poissons dépassait une des valeurs réglementaires et que ceux-ci devraient être considérés comme impropres à la consommation humaine.

Les travaux réalisés sur les hormones thyroïdiennes des anguilles prélevées ont permis de **compléter les connaissances sur le statut thyroïdien de cette espèce en fonction de leur stade de développement**. De plus, les résultats obtenus suggèrent des effets endocriniens en lien avec l'imprégnation des individus en contaminants organiques. En effet, **une corrélation positive majeure entre plusieurs congénères de PCB et de PBDE et la T4 libre ainsi qu'au ratio T3 libre / T4 libre a été observée au sein des anguilles jaunes**. Cette relation est principalement observée chez les individus prélevés à Haute-Indre et Bellevue et suggère des altérations de la désiodation et/ou du métabolisme de la T4, comme observé précédemment chez d'autres espèces de poissons (Brar *et al.*, 2010; Simmons *et al.*, 2014). Ces effets peuvent être induits par les composés parents mais également par leurs métabolites hydroxylés qui présentent généralement une capacité de perturbation endocrine plus importante (Gilroy *et al.*, 2012; Simmons *et al.*, 2014). A la lumière de ces résultats et afin d'approfondir les mécanismes d'action de ces contaminants sur l'homéostasie thyroïdienne de la faune sauvage, il apparaît indispensable de mesurer l'activité de désiodation (*e.g.* expression génique des différents types de désiodases) en parallèle de la mesure des HT.

A l'inverse des résultats observés chez les anguilles jaunes, ceux obtenus chez les anguilles argentées mâles et femelles ne présentent que de rares et faibles corrélations entre les HT et certains contaminants (PCB et PFAS). Les différences entre les stades sexuels peuvent s'expliquer par une plus faible activité thyroïdienne chez les individus argentés mais également par la remobilisation des contaminants lors de la gamétogenèse

associée à l'argenture (Geeraerts and Belpaire, 2010). **Chez les femelles argentées, le gène codant pour la TSH semble être induit par plusieurs congénères de PCB (dl et ndl) ainsi que par le PBDE 28.** Cet effet a été rapporté par plusieurs études chez différentes espèces de poissons comme étant lié à une réduction du rétrocontrôle exercé par les HT sur l'axe HPT (Chen *et al.*, 2008; Lema *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2010). Malgré quelques corrélations inverses entre certains PCB et le ratio T4 libre / T4 totale, nos résultats ne nous ont pas permis d'établir une relation directe entre l'augmentation de l'expression génique de la TSH et une variation des niveaux des HT. **D'autre part, le gène codant pour la 5' désiodase (Deio 2) semble être négativement corrélé à deux métabolites de HAP détectés dans la bile des individus (le 2 OH-Fluo et le 2 OH-Naph).** Le 2 OH-Naph est de plus associé à une réduction du ratio T3 libre / T4 libre confortant l'hypothèse d'une répression de l'expression génique de la Deio 2. L'expression des récepteurs thyroïdiens (TR α et TR β) ne serait pas influencée par les contaminants analysés dans les muscles et la bile des anguilles argentées. **Concernant la vitellogénine, une expression génique associée à une augmentation du rapport T4 libre / T4 totale a été observée chez tous les mâles argentés,** à des niveaux toutefois inférieurs à ceux mesurés pour les femelles argentées. Ces résultats confirment les observations précédemment reportées par Blanchet-Letrouvé *et al.* (2014) relatant une expression génique de Vtg chez des individus à priori non susceptibles de l'exprimer. Excepté pour le PCB 77, pour lequel une relation positive avec les niveaux d'expression de Vtg a été trouvée, des relations inverses ont été constatées avec certains autres congénères de PCB et un PFAS (PFTrDA). Ces effets potentiellement opposés démontrent la complexité de l'étude des impacts liés aux mélanges de contaminants auxquels sont exposés les organismes dans leur environnement. **Chez les femelles argentées, d'importantes corrélations positives ont été trouvées entre les PBDE et l'expression de la Vtg suggérant un effet estrogénique potentiel.**

L'ensemble de ces résultats indiquent que plusieurs contaminants, représentés principalement par les PCB et les PBDE, peuvent induire des effets à différents niveaux de l'axe HPT *via* notamment la perturbation de l'activité de désiodation, la clairance de la T4, l'inhibition ou l'induction de gènes codant pour la TSH et la Deio 2. Les analyses d'expressions géniques devront être poursuivies chez les anguilles jaunes afin d'approfondir les effets observés sur les HT.

En outre, il sera intéressant d'examiner les résultats obtenus sur une autre espèce sentinelle couramment utilisée et présente en Loire : le flet européen (*Platichthys flesus*) (Bodin *et al.*,

2014; Bragigand *et al.*, 2006; Waszak *et al.*, 2014). En effet, ce poisson plat présente quelques caractéristiques proches des anguilles (*e.g.* habitat, alimentation, niveau trophique)(Daverat *et al.*, 2011) mais, étant donné qu'il ne s'agit pas d'un poisson gras, il est susceptible de moins accumuler de polluants lipophiles. L'avis de l'AFSSA (aujourd'hui ANSES) du 5 février 2008 recommande d'ailleurs l'utilisation des deux catégories de poissons dans la surveillance des substances dans le biote, *i.e.* une espèce considérée comme fortement bioaccumulatrice et une autre considérée comme faiblement bioaccumulatrice (AFSSA, 2008). De plus, ce poisson est également caractérisé durant son cycle de vie par une métamorphose particulière au cours de laquelle il va subir d'importants changements morphologiques qui vont lui permettre de passer d'une larve pélagique à symétrie bilatérale à des juvéniles benthiques asymétriques qualifiés de poisson plat (Inui *et al.*, 1995; Power *et al.*, 2001). Cette métamorphose est de surcroît un processus dépendant des HT (Carr and Patiño, 2011; Inui *et al.*, 1995; Yamano, 2005). Par ailleurs, **ce poisson figurant au menu de nombreux consommateurs, en particulier en Loire, il serait intéressant d'évaluer le risque sanitaire de la consommation de cette espèce. La démarche a été entreprise en parallèle de ce travail et les analyses des résultats de contamination et le dosage des HT devraient pouvoir permettre de clôturer prochainement cette autre étude.**

✓ Contaminations sédiments vs anguilles

Afin de déterminer si les concentrations en contaminants des sédiments localisés au niveau ou à proximité des sites de pêches (Ancenis/Varades, Bellevue, et Haute-Indre) influencent celles mesurées chez les anguilles jaunes, des ACP ont été réalisées. Pour cela, nous avons utilisé exclusivement les contaminants communs aux deux matrices (sédiments, poissons), *i.e.* les concentrations des congénères par famille de contaminants, soit les 7 congénères indicateurs de la contamination en PCB, les 7 PBDE et les AP (BP, le 4-tOP et le NP-r) auxquels le BPA a été associé. Les 3 ACP réalisées n'ont pas permis de mettre en évidence un lien entre les niveaux de contamination des sédiments et ceux de l'imprégnation des anguilles. Les sédiments ne semblent pas être la principale voie de contamination des anguilles malgré un contact quasi permanent avec ce compartiment, notamment lors de l'hibernation. Cependant, il est important de souligner que les écailles et le mucus particulièrement abondants chez l'anguille constituent une barrière physique à la pénétration des contaminants par voie cutanée, la voie trophique constituant ainsi la principale voie de contamination (Tapie *et al.*, 2006).

- ✓ Evaluation du risque sanitaire lié à la consommation de poissons contaminés par des polluants organiques persistants

L'étude sur l'exposition périnatale de rats juvéniles au 4-n-nonylphénol a permis de mettre en évidence des altérations du développement neuro-comportemental : une précocité de la maturation physique, des troubles de la croissance, une hyperactivité ou encore une influence sur les performances de mémoire. Dans un premier temps, nous avons associé ces effets à des perturbations endocrines de la fonction reproductrice. L'hyperactivité des rats mâles suite à une exposition au nonylphénol avait déjà été observée (Ishido *et al.*, 2005; Masuo *et al.*, 2004) mais jamais suite à une exposition périnatale (Negishi *et al.*, 2004). L'hypothèse d'une féminisation des mâles par action anti-androgénique apparaît donc plausible étant donné les propriétés oestrogéniques connues du NP (Jobling *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 1991). Cette action oestrogénique pourrait également être à l'origine d'une amélioration des performances des femelles exposées lors du test du Morris water maze. Lors de ce type de test, en particulier chez le rat Spague Dawley, il a été démontré que les mâles présentaient des performances supérieures à celles des femelles (D'Hooge and De Deyn, 2001; Jonasson, 2005). Cette influence sur les performances pourrait être due à une hyper-masculinisation induite par le NP. Ce phénomène a déjà été observé suite à l'exposition de rats à des substances oestrogéniques, notamment le EE2 (Corrieri *et al.*, 2007). De plus, l'exposition au NP s'est déroulée sur une période de développement sexuel, débutant après le dixième jour prénatal, rendant les rats particulièrement sensibles aux stimulations oestrogéniques (Odum *et al.*, 2002). Des effets sur le développement et la fonction reproductrice ne peuvent donc pas être exclus. Il convient cependant d'être prudent quant à l'interprétation de ces résultats en termes de potentiel oestrogénique du NP puisque l'exploration du développement sexuel n'a pas été entreprise dans cette étude. Seule une augmentation significative du GSI à PND21 uniquement chez les mâles du groupe exposé à 50 mg/kg/j a été observée. Afin d'expliquer les résultats obtenus, l'exploration de la fonction thyroïdienne a été entreprise. Une recherche de corrélations entre les résultats des tests effectués (maturation physique, Fox battery, homing test, Open Field et Morris water maze) sur les ratons et ceux de l'exploration de la fonction thyroïdienne (TSI, mesure des follicules et des concentrations en T4 totale, T3 libre et TSH) n'a pas permis d'établir clairement un lien entre ceux-ci. En effet, le système thyroïdien semble n'avoir été que « peu » affecté par l'exposition. Les effets retrouvés sont principalement **une importante diminution du TSI chez les animaux des deux sexes et aux deux âges (21 et 75 jours)**

exposés à la dose la plus élevée (200 mg/kg/j). Cet effet n'a pas été observé chez les mères quelle que soit la dose d'exposition. Cela semble donc confirmer que la période d'exposition (gestation et lactation) est une période sensible dans la formation de la glande thyroïde. Nous n'avons cependant pas constaté d'impact de l'exposition au nonylphénol sur la fonction thyroïdienne chez l'adulte. Chez le juvénile à PND 21, le TSI était corrélé positivement avec la concentration en T4 totale mais uniquement chez les femelles. Néanmoins aucune différence due au traitement n'a été observée entre les groupes. Chez les jeunes adultes (PND 75), le TSI n'était corrélé à aucun des autres paramètres thyroïdiens mesurés. **L'analyse histologique de la glande thyroïdienne a révélé une augmentation de la taille des follicules externes chez les femelles à PND75 ; là encore, uniquement pour le groupe exposé à la dose de NP la plus élevée (200 mg/kg/j).** Cependant, aucune association avec les autres paramètres thyroïdiens (TSI, histologie, et HT) mesurés n'a été constatée. Les résultats obtenus lors des tests effectués quelques jours auparavant au moyen de l'Open Field 2 (PND71) et du Morris water maze 2 (PND61-69) montrent des performances accrues chez ces mêmes femelles comparées au groupe témoin (« amélioration » des capacités de mémoire à long terme). **A PND 21, les mâles du groupe exposé à une concentration en NP de 200mg/kg/j présentaient une concentration en T3 libre plasmatique significativement plus élevée que celle du groupe contrôle.** Cependant aucune corrélation n'a été observée entre cette concentration en T3 et les autres paramètres de la fonction thyroïdienne étudiés. Parmi les tests du Fox battery, là encore aucune corrélation n'a été trouvée, cependant une corrélation négative a été constatée avec le jour d'ouverture des yeux qui était significativement avancé après exposition au NP. Aucune association entre la concentration de T3 et l'augmentation significative d'activité des mâles durant l'Open Field 1 (PND36) n'a été observée. Redei *et al.* (2001) ont constaté une augmentation de l'activité lors du test de l'Open Field chez des rats Wistar mâles traités avec de la T3 (100µg/kg/j durant deux semaines). Néanmoins, après analyse des concentrations hormonales (T3 T4 et TSH), les concentrations en T3 n'étaient pas corrélées à l'activité durant ce test. Les auteurs ont cependant observé que les concentrations en T4 étaient négativement corrélées à l'activité et positivement à la concentration en TSH. Dans notre cas, seule la concentration en T3 a été affectée par le traitement. Il apparaît donc difficile de conclure à un effet thyroïdo-dépendant. Généralement les études associent une hyperactivité à une hypothyroïdie, plus particulièrement une diminution de la T4 (Bergman *et al.*, 2013; Bernal, 2009). Cependant Ahmed *et al.* (Ahmed *et al.*, 2010) ont montré qu'une hyperthyroïdie maternelle (concentrations en T3 et T4 augmentées et diminuées en TSH) durant la lactation et la

gestation provoque chez le juvénile une augmentation des niveaux en hormones T3 et T4 libres sériques mais aussi une diminution de la taille de la glande thyroïde, une diminution du nombre et une augmentation de la taille des follicules thyroïdiens. Dans notre étude, la T4 libre n'a pas été quantifiée. Néanmoins, ces observations chez le juvénile semblent similaires à celles de la présente étude. Il aurait donc été intéressant de quantifier les concentrations des HT au cours de la gestation et de la lactation chez les mères mais également chez les juvéniles durant les 3 semaines d'allaitement afin de pouvoir tester l'hypothèse d'une hyperthyroïdie maternelle et chez la descendance, durant ces périodes sensibles pour la fonction thyroïdienne (Ahmed *et al.*, 2010).

Les données de l'exploration de la fonction thyroïdienne doivent être interprétées avec précaution jusqu'à la validation de celles-ci dans d'autres travaux. Néanmoins, même si elles ne semblent pas déterminantes dans la réponse aux différents tests de maturation physique et neuro-comportementaux, elles indiquent tout de même **des altérations de la fonction thyroïdienne et donc une action potentielle du nonylphénol sur celle-ci**. Par ailleurs, **l'utilisation de ces tests nous a permis de mettre en évidence des perturbations du développement neurologique. Il serait donc maintenant intéressant d'évaluer l'impact sur le juvénile d'une consommation de poissons (e.g. anguilles de l'estuaire) par des rates gestantes.**

Pour conclure, l'exposition à des composés de types perturbateurs thyroïdiens ou plus largement endocriniens et le risque associé semblent complètement inévitables dans notre société, en raison de leur ubiquité, leur persistance, et leur tendance à se bioaccumuler dans l'environnement et l'organisme. Ce travail a permis de caractériser l'état chimique de l'estuaire de la Loire dans trois matrices (sédiments, colonne d'eau et anguilles), en recherchant une soixantaine de composés de type PT avérés ou potentiels. Il a permis également d'associer la présence de ces composés à des effets biologiques (perturbations de l'homéostasie des HT et de l'expression de gènes spécifiques de la fonction thyroïdienne) mis en évidence chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*), une espèce majeure de l'estuaire. De toute évidence, la poursuite des recherches sur leurs effets, leurs métabolisations et leurs devenir dans l'environnement est nécessaire dans le but d'apporter les connaissances indispensables permettant d'évaluer les coûts et les bénéfices de leur omniprésence dans nos vies de tous les jours et de pouvoir prendre des mesures de protections adéquates lorsqu'elles

s'imposent. L'étude de la toxicité périnatale du nonylphénol a montré des perturbations du neuro-développement. Même s'il est difficile d'en déterminer les causes exactes, il ne faut toutefois pas négliger l'importance de la fonction thyroïdienne dans ces observations.

Références bibliographiques

- Ahmed, O.M. et al. 2008. Thyroid hormones states and brain development interactions. *Int. J. Devl Neuroscience* 26:147-209.
- Abdelouahab, N., Langlois, M.-F., Lavoie, L., Corbin, F., Pasquier, J.-C., and Takser, L. (2013). Maternal and cord-blood thyroid hormone levels and exposure to polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls during early pregnancy. *American Journal of Epidemiology* 178(5), 701-713.
- Abdelouahab, N., Mergler, D., Takser, L., Vanier, C., St-Jean, M., Baldwin, M., Spear, P. A., and Chan, H. M. (2008). Gender differences in the effects of organochlorines, mercury, and lead on thyroid hormone levels in lakeside communities of Quebec (Canada). *Environmental Research* 107(3), 380-392.
- Abdelouahab, N., Suvorov, A., Pasquier, J.-C., Langlois, M.-F., Praud, J.-P., and Takser, L. (2009). Thyroid disruption by low-dose BDE-47 in prenatally exposed lambs. *Neonatology* 96(2), 120-124.
- Abril, G., Etcheber, H., Delille, B., Frankignoulle, M., and Borges, A. V. (2003). Carbonate dissolution in the turbid and eutrophic Loire estuary. *Marine Ecology Progress Series* 259, 129-138.
- AFSSA (2008). Appui scientifique et technique de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des aliments relative au plan d'échantillonnage national des PCB dans les poissons de rivière : proposition de méthodologie. Report No. Saisine n° 2008-SA-0019. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA).
- Ahmed, O. M., Abd El-Tawab, S. M., and Ahmed, R. G. (2010). Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: I. The development of the thyroid hormones–neurotransmitters and adenosinergic system interactions. *International Journal of Developmental Neuroscience* 28(6), 437-454.
- Ahmed, O. M., El-Gareib, A. W., El-bakry, A. M., Abd El-Tawab, S. M., and Ahmed, R. G. (2008). Thyroid hormones states and brain development interactions. *International Journal of Developmental Neuroscience* 26(2), 147-209.
- Ahrens, L. (2011). Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. *Journal of Environmental Monitoring* 13(1), 20-31.
- Akutsu, K., Takatori, S., Nozawa, S., Yoshiike, M., Nakazawa, H., Hayakawa, K., Makino, T., and Iwamoto, T. (2008). Polybrominated Diphenyl Ethers in Human Serum and Sperm Quality. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80(4), 345-350.
- Albers, P. H. (2006). Birds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Avian and Poultry Biology Reviews* 17(4), 125-140.
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., and Rainbow, P. S. (2012). *Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects*. CRC Press.

- Andersen, M. E., Butenhoff, J. L., Chang, S.-C., Farrar, D. G., Kennedy, G. L., Lau, C., Olsen, G. W., Seed, J., and Wallace, K. B. (2008). Perfluoroalkyl acids and related chemistries—Toxicokinetics and modes of action. *Toxicological Sciences* 102(1), 3-14.
- Ariachery, A. (2013). Thyroid dysfunction and the heart. *Thyroid Research and Practice* 10(1), S24-S25.
- Armitage, J. M., MacLeod, M., and Cousins, I. T. (2009). Modeling the global fate and transport of perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanoate (PFO) emitted from direct sources using a multispecies mass balance model. *Environmental Science & Technology* 43(4), 1134-1140.
- Arnold, D. L., Stapley, R., Bryce, F., and Mahon, D. (1998). A multigeneration study to ascertain the toxicological effects of Great Lakes salmon fed to rats: study overview and design. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 27(1), S1-S7.
- Aroua, S., Schmitz, M., Baloche, S., Vidal, B., Rousseau, K., and Dufour, S. (2005). Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. *Neuroendocrinology* 82(3-4), 221-232.
- Austin, M. E., Kasturi, B. S., Barber, M., Kannan, K., MohanKumar, P. S., and MohanKumar, S. M. (2003). Neuroendocrine effects of perfluorooctane sulfonate in rats. *Environmental Health Perspectives* 111(12), 1485-1489.
- Balch, G. C., Vélez-Espino, L. A., Sweet, C., Alae, M., and Metcalfe, C. D. (2006). Inhibition of metamorphosis in tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Chemosphere* 64(2), 328-338.
- Ballschmiter, K., and Zell, M. (1980). Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* 302(1), 20-31.
- Bansal, R., You, S.-H., Herzig, C. T. A., and Zoeller, R. T. (2005). Maternal thyroid hormone increases HES expression in the fetal rat brain: An effect mimicked by exposure to a mixture of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Developmental Brain Research* 156(1), 13-22.
- Bekki, K., Takigami, H., Suzuki, G., Tang, N., and Hayakawa, K. (2009). Evaluation of toxic activities of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives using in vitro bioassays. *Journal of Health Science* 55(4), 601-610.
- Belpaire, C., Geeraerts, C., Evans, D., Ciccotti, E., and Poole, R. (2011). The European eel quality database: towards a pan-European monitoring of eel quality. *Environmental Monitoring and Assessment* 183(1-4), 273-284.
- Belpaire, C., and Goemans, G. (2007a). Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES Journal of Marine Science* 64(7), 1423-1436.
- Belpaire, C., and Goemans, G. (2007b). The European eel *Anguilla anguilla*, a rapporteur of the chemical status for the water framework directive? *Life and Environment* 57(4), 235-252.
- Belpaire, C., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., and Parmentier, K. (2008). Pollution fingerprints in eels as models for the chemical status of rivers. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 65(8), 1483-1491.

- Bennett, E. R., and Metcalfe, C. D. (2000). Distribution of degradation products of alkylphenol ethoxylates near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, North America. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(4), 784-792.
- Bergman, A., Jerrold, J. H., Susan, J., and Karen, A. (2013). State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012. In (pp. 260p. United Nations Environment Programme (UNEP) and the World Health Organization (WHO).
- Bernal, J. (2009). Thyroid hormones in brain development and function. *Thyroid Manager*. www.thyroidmanager.org-Updated.
- Bernal, J., and Nunez, J. (1995). Thyroid hormones and brain development. *European Journal of Endocrinology* 133(4), 390-398.
- Bettinetti, R., Galassi, S., Quadroni, S., Volta, P., Capoccioni, F., Ciccotti, E., and De Leo, G. A. (2011). Use of *Anguilla anguilla* for biomonitoring Persistent Organic Pollutants (POPs) in brackish and riverine waters in central and southern Italy. *Water, Air, & Soil Pollution* 217(1-4), 321-331.
- Blanchet-Letrouvé, I., Zalouk-Vergnoux, A., Vénisseau, A., Couderc, M., Le Bizec, B., Elie, P., Herrenknecht, C., Mouneyrac, C., and 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(0), 562-571.
- Blanco, J., Mulero, M., Heredia, L., Pujol, A., Domingo, J. L., and Sánchez, D. J. (2013). Perinatal exposure to BDE-99 causes learning disorders and decreases serum thyroid hormone levels and BDNF gene expression in hippocampus in rat offspring. *Toxicology* 308(0), 122-128.
- Blanton, M. L., and Specker, J. L. (2007). The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *CRC Critical Reviews in Toxicology* 37(1-2), 97-115.
- Bloom, M. S., Kannan, K., Spliethoff, H. M., Tao, L., Aldous, K. M., and Vena, J. E. (2010). Exploratory assessment of perfluorinated compounds and human thyroid function. *Physiology & Behavior* 99(2), 240-245.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., and Main, K. M. (2012). Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology* 355(2), 240-248.
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., Skakkebæk, N. E., and Main, K. M. (2006). Environmental chemicals and thyroid function. *European Journal of Endocrinology* 154(5), 599-611.
- Bodin, N., Tapie, N., Le Ménach, K., Chassot, E., Elie, P., Rochard, E., and Budzinski, H. (2014). PCB contamination in fish community from the Gironde Estuary (France): Blast from the past. *Chemosphere* 98(0), 66-72.
- Boëtius, I., and Boëtius, J. (1980). Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1, 1-28.

- Bonhommeau, S., Chassot, E., and Rivot, E. (2008). Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea. *Fisheries Oceanography* 17(1), 32-44.
- Boucher, O., Muckle, G., and Bastien, C. H. (2009). Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls: a neuropsychologic analysis. *Environmental Health Perspectives* 117(1), 7-16.
- Bowers, W. J., Nakai, J. S., Chu, I., Wade, M. G., Moir, D., Yagminas, A., Gill, S., Pulido, O., and Mueller, R. (2004). Early developmental neurotoxicity of a PCB/Organochlorine mixture in rodents after gestational and lactational exposure. *Toxicological Sciences* 77(1), 51-62.
- Braathen, M., Derocher, A. E., Wiig, Ø., Sørmo, E. G., Lie, E., Skaare, J. U., and Jenssen, B. M. (2004). Relationships between PCBs and thyroid hormones and retinol in female and male polar bears. *Environmental Health Perspectives* 112(8), 826-833.
- Bragigand, V., Amiard-Triquet, C., Parlier, E., Boury, P., Marchand, P., and El Hourch, M. (2006). Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries. *Science of The Total Environment* 368(2-3), 615-626.
- Branchi, I., Capone, F., Alleva, E., and Costa, L. G. (2003). Polybrominated Diphenyl Ethers: Neurobehavioral Effects Following Developmental Exposure. *Neurotoxicology* 24(3), 449-462.
- Brar, N. K., Waggoner, C., Reyes, J. A., Fairey, R., and Kelley, K. M. (2010). Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures. *Aquatic Toxicology* 96(3), 203-215.
- Breteler, M. M. B., Van Duijn, C. M., Chandra, V., Fratiglioni, L., Graves, A. B., Heyman, A., Jorm, A. F., Kokmen, E., Kondo, K., and Mortimer, J. A. (1991). Medical history and the risk of Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. *International Journal of Epidemiology* 20(Supplement 2), 36-42.
- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Kammann, U., Hennig, M., Kuckelkorn, J., Chinoraks, M., Cofalla, C., Wiseman, S., Giesy, J. P., Schäffer, A., Hecker, M., Wölz, J., Schüttrumpf, H., and Hollert, H. (2013). How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquatic Toxicology* 128-129(0), 13-24.
- Brown, S. B., Adams, B. A., Cyr, D. G., and Eales, J. G. (2004). Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(7), 1680-1701.
- Brucker-Davis, F. (1998). Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid* 8(9), 827-856.
- Buck, R. C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J. M., Cousins, I. T., de Voogt, P., Jensen, A. A., Kannan, K., Mabury, S. A., and van Leeuwen, S. P. J. (2011). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7(4), 513-541.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Lardy, S., Augagneur, S., and Budzinski, H. (2007). Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of

- the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïd, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* 70(2), 281-287.
- Carlsson, G., Kulkarni, P., Larsson, P., and Norrgren, L. (2007). Distribution of BDE-99 and effects on metamorphosis of BDE-99 and -47 after oral exposure in *Xenopus tropicalis*. *Aquatic Toxicology* 84(1), 71-79.
- Carr, J. A., and Patiño, R. (2011). The hypothalamus–pituitary–thyroid axis in teleosts and amphibians: endocrine disruption and its consequences to natural populations. *General and Comparative Endocrinology* 170(2), 299-312.
- Carr, R., Bertasi, F., Betancourt, A., Bowers, S., Gandy, B. S., Ryan, P., and Willard, S. (2003). Effect of neonatal rat bisphenol a exposure on performance in the Morris water maze. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 66(21), 2077-2088.
- Castonguay, M., Hodson, P. V., Moriarty, C., Drinkwater, K. F., and Jessop, B. M. (1994). Is there a role of ocean environment in American and European eel decline? *Fisheries Oceanography* 3(3), 197-203.
- Cesh, L. S., Elliott, K. H., Quade, S., McKinney, M. A., Maisoneuve, F., Garcelon, D. K., Sandau, C. D., Letcher, R. J., Williams, T. D., and Elliott, J. E. (2010). Polyhalogenated aromatic hydrocarbons and metabolites: Relation to circulating thyroid hormone and retinol in nestling bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(6), 1301-1310.
- Chan, S., and Kilby, M. (2000). Thyroid hormone and central nervous system development. *Journal of Endocrinology* 165(1), 1-8.
- Chang, L., Munro, S. L., Richardson, S. J., and Schreiber, G. (1999). Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals. *European Journal of Biochemistry* 259(1-2), 534-542.
- Chang, S., Thibodeaux, J., Eastvold, M., Ehresman, D., Bjork, J., Froehlich, J., Lau, C., Singh, R., Wallace, K., and Butenhoff, J. (2008). Thyroid hormone status and pituitary function in adult rats given oral doses of perfluorooctanesulfonate (PFOS). *Toxicology* 243(3), 330-339.
- Chauhan, K. R., Kodavanti, P. R. S., and McKinney, J. D. (2000). Assessing the Role of ortho-Substitution on Polychlorinated Biphenyl Binding to Transthyretin, a Thyroxine Transport Protein. *Toxicology and Applied Pharmacology* 162(1), 10-21.
- Chen, C.-H., Chou, P.-H., Kawanishi, M., and Yagi, T. (2014). Occurrence of xenobiotic ligands for retinoid X receptors and thyroid hormone receptors in the aquatic environment of Taiwan. *Marine Pollution Bulletin* <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.01.025>.
- Chevrier, J., Eskenazi, B., Bradman, A., Fenster, L., and Barr, D. B. (2007). Associations between prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and neonatal thyroid-stimulating hormone levels in a Mexican-American population, Salinas Valley, California. *Environmental Health Perspectives* 115(10), 1490-1496.
- Chevrier, J., Eskenazi, B., Holland, N., Bradman, A., and Barr, D. B. (2008). Effects of exposure to polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides on thyroid function during pregnancy. *American Journal of Epidemiology* 168(3), 298-310.

- Chevrier, J., Gunier, R. B., Bradman, A., Holland, N. T., Calafat, A. M., Eskenazi, B., and Harley, K. G. (2013). Maternal urinary bisphenol A during pregnancy and maternal and neonatal thyroid function in the CHAMACOS study. *Environmental Health Perspectives* 121(1), 138-144.
- Chevrier, J., Harley, K. G., Bradman, A., Gharbi, M., Sjödin, A., and Eskenazi, B. (2010). Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and thyroid hormone during pregnancy. *Environmental Health Perspectives* 118(10), 1444-1449.
- Chiba, I., Sakakibara, A., Goto, Y., Isono, T., Yamamoto, Y., Iwata, H., Tanabe, S., Shimazaki, K., Akahori, F., Kazusaka, A., and Fujita, S. (2001). Negative correlation between plasma thyroid hormone levels and chlorinated hydrocarbon levels accumulated in seals from the coast of Hokkaido, Japan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(5), 1092-1097.
- CITES (2007). Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. Consideration of Proposals for Amendment of Appendices I and II. Fourteenth Meeting of the Conference of the Parties. The Hague, The Netherlands, 3–15 June 2007, 39 p.
- Commendatore, M. G., Nievas, M. L., Amin, O., and Esteves, J. L. (2012). Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in coastal sediments from the Ushuaia Bay (Tierra del Fuego, Patagonia, Argentina). *Marine Environmental Research* 74(0), 20-31.
- Corrieri, L., Della Seta, D., Canoine, V., and Fusani, L. (2007). Developmental exposure to xenoestrogen enhances spatial learning in male rats. *Hormones and Behavior* 51(5), 620-625.
- Costa, L., and Giordano, G. (2007). Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* 28(6), 1047-1067.
- Covaci, A., Bervoets, L., Hoff, P., Voorspoels, S., Voets, J., Van Campenhout, K., Blust, R., and Schepens, P. (2005). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in freshwater mussels and fish from Flanders, Belgium. *Journal of Environmental Monitoring* 7(2), 132-136.
- Criqui (2006). Influence de la liaison des hormones thyroïdiennes aux protéines plasmatiques sur l'homéostasie de la fonction thyroïdienne. Thèse vétérinaire, Université Paul Sabatier, Toulouse.
- Crofton, K. M., Craft, E. S., Hedge, J. M., Gennings, C., Simmons, J. E., Carchman, R. A., Carter Jr, W. H., and DeVito, M. J. (2005). Thyroid-hormone-disrupting chemicals: evidence for dose-dependent additivity or synergism. *Environmental Health Perspectives* 113(11), 1549-1554.
- Crofton, K. M., Kodavanti, P. R. S., Derr-Yellin, E. C., Casey, A. C., and Kehn, L. S. (2000). PCBs, Thyroid Hormones, and Ototoxicity in Rats: Cross-Fostering Experiments Demonstrate the Impact of Postnatal Lactation Exposure. *Toxicological Sciences* 57(1), 131-140.
- Cyr, D. G., and Eales, J. G. (1996). Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 6(2), 165-200.
- D'Hooze, R., and De Deyn, P. P. (2001). Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 36(1), 60-90.
- Dallaire, R., Dewailly, É., Pereg, D., Dery, S., and Ayotte, P. (2009). Thyroid function and plasma concentrations of polyhalogenated compounds in Inuit adults. *Environmental Health Perspectives* 117(9), 1380-1386.

- Damstra, T., Barlow, S., Bergman, A., Kavlock, R., and Van Der Kraak, G. (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. Geneva: World Health Organization.
- Dargnat, C., and Fisson, C. (2010). GIP Seine Aval. Les PolyChloroBiphényles (PCB) dans le bassin de la Seine et son estuaire. 14p.
- Darnerud, P., Aune, M., Larsson, L., and Hallgren, S. (2007). Plasma PBDE and thyroxine levels in rats exposed to Bromkal or BDE-47. *Chemosphere* 67(9), S386-S392.
- Darnerud, P. O. (2003). Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment International* 29(6), 841-853.
- Darnerud, P. O. (2008). Brominated flame retardants as possible endocrine disruptors. *International Journal of Andrology* 31(2), 152-160.
- Dauvin, J.-C. (2008). The main characteristics, problems, and prospects for Western European coastal seas. *Marine Pollution Bulletin* 57(1-5), 22-40.
- Daverat, F., Elie, P., and Lahaye, M. (2004). Première caractérisation des histoires de vie des anguilles (*Anguilla anguilla*) occupant la zone aval du bassin versant Gironde-Garonne-Dordogne: Apport d'une méthode de microchimie. *Cybium* 28(1), 83-90.
- Daverat, F., Tapie, N., Quiniou, L., Maury Brachet, R., Riso, R., Eon, M., Laroche, J., and Budzinski, H. (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.
- David, A., Fenet, H., and Gomez, E. (2009). Alkylphenols in marine environments: Distribution monitoring strategies and detection considerations. *Marine Pollution Bulletin* 58(7), 953-960.
- De Boer, J., and Brinkman, U. A. T. (1994). The use of fish as biomonitors for the determination of contamination of the aquatic environment by persistent organochlorine compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 13(9), 397-404.
- De Luze, A., Sachs, L., and Demeneix, B. (1993). Thyroid hormone-dependent transcriptional regulation of exogenous genes transferred into *Xenopus* tadpole muscle in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(15), 7322-7326.
- de Wit, C. A. (2002). An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46(5), 583-624.
- Dekker, W. (2003). Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology* 10(6), 365-376.
- Dekker, W. (2008). Coming to grips with the eel stock slip-sliding away. International governance of fisheries ecosystems: learning from the past, finding solutions for the future. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 335-355.
- DeVito, M., Biegel, L., Brouwer, A., Brown, S., Brucker-Davis, F., Cheek, A. O., Christensen, R., Colborn, T., Cooke, P., Crissman, J., Crofton, K., Doerge, D., Gray, E., Hauser, P., Hurley, P., Kohn, M., Lazar, J., McMaster, S., McClain, M., McConnell, E., Meier, C., Miller, R.,

- Tietge, J., and Tyl, R. (1999). Screening methods for thyroid hormone disruptors. *Environmental Health Perspectives* 107(5), 407-415.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., and Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30(4), 293-342.
- Dodds, E. C., Goldberg, L., Lawson, W., and Robinson, R. (1938). Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* 141(3562), 247-248.
- Dodds, E. C., and Lawson, W. (1936). Synthetic strogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137, 996-996.
- Domingo, J. L. (2012). Health risks of dietary exposure to perfluorinated compounds. *Environment International* 40, 187-195.
- Donahue, D. A., Dougherty, E. J., and Meserve, L. A. (2004). Influence of a combination of two tetrachlorobiphenyl congeners (PCB 47; PCB 77) on thyroid status, choline acetyltransferase (ChAT) activity, and short- and long-term memory in 30-day-old Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 203(1-3), 99-107.
- Eales, J. G., and Brown, S. B. (1993). Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3(4), 299-347.
- Edeline, E., Dufour, S., Briand, C., Fatin, D., and Elie, P. (2004). Thyroid status is related to migratory behavior in *Anguilla anguilla* glass eels. *Marine Ecology Progress Series* 282, 261-270.
- Ege, V. (1939). A revision of the genus *Anguilla* SHAW, a systematic, phylogenetic and geographical study. *Dana Reports* 16, 1-256.
- Eisler, R. (1987). Polycyclic aromatic hydrocarbon hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC, Biological Report 85(1.11), 55pp.
- El Majidi, N., Bouchard, M., and Carrier, G. (2014). Systematic analysis of the relationship between standardized biological levels of polychlorinated biphenyls and thyroid function in pregnant women and newborns. *Chemosphere* 98(0), 1-17.
- Emmett, E. A., Shofer, F. S., Zhang, H., Freeman, D., Desai, C., and Shaw, L. M. (2006). Community exposure to perfluorooctanoate: relationships between serum concentrations and exposure sources. *Journal of occupational and environmental medicine/American College of Occupational and Environmental Medicine* 48(8), 759-770.
- Erickson, M. D., and Kaley, R. G. I. (2011). Applications of polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Pollution Research* 18(2), 135-151.
- Etcheber, H., Taillez, A., Abril, G., Garnier, J., Servais, P., Moatar, F., and Commarieu, M.-V. (2007). Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde, Loire and Seine estuaries: origin and lability. *Hydrobiologia* 588(1), 245-259.

- European Commission (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. Official Journal of the European Communities L327, 1-72.
- European Commission (2008). Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union L 348, 84-97.
- European Commission (2013). Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Official Journal of the European Union L 226, 1-17.
- European Food Safety Authority (2008). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food chain on Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts. EFSA Journal 653, 1-131.
- European Union (2003). Directive 2003/53/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2003 amending for the 26th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (nonylphenol, nonylphenol ethoxylate and cement). Official Journal of the European Union 178, 24-27.
- European Union (2007). Council Regulation (EC) No 1100/2007 of 18 September 2007 establishing measures for the recovery of the stock of European eel. Official Journal of the European Union 258, 17-23.
- European Union (2011). Directive 2011/65/EU of the European Parliament and of the Council of 8 June 2011 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. Official Journal of the European Union 174, 88-110.
- Faroon, O., and Olson, J. N. (2000). Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Feeley, M. M., and Jordan, S. A. (1998). Dietary and tissue residue analysis and contaminant intake estimations in rats consuming diets composed of Great Lakes salmon: a multigeneration study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 27(1), S8-S17.
- Féral, C. F. (1982). Etude expérimentale des mécanismes assurant l'apparition, le maintien et le cycle d'un tractus génital mâle externe chez les femelles de *Nucella lapillus* (L), *Nassarius reticulatus* (L), *Ocenebra erinacea* (L), Mollusques néogastéropodes gonochoriques. . Thèse de doctorat, Université de Caen, Caen.
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufik, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, J. L., and Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology* 24(2), 259-264.
- Fernie, K. J., Shutt, J. L., Mayne, G., Hoffman, D., Letcher, R. J., Drouillard, K. G., and Ritchie, I. J. (2005). Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): changes in thyroid, vitamin A, glutathione homeostasis, and oxidative stress in American Kestrels (*Falco sparverius*). *Toxicological Sciences* 88(2), 375-383.

- Feunteun, E. (2002). Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. *Ecological Engineering* 18(5), 575-591.
- Field, J. B. (1968). Studies on the mechanism of action of thyroid-stimulating hormone. *Metabolism Clinical and Experimental* 17(3), 226-245.
- Fini, J.-B., Le Mével, S., Turque, N., Palmier, K., Zalko, D., Cravedi, J.-P., and Demeneix, B. A. (2007). An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption. *Environmental Science & Technology* 41(16), 5908-5914.
- Fini, J. B., Mével, S. L., Palmier, K., Darras, V. M., Punzon, I., Richardson, S. J., Clerget-Froidevaux, M. S., and Demeneix, B. A. (2012). Thyroid hormone signaling in the *Xenopus laevis* embryo is functional and susceptible to endocrine disruption. *Endocrinology* 153(10), 5068-5081.
- Fliers, E., Alkemade, A., Wiersinga, W. M., and Swaab, D. F. (2006). Hypothalamic thyroid hormone feedback in health and disease. In *Progress in Brain Research* (E. F. M. A. H. D. F. S. E. J. W. v. S. A. Kalsbeek, and R. M. Buijs, Eds.), Vol. Volume 153, pp. 189-207. Elsevier.
- Fliers, E., Kalsbeek, A., and Boelen, A. (2014). Mechanisms in endocrinology: Beyond the fixed setpoint of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *European Journal of Endocrinology*, eje-14-0285.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., and Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management* 104(0), 19-34.
- Flynn, K. M., Newbold, R. R., and Ferguson, S. A. (2002). Multigenerational exposure to dietary nonylphenol has no severe effects on spatial learning in female rats. *Neurotoxicology* 23(1), 87-94.
- Fox, W. M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Animal Behaviour* 13(2-3), 234-235.
- Fromme, H., Tittlemier, S. A., Völkel, W., Wilhelm, M., and Twardella, D. (2009). Perfluorinated compounds – Exposure assessment for the general population in western countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 212(3), 239-270.
- Fry, D. M. (1995). Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environmental Health Perspectives* 103(Suppl 7), 165-171.
- Fujimoto, T., Kubo, K., and Aou, S. (2006). Prenatal exposure to bisphenol A impairs sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats. *Brain Research* 1068(1), 49-55.
- Gauger, K. J., Kato, Y., Haraguchi, K., Lehmler, H.-J., Robertson, L. W., Bansal, R., and Zoeller, R. T. (2004). Polychlorinated biphenyls (PCBs) exert thyroid hormone-like effects in the fetal rat brain but do not bind to thyroid hormone receptors. *Environmental Health Perspectives* 112(5), 516-523.
- Gauger, K. J., Sharlin, D. S., and Zoeller, R. T. (2007). Polychlorinated biphenyls as disruptors of thyroid hormone action. Hansen, L ed. University of Illinois press - Champagne-Urbana.

- Gentes, M.-L., McNabb, A., Waldner, C., and Smits, J. G. (2007). Increased thyroid hormone levels in tree swallows (*Tachycineta bicolor*) on reclaimed wetlands of the Athabasca Oil Sands. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53(2), 287-292.
- Gentilcore, D., Porreca, I., Rizzo, F., Ganbaatar, E., Carchia, E., Mallardo, M., De Felice, M., and Ambrosino, C. (2013). Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression. *Toxicology* 304(0), 21-31.
- Gerstenberger, S. L., Heimler, I., Smies, R., Hutz, R. J., Dasmahapatra, A. K., Tripoli, V., and Dellinger, J. A. (2000). Minimal endocrine alterations in rodents after consumption of lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38(3), 371-376.
- Ghisari, M., and Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2009). Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicology Letters* 189(1), 67-77.
- Giesy, J. P., and Kannan, K. (2001). Global distribution of perfluorooctane sulfonate in wildlife. *Environmental Science & Technology* 35(7), 1339-1342.
- Gilroy EA, Muir DG, McMaster ME, Darling C, Campbell LM, de Solla SR, et al. Polychlorinated biphenyls and their hydroxylated metabolites in wild fish from Wheatley Harbour Area of Concern, Ontario, Canada. *Environ Toxicol Chem* 2012; 31: 2788-97.
- Göktekin, E., and Barlas, N. (2008). Histopathological effects of 4-tert-octylphenol treatment through the pregnancy period, on the pituitary, adrenal, pancreas, thyroid and parathyroid glands of offspring rats at adulthood. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26(2), 199-205.
- Gonçalves, C. R., Cunha, R. W., Barros, D. M., and Martínez, P. E. (2010). Effects of prenatal and postnatal exposure to a low dose of bisphenol A on behavior and memory in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30(2), 195-201.
- Gouzy, A. (2011). INERIS. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Les PolyChloroBiphenyles (PCB). 89p.
- Greenwood, R., Mills, G., and Vrana, B. (2007). Passive sampling techniques in environmental monitoring. In *Comprehensive Analytical Chemistry* (D. Barceló, Ed.) Eds.), Vol. 48, pp. 176-182. Elsevier.
- Grosbois, C., Meybeck, M., Lestel, L., Lefèvre, I., and Moatar, F. (2012). Severe and contrasted polymetallic contamination patterns (1900–2009) in the Loire River sediments (France). *Science of The Total Environment* 435–436(0), 290-305.
- Groupe d'Intérêt Public (GIP) (n.d.). GIP Loire-Estuaire, groupe d'intérêt public. Retrieved August 16, 2014, from <http://www.loire-estuaire.org>.
- Grubbs, F. E. (1950). Sample criteria for testing outlying observations. *The Annals of Mathematical Statistics*, 27-58.
- Guillaud, J.-F., Aminot, A., Delmas, D., Gohin, F., Lunven, M., Labry, C., and Herbland, A. (2008). Seasonal variation of riverine nutrient inputs in the northern Bay of Biscay (France), and patterns of marine phytoplankton response. *Journal of Marine Systems* 72(1–4), 309-319.

- Guillette Jr, L. J., Gross, T. S., Gross, D. A., Rooney, A. A., and Percival, H. F. (1995). Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. *Environmental Health Perspectives* 103(Suppl 4), 31-36.
- Guillette Jr, L. J., Gross, T. S., Masson, G. R., Matter, J. M., Percival, H. F., and Woodward, A. R. (1994). Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environmental Health Perspectives* 102(8), 680-688.
- Guitart, C., Slattery, M., Ankisetty, S., Radwan, M., Ross, S. J., Letcher, R. J., and Reddy, C. M. (2011). Contemporary ¹⁴C radiocarbon levels of oxygenated polybrominated diphenyl ethers (O-PBDEs) isolated in sponge–cyanobacteria associations. *Marine Pollution Bulletin* 62(3), 631-636.
- Gutleb, A. C., Appelman, J., Bronkhorst, M., van den Berg, J. H. J., and Murk, A. J. (2000). Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*). *Science of The Total Environment* 262(1–2), 147-157.
- Gutshall, D. M., Pilcher, G. D., and Langley, A. E. (1988). Effect of thyroxine supplementation on the response to perfluoro-n-decanoic acid (PFDA) in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 24(4), 491-498.
- Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Allan, W. C., Williams, J. R., Knight, G. J., Gagnon, J., O'Heir, C. E., Mitchell, M. L., Hermos, R. J., Waisbren, S. E., Faix, J. D., and Klein, R. Z. (1999). Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child. *New England Journal of Medicine* 341(8), 549-555.
- Hagmar, L., Björk, J., Sjödin, A., Bergman, Å., and Erfurth, E. M. (2001a). Plasma levels of persistent organohalogenes and hormone levels in adult male humans. *Archives of Environmental Health: An International Journal* 56(2), 138-143.
- Hagmar, L., Rylander, L., Dyremark, E., Klasson-Wehler, E., and Erfurth, E. M. (2001b). Plasma concentrations of persistent organochlorines in relation to thyrotropin and thyroid hormone levels in women. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 74(3), 184-188.
- Hale, R. C., Smith, C. L., de Fur, P. O., Harvey, E., Bush, E. O., La Guardia, M. J., and Vadas, G. G. (2000). Nonylphenols in sediments and effluents associated with diverse wastewater outfalls. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(4), 946-952.
- Hallgren, S., Sinjari, T., Hakansson, H., and Darnerud, P. O. (2001). Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Archives of Toxicology* 75(4), 200-208.
- Hamers, T., Kamstra, J. H., Sonneveld, E., Murk, A. J., Kester, M. H. A., Andersson, P. L., Legler, J., and Brouwer, A. (2006). In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicological Sciences* 92(1), 157-173.
- Haraguchi, K., Kato, Y., Ohta, C., Koga, N., and Endo, T. (2011). Marine Sponge: A Potential Source for Methoxylated Polybrominated Diphenyl Ethers in the Asia-Pacific Food Web. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(24), 13102-13109.

- Harder, S., Dammann, O., Buck, F., Zwiers, H., Lederis, K., Richter, D., and Bruhn, T. O. (2001). Cloning of two thyrotropin-releasing hormone receptor subtypes from a lower vertebrate (*Catostomus commersoni*): functional expression, gene structure, and evolution. *General and Comparative Endocrinology* 124(2), 236-245.
- Harman, C., Tollefsen, K. E., Bøyum, O., Thomas, K., and Grung, M. (2008). Uptake rates of alkylphenols, PAHs and carbazoles in semipermeable membrane devices (SPMDs) and polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Chemosphere* 72(10), 1510-1516.
- Harvey, C. B., and Williams, G. R. (2002). Mechanism of thyroid hormone action. *Thyroid* 12(6), 441-446.
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., and Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(8), 5476-5480.
- He, C., Zuo, Z., Shi, X., Sun, L., and Wang, C. (2012). Pyrene exposure influences the thyroid development of *Sebastiscus marmoratus* embryos. *Aquatic Toxicology* 124–125(0), 28-33.
- Hekster, F., Laane, R. P. M., and de Voogt, P. (2003). Environmental and Toxicity Effects of Perfluoroalkylated Substances. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 179, pp. 99-121. Springer New York.
- Hertz-Picciotto, I., Park, H.-Y., Dostal, M., Kocan, A., Trnovec, T., and Sram, R. (2008). Prenatal exposures to persistent and non-persistent organic compounds and effects on immune system development. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 102(2), 146-154.
- Heuland, E., Germaux, M.-A., Galineau, L., Chalon, S., and Belzung, C. (2010). Prenatal MDMA exposure delays postnatal development in the rat: A preliminary study. *Neurotoxicology and Teratology* 32(4), 425-431.
- Hooper, K., and McDonald, T. A. (2000). The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental Health Perspectives* 108(5), 387-392.
- Houtman, C. J., Cenijn, P. H., Hamers, T., Lamoree, M. H., Legler, J., Murk, A. J., and Brouwer, A. (2004). Toxicological profiling of sediments using in vitro bioassays, with emphasis on endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(1), 32-40.
- Howdeshell, K. L. (2002). A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system. *Environmental Health Perspectives* 110(Suppl 3), 337-348.
- Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., and Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International* 42(0), 91-99.
- ICES (2013). Advice November 2013: Widely distributed and migratory stocks - European eel. ICES Advice 2013 Book 9(9.4.7.), 1-7.
- INERIS (2005). Etude de l'analyse des Alkylphénols-Rapport final du 25 février 2005- Convention DE n°CV04000107. Rapport INERIS, 1-40.

- INERIS (2012). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : Pentabromodiphényléthers. 43 p.
- Inui, Y., Yamano, K., and Miwa, S. (1995). The role of thyroid hormone in tissue development in metamorphosing flounder. *Aquaculture* 135(1-3), 87-98.
- Ishido, M., Morita, M., Oka, S., and Masuo, Y. (2005). Alteration of gene expression of G protein-coupled receptors in endocrine disruptors-caused hyperactive rats. *Regulatory Peptides* 126(1-2), 145-153.
- Ishihara, A., Nishiyama, N., Sugiyama, S.-i., and Yamauchi, K. (2003). The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *General and Comparative Endocrinology* 134(1), 36-43.
- Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K., Boonyatumanond, R., and Zakaria, M. (2007). Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in South and Southeast Asian mussels. *Environmental Monitoring and Assessment* 135(1-3), 423-440.
- Iwamuro, S., Sakakibara, M., Terao, M., Ozawa, A., Kurobe, C., Shigeura, T., Kato, M., and Kikuyama, S. (2003). Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. *General and Comparative Endocrinology* 133(2), 189-198.
- Iwasaki, T., Miyazaki, W., Takeshita, A., Kuroda, Y., and Koibuchi, N. (2002). Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone-induced transactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299(3), 384-388.
- Janošek, J., Hilscherová, K., Bláha, L., and Holoubek, I. (2006). Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicology in Vitro* 20(1), 18-37.
- Ji, K., Kim, S., Kho, Y., Paek, D., Sakong, J., Ha, J., Kim, S., and Choi, K. (2012). Serum concentrations of major perfluorinated compounds among the general population in Korea: Dietary sources and potential impact on thyroid hormones. *Environment International* 45(0), 78-85.
- Jie, X., JianMei, L., Zheng, F., Lei, G., Biao, Z., and Jie, Y. (2013). Neurotoxic effects of nonylphenol: a review. *Wiener klinische Wochenschrift* 125(3-4), 61-70.
- Jie, X., Yang, W., Jie, Y., Hashim, J. H., Liu, X.-Y., Fan, Q.-Y., and Yan, L. (2010). Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth Defects Research, Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 89(5), 418-428.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., and Sumpter, J. P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives* 103(6), 582-587.
- Jobling, S., Sumpter, J. P., Sheahan, D., Osborne, J. A., and Matthiessen, P. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(2), 194-202.

- Jonasson, Z. (2005). Meta-analysis of sex differences in rodent models of learning and memory: a review of behavioral and biological data. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 28(8), 811-825.
- Jordan, S. A., and Feeley, M. M. (1999). PCB congener patterns in rats consuming diets containing Great Lakes salmon: analysis of fish, diets, and adipose tissue. *Environmental Research* 80(2), S207-S212.
- Jørgensen, E. H., Aas-Hansen, Ø., Maule, A. G., Strand, J. E. T., and Vijayan, M. M. (2004). PCB impairs smoltification and seawater performance in anadromous Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 138(2), 203-212.
- Jugan, M.-L., Levi, Y., and Blondeau, J.-P. (2010). Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. *Biochemical Pharmacology* 79(7), 939-947.
- Jugan, M. L., Lévy-Bimbot, M., Pomérance, M., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J. P., and Lévi, Y. (2007). A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor. *Toxicology in Vitro* 21(6), 1197-1205.
- Julander, A., Karlsson, M., Hagström, K., Ohlson, C. G., Engwall, M., Bryngelsson, I. L., Westberg, H., and van Bavel, B. (2005). Polybrominated diphenyl ethers—plasma levels and thyroid status of workers at an electronic recycling facility. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 78(7), 584-592.
- Kalra, S., Kalra, B., Sharma, A., Kumar, A., Ahalawat, A., Agrawal, N., and Colborn, T. (2010). Environmental thyroid disruptors. *Thyroid Research and Practice* 7, 69-75.
- Kannan, N., Tanabe, S., and Tatsukawa, R. (1988). Toxic potential of non-ortho and mono-ortho coplanar PCBs in commercial PCB preparations: “2,3,7,8-T4 CDD toxicity equivalence factors approach”. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 41(2), 267-276.
- Kashiwagi, A., Utsumi, K., Kashiwagi, K., Ohta, S., Sugihara, K., Hanada, H., and Kitamura, S. (2008). Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Amphibian Metamorphosis and Mitochondrial Membrane Permeability Transition. *Journal of Health Science* 54(3), 273-280.
- Kavlock, R. J., Daston, G. P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L. E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M. J., and Maczka, C. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104(Suppl 4), 715-740.
- Kawakami, Y., Seoka, M., Miyashita, S., Kumai, H., and Ohta, H. (2006a). Characterization of transthyretin in the Pacific Bluefin Tuna, *Thunnus orientalis*. *Zoological Science* 23(5), 443-448.
- Kawakami, Y., Shin, D.-H., Kitano, T., Adachi, S., Yamauchi, K., and Ohta, H. (2006b). Transactivation activity of thyroid hormone receptors in fish (Conger myriaster) in response to thyroid hormones. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 144(4), 503-509.

- Kennedy, G. L., Butenhoff, J. L., Olsen, G. W., O'Connor, J. C., Seacat, A. M., Perkins, R. G., Biegel, L. B., Murphy, S. R., and Farrar, D. G. (2004). The toxicology of perfluorooctanoate. *Critical Reviews in Toxicology* 34(4), 351-384.
- Key, B. D., Howell, R. D., and Criddle, C. S. (1997). Fluorinated Organics in the Biosphere. *Environmental Science & Technology* 31(9), 2445-2454.
- Kim, H. S., Shin, J.-H., Moon, H. J., Kang, I. H., Kim, T. S., Kim, I. Y., Seok, J.-H., Pyo, M.-Y., and Han, S. Y. (2002). Comparative estrogenic effects of p-nonylphenol by 3-day uterotrophic assay and female pubertal onset assay. *Reproductive Toxicology* 16(3), 259-268.
- Kim, S., Choi, K., Ji, K., Seo, J., Kho, Y., Park, J., Kim, S., Park, S., Hwang, I., Jeon, J., Yang, H., and Giesy, J. P. (2011). Trans-Placental Transfer of Thirteen Perfluorinated Compounds and Relations with Fetal Thyroid Hormones. *Environmental Science & Technology* 45(17), 7465-7472.
- Kim, S., Park, J., Kim, H.-J., Lee, J. J., Choi, G., Choi, S., Kim, S., Kim, S. Y., Moon, H.-B., Kim, S., and Choi, K. (2013). Association between several persistent organic pollutants and thyroid hormone levels in serum among the pregnant women of Korea. *Environment International* 59(0), 442-448.
- Kim, T. H., Lee, Y. J., Lee, E., Kim, M. S., Kwack, S. J., Kim, K. B., Chung, K. K., Kang, T. S., Han, S. Y., Lee, J., Lee, B. M., and Kim, H. S. (2009). Effects of gestational exposure to decabromodiphenyl ether on reproductive parameters, thyroid hormone levels, and neuronal development in sprague-dawley rats offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72(21-22), 1296-1303.
- Kirkegaard, M., Sonne, C., Dietz, R., Letcher, R. J., Jensen, A. L., Stige Hansen, S., Munro Jensen, B., and Grandjean, P. (2011). Alterations in thyroid hormone status in Greenland sledge dogs exposed to whale blubber contaminated with organohalogen compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(1), 157-163.
- Kissa, E. (2001). Fluorinated surfactants and repellents (scd edituion. Kissa, E ed. CRC Press, New York, NY, USA.
- Kitamura, S., Jinno, N., Suzuki, T., Sugihara, K., Ohta, S., Kuroki, H., and Fujimoto, N. (2005). Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture. *Toxicology* 208(3), 377-387.
- Kitamura, S., Shinohara, S., Iwase, E., Sugihara, K., Uramaru, N., Shigematsu, H., Fujimoto, N., and Ohta, S. (2008). Affinity for thyroid hormone and estrogen receptors of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers. *Journal of Health Science* 54(5), 607-614.
- Klein, R. Z., Sargent, J. D., Larsen, P. R., Waisbren, S. E., Haddow, J. E., and Mitchell, M. L. (2001). Relation of severity of maternal hypothyroidism to cognitive development of offspring. *Journal of Medical Screening* 8(1), 18-20.
- Kloas, W., and Lutz, I. (2006). Amphibians as model to study endocrine disrupters. *Journal of Chromatography A* 1130(1), 16-27.

- Kobayashi, K., Miyagawa, M., Wang, R.-S., Suda, M., Sekiguchi, S., and Honma, T. (2005). Effects of in utero and lactational exposure to bisphenol A on thyroid status in F1 rat offspring. *Industrial health* 43(4), 685-690.
- Kodavanti, P. R. S., and Curras-Collazo, M. C. (2010). Neuroendocrine actions of organohalogenes: thyroid hormones, arginine vasopressin, and neuroplasticity. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31(4), 479-496.
- Koibuchi, N. (2008). The role of thyroid hormone on cerebellar development. *The Cerebellum* 7(4), 530-533.
- Koibuchi, N., and Chin, W. W. (2000). Thyroid hormone action and brain development. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 11(4), 123-128.
- Kojima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Sugihara, K., Yoshida, T., and Kitamura, S. (2009). Nuclear hormone receptor activity of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated metabolites in transactivation assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives* 117(8), 1210-1218.
- Koopman-Esseboom, C., Morse, D. C., Weisglas-Kuperus, N., Lutkeschipholt, I. J., Van Der Paauw, C. G., Tuinstra, L. G. M. T., Brouwer, A., and Sauer, P. J. J. (1994). Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatric Research* 36(4), 468-473.
- Korytár, P., Covaci, A., de Boer, J., Gelbin, A., and Brinkman, U. A. T. (2005). Retention-time database of 126 polybrominated diphenyl ether congeners and two Bromkal technical mixtures on seven capillary gas chromatographic columns. *Journal of Chromatography A* 1065(2), 239-249.
- Kovarova, J., Blahova, J., Divisova, L., and Svobodova, Z. (2013). Alkylphenol ethoxylates and alkylphenols--update information on occurrence, fate and toxicity in aquatic environment. *Polish journal of veterinary sciences* 16(4), 763-772.
- Kubo, K., Arai, O., Ogata, R., Omura, M., Hori, T., and Aou, S. (2001). Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neuroscience Letters* 304(1-2), 73-76.
- Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R., and Aou, S. (2003). Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neuroscience Research* 45(3), 345-356.
- Kudo, Y., and Yamauchi, K. (2005). In vitro and in vivo analysis of the thyroid disrupting activities of phenolic and phenol compounds in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences* 84(1), 29-37.
- Kudo, Y., Yamauchi, K., Fukazawa, H., and Terao, Y. (2006). In vitro and in vivo analysis of the thyroid system--disrupting activities of brominated phenolic and phenol compounds in *Xenopus laevis*. *Toxicological Sciences* 92(1), 87-95.
- Kuiper, R. V., Vethaak, A. D., Cantón, R. o. F., Anselmo, H., Dubbeldam, M., van den Brandhof, E.-J., Leonards, P. E. G., Wester, P. W., and den Berg, M. v. (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.
- Kuriyama, S. N., Talsness, C. E., Grote, K., and Chahoud, I. (2005). Developmental exposure to low-dose PBDE-99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environmental Health Perspectives* 113(2), 149-154.
- Kuriyama, S. N., Wanner, A., Fidalgo-Neto, A. A., Talsness, C. E., Koerner, W., and Chahoud, I. (2007). Developmental exposure to low-dose PBDE-99: Tissue distribution and thyroid hormone levels. *Toxicology* 242(1-3), 80-90.
- La Guardia, M. J., Hale, R. C., and Harvey, E. (2006). Detailed Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environmental Science & Technology* 40(20), 6247-6254.
- Lachambre, M., and Fisson, C. (2007). GIP Seine Aval. La contamination chimique : quel risque en estuaire de Seine ? Fiche substance : Polychlorobiphényles (PCB) - CB28, CB52, CB101, CB118, CB138, CB153, CB180.
- LaFranchi, S. (2006). Thyroid hormone in hypopituitarism, Graves' disease, congenital hypothyroidism, and maternal thyroid disease during pregnancy. *Growth Hormone & IGF Research* 16(Supplement 1), 20-24.
- Langer, P., Kočan, A., Tajtáková, M., Koška, J., Rádíková, Ž., Kšinantová, L., Imrich, R., Hučková, M., Drobná, B., Gašperíková, D., Šeböková, E., and Klimeš, I. (2008). Increased thyroid volume, prevalence of thyroid antibodies and impaired fasting glucose in young adults from organochlorine cocktail polluted area: Outcome of transgenerational transmission? *Chemosphere* 73(7), 1145-1150.
- Langer, P., Tajtáková, M., Petřík, J., Chovancová, J., Drobná, B., Jursa, S., Pavúk, M., Trnovec, T., and Elena, S. (2003). Possible effects of polychlorinated biphenyls and organochlorinated pesticides on the thyroid after long-term exposure to heavy environmental pollution. *Journal of occupational and environmental medicine* 45(5), 526-532.
- Langley, A. E., and Pilcher, G. D. (1985). Thyroid, bradycardic and hypothermic effects of perfluoro-n-decanoic acid in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 15(3-4), 485-491.
- Lans, M. C., Klasson-Wehler, E., Willemsen, M., Meussen, E., Safe, S., and Brouwer, A. (1993). Structure-dependent, competitive interaction of hydroxy-polychlorobiphenyls, -dibenzo-p-dioxins and -dibenzofurans with human transthyretin. *Chemico-Biological Interactions* 88(1), 7-21.
- Larsson, P., Hamrin, S., and Okla, L. (1991). Factors determining the uptake of persistent pollutants in an eel population (*Anguilla anguilla* L.). *Environmental Pollution* 69(1), 39-50.
- Lasne, E., and Laffaille, P. (2008). Analysis of distribution patterns of yellow European eels in the Loire catchment using logistic models based on presence-absence of different size-classes. *Ecology of Freshwater Fish* 17(1), 30-37.
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., and Seed, J. (2007). Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicological Sciences* 99(2), 366-394.

- Lau, C., Thibodeaux, J. R., Hanson, R. G., Rogers, J. M., Grey, B. E., Stanton, M. E., Butenhoff, J. L., and Stevenson, L. A. (2003). Exposure to perfluorooctane sulfonate during pregnancy in rat and mouse. II: postnatal evaluation. *Toxicological Sciences* 74(2), 382-392.
- Law, R. J., Allchin, C. R., de Boer, J., Covaci, A., Herzke, D., Lepom, P., Morris, S., Tronczynski, J., and de Wit, C. A. (2006). Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere* 64(2), 187-208.
- Lee, E., Kim, T. H., Choi, J. S., Nabanata, P., Kim, N. Y., Ahn, M. Y., Jung, K. K., Kang, I. H., Kim, T. S., Kwack, S. J., Park, K. L., Kim, S. H., Kang, T. S., Lee, J., Lee, B. M., and Kim, H. S. (2010). Evaluation of liver and thyroid toxicity in Sprague-Dawley rats after exposure to polybrominated diphenyl ether BDE-209. *The Journal of Toxicological Sciences* 35(4), 535-545.
- Lee, H.-J., and Yen, P. M. (1999). Recent advances in understanding thyroid hormone receptor coregulators. *Journal of Biomedical Science* 6(2), 71-78.
- Legler, J., and Brouwer, A. (2003). Are brominated flame retardants endocrine disruptors? *Environment International* 29(6), 879-885.
- Legrand, J. (1986). Thyroid hormone effects on growth and development. In *Thyroid Hormone Metabolism* (G. Henneman, Ed.) Eds.), pp. 503-534. Dekker, M., New York.
- Lehigh Shirey, E. A., Jelaso Langerveld, A., Mihalko, D., and Ide, C. F. (2006). Polychlorinated biphenyl exposure delays metamorphosis and alters thyroid hormone system gene expression in developing *Xenopus laevis*. *Environmental Research* 102(2), 205-214.
- Lehmler, H.-J. (2005). Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants—a review. *Chemosphere* 58(11), 1471-1496.
- Lema, S. C., Dickey, J. T., Schultz, I. R., and Swanson, P. (2008). Dietary exposure to 2, 2', 4, 4'-Tetrabromodiphenyl Ether (PBDE-47) alters thyroid status and thyroid hormone-regulated gene transcription in the pituitary and brain. *Environmental Health Perspectives* 116(12), 1694-1699.
- Lethimonier, C., Flouriot, G., Valotaire, Y., Kah, O., and Ducouret, B. (2000). Transcriptional Interference Between Glucocorticoid Receptor and Estradiol Receptor Mediates the Inhibitory Effect of Cortisol on Fish Vitellogenesis. *Biology of Reproduction* 62(6), 1763-1771.
- Li, F., Wu, H., Li, L., Li, X., Zhao, J., and Peijnenburg, W. J. G. M. (2012). Docking and QSAR study on the binding interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and estrogen receptor. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80(0), 273-279.
- Li, J., Ren, S., Han, S., and Li, N. (2014). A yeast bioassay for direct measurement of thyroid hormone disrupting effects in water without sample extraction, concentration, or sterilization. *Chemosphere* 100(0), 139-145.
- Li, X., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, Z.-F., Lai, H.-J., and Su, H.-C. (2013). 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment International* 52(0), 81-86.

- Liao, C., Liu, F., and Kannan, K. (2012). Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environmental Science & Technology* 46(12), 6515-6522.
- Lin, J. Z., Sieglaff, D. H., Yuan, C., Su, J., Arumanayagam, A. S., Firouzbakht, S., Cantu Pompa, J. J., Reynolds, F. D., Zhou, X., Cvorovic, A., and Webb, P. (2013). Gene specific actions of thyroid hormone receptor subtypes. *PLoS ONE* 8(1), e52407.
- Liu, C., Yu, H., and Zhang, X. (2013). Zebrafish embryos/larvae for rapid determination of effects on hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) and hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis: mRNA expression. *Chemosphere* 93(10), 2327-2332.
- Lopez-Espinosa, M.-J., Mondal, D., Armstrong, B., Bloom, M. S., and Fletcher, T. (2012). Thyroid function and perfluoroalkyl acids in children living near a chemical plant. *Environmental Health Perspectives* 120(7), 1036-1041.
- Lübcke-von Varel, U., Machala, M., Ciganek, M., Neca, J., Pencikova, K., Palkova, L., Vondracek, J., Löffler, I., Streck, G., and Reifferscheid, G. (2011). Polar compounds dominate in vitro effects of sediment extracts. *Environmental Science & Technology* 45(6), 2384-2390.
- Lubics, A., Reglödi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., and Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research* 157(1), 157-165.
- Luebker, D. J., York, R. G., Hansen, K. J., Moore, J. A., and Butenhoff, J. L. (2005). Neonatal mortality from in utero exposure to perfluorooctanesulfonate (PFOS) in Sprague-Dawley rats: Dose-response, and biochemical and pharmacokinetic parameters. *Toxicology* 215(1-2), 149-169.
- Macgregor, K., Oliver, I. W., Harris, L., and Ridgway, I. M. (2010). Persistent organic pollutants (PCB, DDT, HCH, HCB & BDE) in eels (*Anguilla anguilla*) in Scotland: Current levels and temporal trends. *Environmental Pollution* 158(7), 2402-2411.
- Mackay, D., Shiu, W. Y., Ma, K.-C., and Lee, S. C. (1992). Illustrated handbook of physical – chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume I: monoaromatic hydrocarbons, chlorobenzenes and polychlorinated biphenyls. Lewis Publishers.
- MacKenzie, D. S., Jones, R. A., and Miller, T. C. (2009). Thyrotropin in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 161(1), 83-89.
- Malmvärn, A., Marsh, G., Kautsky, L., Athanasiadou, M., Bergman, Å., and Asplund, L. (2005). Hydroxylated and Methoxylated Brominated Diphenyl Ethers in the Red Algae *Ceramium tenuicorne* and Blue Mussels from the Baltic Sea. *Environmental Science & Technology* 39(9), 2990-2997.
- Manodori, L., Gambaro, A., Piazza, R., Ferrari, S., Stortini, A. M., Moret, I., and Capodaglio, G. (2006). PCBs and PAHs in sea-surface microlayer and sub-surface water samples of the Venice Lagoon (Italy). *Marine Pollution Bulletin* 52(2), 184-192.
- Mansourian, A. R. (2010). A review on hyperthyroidism: thyrotoxicosis under surveillance. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13(22), 1066-1076.

- Marchelidon, J., Le Belle, N., Hardy, A., Vidal, B., Sbaihi, M., Burzawa-Gérard, E., Schmitz, M., and Dufour, S. (1999). Étude des variations de paramètres anatomiques et endocriniens chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) femelle, sédentaire et d'avalaison : application à la caractérisation du stade argenté. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* 355, 349-368.
- Marieb, E. N. (2005). *Anatomie et physiologie humaines - 6th edition*. Pearson education.
- Masuo, Y., Morita, M., Oka, S., and Ishido, M. (2004). Motor hyperactivity caused by a deficit in dopaminergic neurons and the effects of endocrine disruptors: a study inspired by the physiological roles of PACAP in the brain. *Regulatory Peptides* 123(1-3), 225-234.
- McCormick, S. D., O'Dea, M. F., Moeckel, A. M., and Björnsson, B. T. (2003). Endocrine and physiological changes in Atlantic salmon smolts following hatchery release. *Aquaculture* 222(1-4), 45-57.
- McCormick, S. D., O'Dea, M. F., Moeckel, A. M., Lerner, D. T., and Björnsson, B. T. (2005). Endocrine disruption of parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and 17 β -estradiol. *General and Comparative Endocrinology* 142(3), 280-288.
- McDonald, T. A. (2002). A perspective on the potential health risks of PBDEs. *Chemosphere* 46(5), 745-755.
- Meeker, J. D., Calafat, A. M., and Hauser, R. (2009). Urinary Bisphenol A Concentrations in Relation to Serum Thyroid and Reproductive Hormone Levels in Men from an Infertility Clinic. *Environmental Science & Technology* 44(4), 1458-1463.
- Meeker, J. D., and Ferguson, K. K. (2011). Relationship between urinary phthalate and bisphenol A concentrations and serum thyroid measures in US adults and adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007-2008. *Environmental Health Perspectives* 119(10), 1396-1402.
- Meerts, I. A. T. M., Assink, Y., Cenijs, P. H., van den Berg, J. H. J., Weijers, B. M., Bergman, Å., Koeman, J. H., and Brouwer, A. (2002). Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat. *Toxicological Sciences* 68(2), 361-371.
- Meerts, I. A. T. M., Lilienthal, H., Hoving, S., van den Berg, J. H. J., Weijers, B. M., Bergman, Å., Koeman, J. H., and Brouwer, A. (2004). Developmental exposure to 4-hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (4-OH-CB107): long-term effects on brain development, behavior, and brain stem auditory evoked potentials in rats. *Toxicological Sciences* 82(1), 207-218.
- Meerts, I. A. T. M., Van Zanden, J. J., Luijks, E. A. C., van Leeuwen-Bol, I., Marsh, G., Jakobsson, E., Bergman, Å., and Brouwer, A. (2000). Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro. *Toxicological Sciences* 56(1), 95-104.
- Metcalfe, C. D., Kleywegt, S., Letcher, R. J., Topp, E., Wagh, P., Trudeau, V. L., and Moon, T. W. (2013). A multi-assay screening approach for assessment of endocrine-active contaminants in wastewater effluent samples. *Science of The Total Environment* 454-455(0), 132-140.

- Miller, M. D., Crofton, K. M., Rice, D. C., and Zoeller, R. T. (2009). Thyroid-disrupting chemicals: interpreting upstream biomarkers of adverse outcomes. *Environmental Health Perspectives* 117, 1033-1041.
- Mills Iii, S. A., Thal, D. I., and Barney, J. (2007). A summary of the 209 PCB congener nomenclature. *Chemosphere* 68(9), 1603-1612.
- Mitra, S., Dickhut, R. M., Kuehl, S. A., and Kimbrough, K. L. (1999). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) source, sediment deposition patterns, and particle geochemistry as factors influencing PAH distribution coefficients in sediments of the Elizabeth River, VA, USA. *Marine Chemistry* 66(1-2), 113-127.
- Miyazaki, W., Iwasaki, T., Takeshita, A., Kuroda, Y., and Koibuchi, N. (2004). Polychlorinated Biphenyls Suppress Thyroid Hormone Receptor-mediated Transcription through a Novel Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 279(18), 18195-18202.
- Moatar, F., and Meybeck, M. (2005). Compared performances of different algorithms for estimating annual nutrient loads discharged by the eutrophic River Loire. *Hydrological Processes* 19(2), 429-444.
- Montaño, M., Weiss, J., Hoffmann, L., Gutleb, A. C., and Murk, T. J. (2013). Metabolic activation of nonpolar sediment extracts results in enhanced thyroid hormone disrupting potency. *Environmental Science & Technology* 47(15), 8878-8886.
- Moriarty, C., and Dekker, W. (1997). Management of the European Eel. *Irish Fisheries Bulletin* 15, 110pp.
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., and Nakao, K. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(11), 5185-5190.
- Morreale de Escobar, G., Obregón, M. J., and Escobar del Rey, F. (2004a). Role of thyroid hormone during early brain development. *European Journal of Endocrinology* 151(Suppl-3), U25-U37.
- Morreale de Escobar, G. M. d., Obregón, M. J., and Escobar del Rey, F. (2004b). Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Practice & Research, Clinical Endocrinology & Metabolism* 18(2), 225-248.
- Morris, R. (1984). Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11(1), 47-60.
- Munsch, C., Marchand, P., Venisseau, A., Veyrand, B., and Zendong, Z. (2013). Levels and trends of the emerging contaminants HBCDs (hexabromocyclododecanes) and PFCs (perfluorinated compounds) in marine shellfish along French coasts. *Chemosphere* 91(2), 233-240.
- Naderi, M., Mousavi, S. M., Safahieh, A., Ghatrami, E. R., and Zargham, D. (2014). Effects of 4-nonylphenol on balance of steroid and thyroid hormones in sexually immature male yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*). *Environmental Toxicology* 29(4), 459-465.
- Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S., and Ono, H. (2001). Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reproductive Toxicology* 15(3), 293-315.

- Nam, S.-H., Seo, Y.-M., and Kim, M.-G. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* 79(9), 949-952.
- Negishi, T., Kawasaki, K., Suzaki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S., Kuroda, Y., and Yoshikawa, Y. (2004). Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranlycypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environmental Health Perspectives* 112(11), 1159-1164.
- Nelson, E. R., and Habibi, H. R. (2009). Thyroid receptor subtypes: Structure and function in fish. *General and Comparative Endocrinology* 161(1), 90-96.
- Norris, D. O. (2007). *Vertebrate endocrinology - Fourth edition*. Elsevier Academic Press.
- Noyes, P. D., Lema, S. C., Macaulay, L. J., Douglas, N. K., and Stapleton, H. M. (2013). Low level exposure to the flame retardant BDE-209 reduces thyroid hormone levels and disrupts thyroid signaling in fathead minnows. *Environmental Science & Technology* 47(17), 10012-10021.
- Odum, J., Lefevre, P. A., Tinwell, H., Van Miller, J. P., Joiner, R. L., Chapin, R. E., Wallis, N. T., and Ashby, J. (2002). Comparison of the developmental and reproductive toxicity of diethylstilbestrol administered to rats in utero, lactationally, preweaning, or postweaning. *Toxicological Sciences* 68(1), 147-163.
- Olsen, G. W., and Zobel, L. R. (2007). Assessment of lipid, hepatic, and thyroid parameters with serum perfluorooctanoate (PFOA) concentrations in fluorochemical production workers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 81(2), 231-246.
- ONEMA (2010). *Sauvegarde de l'anguille. Le plan de gestion français (Octobre 2010)*, 1-24.
- ONEMA (2012). *Les données du plan national d'action PCB*. <http://www.pollutions.eaufrance.fr/pcb/resultats-xls.html>.
- Oppenheimer, J. H., and Schwartz, H. L. (1997). Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development 1. *Endocrine Reviews* 18(4), 462-475.
- Palstra, A. P., Guerrero, M. A., Laak, G., Klein Breteler, J. P. G., and den Thillart, G. E. E. J. M. (2011). Temporal progression in migratory status and sexual maturation in European silver eels during downstream migration. *Fish Physiology and Biochemistry* 37(2), 285-296.
- Palstra, A. P., Heppener, D. F. M., van Ginneken, V. J. T., Székely, C., and van den Thillart, G. E. E. J. M. (2007). Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite *Anguillicola crassus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352(1), 244-256.
- Pannella, G. (1980). Growth pattern in fish sagittae. In *Skeletal growth of aquatic organisms. Biological records of environmental change* (D. C. Rhoads, Ed.) Eds.), pp. 519-560 Plenum Press, New York, USA and London, UK.
- Paris, M., and Laudet, V. (2008). The history of a developmental stage: Metamorphosis in chordates. *genesis* 46(11), 657-672.

- Paul, A. G., Jones, K. C., and Sweetman, A. J. (2008). A first global production, emission, and environmental inventory for perfluorooctane sulfonate. *Environmental Science & Technology* 43(2), 386-392.
- Peakall, D. B., Tremblay, J., Kinter, W. B., and Miller, D. S. (1981). Endocrine dysfunction in seabirds caused by ingested oil. *Environmental Research* 24(1), 6-14.
- Pearce, E. N., and Braverman, L. E. (2009). Environmental pollutants and the thyroid. *Best Practice & Research, Clinical Endocrinology & Metabolism* 23(6), 801-813.
- Pearson, K. (1901). LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 2(11), 559-572.
- PERFORCE (2006). Perfluorinated organic compounds in the European environment. Scientific report. FP6-NEST-508967, 132pp.
- Perron, M. M., Burgess, R. M., Suuberg, E. M., Cantwell, M. G., and Pennell, K. G. (2013). Performance of passive samplers for monitoring estuarine water column concentrations: 1. Contaminants of concern. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(10), 2182-2189.
- Persky, V., Turyk, M., Anderson, H. A., Hanrahan, L. P., Falk, C., Steenport, D. N., Chatterton, R., and Freels, S. (2001). The effects of PCB exposure and fish consumption on endogenous hormones. *Environmental Health Perspectives* 109(12), 1275-1283.
- Pickford, D. B., Hetheridge, M. J., Caunter, J. E., Tilghman Hall, A., and Hutchinson, T. H. (2003). Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere* 53(3), 223-235.
- Portefield, S. P., and Hendrich, C. E. (1993). The Role of Thyroid Hormones in Prenatal and Neonatal Neurological Development--Current Perspectives. *Endocrine Reviews* 14(1), 94-106.
- Power, D. M., Elias, N. P., Richardson, S. J., Mendes, J., Soares, C. M., and Santos, C. R. A. (2000). Evolution of the thyroid hormone-binding rotein, transthyretin. *General and Comparative Endocrinology* 119(3), 241-255.
- Power, D. M., Llewellyn, L., Faustino, M., Nowell, M. A., Björnsson, B. T., Einarsdottir, I. E., Canario, A. V. M., and Sweeney, G. E. (2001). Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology* 130(4), 447-459.
- Prevedouros, K., Cousins, I. T., Buck, R. C., and Korzeniowski, S. H. (2005). Sources, Fate and Transport of Perfluorocarboxylates. *Environmental Science & Technology* 40(1), 32-44.
- Purkey, H. E., Palaninathan, S. K., Kent, K. C., Smith, C., Safe, S. H., Sacchettini, J. C., and Kelly, J. W. (2004). Hydroxylated polychlorinated biphenyls selectively bind transthyretin in blood and inhibit amyloidogenesis: rationalizing rodent PCB toxicity. *Chemistry & Biology* 11(12), 1719-1728.
- Ranabir, S., and Reetu, K. (2011). Stress and hormones. *Indian journal of endocrinology and metabolism* 15-22(1), 18.

- Redei, E. E., Solberg, L. C., Kluczynski, J. M., and P Pare, W. (2001). Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology* 24(6), 632-639.
- Ren, X.-M., Guo, L.-H., Gao, Y., Zhang, B.-T., and Wan, B. (2013). Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers exhibit different activities on thyroid hormone receptors depending on their degree of bromination. *Toxicology and Applied Pharmacology* 268(3), 256-263.
- Ren, X.-M., Zhang, Y.-F., Guo, L.-H., Qin, Z.-F., Lv, Q.-Y., and Zhang, L.-Y. (2014). Structure–activity relations in binding of perfluoroalkyl compounds to human thyroid hormone T3 receptor. *Archives of Toxicology*, 1-10.
- Renner, R. (1997). European Bans on Surfactant Trigger Transatlantic Debate. *Environmental Science & Technology* 31(7), 316A-320A.
- Reynaud, S., and Deschaux, P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77(2), 229-238.
- Ricciardi, F., Matozzo, V., Binelli, A., and Marin, M. G. (2010). Biomarker responses and contamination levels in crabs (*Carcinus aestuarii*) from the Lagoon of Venice: An integrated approach in biomonitoring estuarine environments. *Water Research* 44(6), 1725-1736.
- Richardson, S. J., Bradley, A. J., Duan, W., Wettenhall, R. E., Harms, P. J., Babon, J. J., Southwell, B. R., Nicol, S., Donnellan, S. C., and Schreiber, G. (1994). Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 266(4), 1359-1370.
- Rigaudy, J., and Klesney, A. P. (1979). *Nomenclature of organic chemistry : Sections A,B,C,D,E,F and H*. Pergamon, Oxford [etc.].
- Robinet, T. T., and Feunteun, E. E. (2002). Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* 11(4), 265-277.
- Rocha Monteiro, P. R., Reis-Henriques, M. A., and Coimbra, J. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology* 48(4), 549-559.
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology* 42(0), 132-155.
- Roelens, S. A., Beck, V., Aerts, G., Clerens, S., Vanden Bergh, G., Arckens, L., Darras, V. M., and Van Der Geyten, S. (2005). Neurotoxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) by Disturbance of Thyroid Hormone-Regulated Genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040(1), 454-456.
- Rolland, R. M. (2000). A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin a status from field studies of wildlife and fish. *Journal of Wildlife Diseases* 36(4), 615-635.
- Romaña, L.-A. (1994). Les grands estuaires français. *Equinoxe*(47-48), 38-42.

- Roosens, L., Geeraerts, C., Belpaire, C., Van Pelt, I., Neels, H., and Covaci, A. (2010). Spatial variations in the levels and isomeric patterns of PBDEs and HBCDs in the European eel in Flanders. *Environment International* 36(5), 415-423.
- Rotander, A., van Bavel, B., Rigét, F., Auðunsson, G. A., Polder, A., Gabrielsen, G. W., Víkingsson, G., Mikkelsen, B., and Dam, M. (2012). Methoxylated polybrominated diphenyl ethers (MeO-PBDEs) are major contributors to the persistent organobromine load in sub-Arctic and Arctic marine mammals, 1986–2009. *Science of The Total Environment* 416(0), 482-489.
- Routledge, E. J., and Sumpter, J. P. (1997). Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *Journal of Biological Chemistry* 272(6), 3280-3288.
- Rubin, B. S., and Soto, A. M. (2009). Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology* 304(1–2), 55-62.
- Rusina, T. P., Smedes, F., Klanova, J., Booij, K., and Holoubek, I. (2007). Polymer selection for passive sampling: A comparison of critical properties. *Chemosphere* 68(7), 1344-1351.
- Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M., and Levin, W. (1985). PCBs: structure–function relationships and mechanism of action. *Environmental Health Perspectives* 60, 47-56.
- Santini, F., Vitti, P., Ceccarini, G., Mammoli, C., Rosellini, V., Pelosini, C., Marsili, A., Tonacchera, M., Agretti, P., Santoni, T., Chiovato, L., and Pinchera, A. (2003). In vitro assay of thyroid disruptors affecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity. *Journal of Endocrinological Investigation* 26(10), 950-955.
- Santodonato, J. (1997). Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: Relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 34(4), 835-848.
- Santos, C. R., Anjos, L., and Power, D. M. (2002). Transthyretin in fish: state of the art. *Clinical chemistry and laboratory medicine* 40(12), 1244-1249.
- Scattoni, M. L., Puopolo, M., Calamandrei, G., and Ricceri, L. (2005). Basal forebrain cholinergic lesions in 7-day-old rats alter ultrasound vocalisations and homing behaviour. *Behavioural Brain Research* 161(1), 169-172.
- Schantz, S. L., Widholm, J. J., and Rice, D. C. (2003). Effects of PCB exposure on neuropsychological function in children. *Environmental Health Perspectives* 111(3), 357.
- Schell, L. M., Gallo, M. V., Denham, M., Ravenscroft, J., DeCaprio, A. P., and Carpenter, D. O. (2008). Children's health-endocrine system-relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, p, p'-DDE, and other toxicants in Akwesasne Mohawk Youth. *Environmental Health Perspectives* 116(6), 806-813.
- Schmidt, J. (1923). Breeding places and migrations of the eel. *Nature* 111(2776), 51-54.
- Schmutzler, C., Hamann, I., Hofmann, P. J., Kovacs, G., Stemmler, L., Mentrup, B., Schomburg, L., Ambrugger, P., Grüters, A., Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Wuttke, W., and Köhrle, J. (2004). Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205(1–2), 95-102.

- Scholz, S., Renner, P., Belanger, S., Busquet, F., Davi, R., Demeneix, B., Denny, J., Léonard, M., McMaster, M., and Villeneuve, D. (2013). Alternatives to in vivo tests to detect endocrine disrupting chemicals (EDCs) in fish and amphibians-screening for estrogen, androgen and thyroid hormone disruption. *Critical Reviews in Toxicology* 43(1), 45-72.
- Schreiber, G., Southwell, B. R., and Richardson, S. J. (1995). Hormone delivery systems to the brain-transthyretin. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 103(02), 75-80.
- Schriks, M., Roessig, J. M., Murk, A. J., and Furlow, J. D. (2007). Thyroid hormone receptor isoform selectivity of thyroid hormone disrupting compounds quantified with an in vitro reporter gene assay. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23(3), 302-307.
- Schriks, M., Zvinavashe, E., David Furlow, J., and Murk, A. J. (2006). Disruption of thyroid hormone-mediated *Xenopus laevis* tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2,2',3,3',4,4',5,5',6-nona brominated diphenyl ether (BDE206). *Chemosphere* 65(10), 1904-1908.
- Schuetze, A., Heberer, T., Effkemann, S., and Juergensen, S. (2010). Occurrence and assessment of perfluorinated chemicals in wild fish from Northern Germany. *Chemosphere* 78(6), 647-652.
- Schussler, G. C. (2000). The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 10(2), 141-149.
- Schwartz, H. L., Ross, M. E., and Oppenheimer, J. H. (1997). Lack of effect of thyroid hormone on late fetal rat brain development I. *Endocrinology* 138(8), 3119-3124.
- Sharma, V. K., Anquandah, G. A., Yngard, R. A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A. K., and Golovko, D. (2009). Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: a review on occurrence, fate, and treatment. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 44(5), 423-442.
- Sheng, Z.-G., Tang, Y., Liu, Y.-X., Yuan, Y., Zhao, B.-Q., Chao, X.-J., and Zhu, B.-Z. (2012). Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 259(1), 133-142.
- Simmons, D. B. D., McMaster, M. E., Reiner, E. J., Hewitt, L. M., Parrott, J. L., Park, B. J., Brown, S. B., and Sherry, J. P. (2014). Wild fish from the Bay of Quinte Area of Concern contain elevated tissue concentrations of PCBs and exhibit evidence of endocrine-related health effects. *Environment International* 66(0), 124-137.
- Simon, E., Bytingsvik, J., Jonker, W., Leonards, P. E. G., de Boer, J., Jenssen, B. M., Lie, E., Aars, J., Hamers, T., and Lamoree, M. H. (2011). Blood plasma sample preparation method for the assessment of thyroid hormone-disrupting potency in effect-directed analysis. *Environmental Science & Technology* 45(18), 7936-7944.
- Simon, E., van Velzen, M., Brandsma, S. H., Lie, E., Løken, K., de Boer, J., Bytingsvik, J., Jenssen, B. M., Aars, J., Hamers, T., and Lamoree, M. H. (2013). Effect-directed analysis to explore the polar bear exposome: identification of thyroid hormone disrupting compounds in plasma. *Environmental Science & Technology* 47(15), 8902-8912.
- Skaare, J. U., Bernhoft, A., Wiig, Ø., Norum, K. R., Haug, E., Eide, D. M., and Derocher, A. E. (2001). Relationships between plasma levels of organochlorines, retinol and thyroid hormones

- from polar bears (*Ursus maritimus*) at Svalbard. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 62(4), 227-241.
- Smart, B. (1994). Characteristics of C-F Systems. In *Organofluorine Chemistry* (R. E. Banks, B. E. Smart, and J. C. Tatlow, Eds.), pp. 57-88. Springer US.
- Smith, J. W., Evans, A. T., Costall, B., and Smythe, J. W. (2002). Thyroid hormones, brain function and cognition: a brief review. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 26(1), 45-60.
- Smolders, R., Bervoets, L., and Blust, R. (2004). In situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of effluent discharges on receiving aquatic ecosystems. *Environmental Pollution* 132(2), 231-243.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., and Lester, J. N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International* 34(7), 1033-1049.
- Somers, C. M., Valdes, E. V., and Quinn, J. S. (2006). An approach to feeding high-percentage fish diets to mice for human and wildlife toxicology studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63(3), 481-487.
- Song, M., Kim, Y.-J., Park, Y.-K., and Ryu, J.-C. (2012). Changes in thyroid peroxidase activity in response to various chemicals. *Journal of Environmental Monitoring* 14(8), 2121-2126.
- Sørmo, E. G., Jussi, I., Jussi, M., Braathen, M., Skaare, J. U., and Jenssen, B. M. (2005). Thyroid hormone status in gray seal (*Halichoerus grypus*) pups from the baltic sea and the atlantic ocean in relation to organochlorine pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(3), 610-616.
- Sormo, E. G., Larsen, H. J. S., Johansen, G. M., Skaare, J. U., and Jenssen, B. M. (2009). Immunotoxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCB) in Free-Ranging Gray Seal Pups with Special Emphasis on Dioxin-Like Congeners. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 72(3-4), 266-276.
- Soto, A. M., Justicia, H., Wray, J. W., and Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environmental Health Perspectives* 92, 167-173.
- Stahl, T., Mattern, D., and Brunn, H. (2011). Toxicology of perfluorinated compounds. *Environmental Sciences Europe* 23(1), 1-52.
- Staples, C. A., Dome, P. B., Klecka, G. M., Oblock, S. T., and Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36(10), 2149-2173.
- Steuerwald, U., Weihe, P., Jørgensen, P. J., Bjerve, K., Brock, J., Heinzow, B., Budtz-Jørgensen, E., and Grandjean, P. (2000). Maternal seafood diet, methylmercury exposure, and neonatal neurologic function. *The Journal of Pediatrics* 136(5), 599-605.
- Stewart, P., Pagano, J., Sargent, D., Darvill, T., Lonky, E., and Reihman, J. (2000). Effects of Great Lakes Fish Consumption on Brain PCB Pattern, Concentration, and Progressive-Ratio Performance. *Environmental Research* 82(1), 18-32.

- Stoker, T. E., Laws, S. C., Crofton, K. M., Hedge, J. M., Ferrell, J. M., and Cooper, R. L. (2004). Assessment of DE-71, a Commercial Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Mixture, in the EDSP Male and Female Pubertal Protocols. *Toxicological Sciences* 78(1), 144-155.
- Sumpter, J. P., and Jobling, S. (1995). Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103(Suppl 7), 173-178.
- Szabo, D. T., Richardson, V. M., Ross, D. G., Diliberto, J. J., Kodavanti, P. R. S., and Birnbaum, L. S. (2009). Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups. *Toxicological Sciences* 107(1), 27-39.
- Szlinder-Richert, J., Ruczynska, W., Nermer, T., Usydus, Z., and Robak, S. (2014). The occurrence of organic contaminants in European eel (*Anguilla anguilla*) in Poland: An environmental quality assessment. *Chemosphere* 114(0), 282-290.
- Tabouret, H., Bareille, G., Mestrot, A., Caill-Milly, N., Budzinski, H., Peluhet, L., Prouzet, P., and Donard, O. F. X. (2011). Heavy metals and organochlorinated compounds in the European eel (*Anguilla anguilla*) from the Adour estuary and associated wetlands (France). *Journal of Environmental Monitoring* 13(5), 1446-1456.
- Takser, L., Mergler, D., Baldwin, M., De Grosbois, S., Smargiassi, A., and Lafond, J. (2005). Thyroid hormones in pregnancy in relation to environmental exposure to organochlorine compounds and mercury. *Environmental Health Perspectives* 113(8), 1039-1045.
- Tang, J.-M., Li, W., Xie, Y.-C., Guo, H.-W., Cheng, P., Chen, H.-H., Zheng, X.-Q., Jiang, L., Cui, D., Liu, Y., Ding, G.-X., and Duan, Y. (2013). Morphological and functional deterioration of the rat thyroid following chronic exposure to low-dose PCB 118. *Experimental and Toxicologic Pathology*(0).
- Tapie, N., Budzinski, H., Elie, P., and Gonthier, P. (2006). Contamination en polychlorobiphényles (PCB) des anguilles du système fluvio estuarien de la Gironde. Rapport Final Novembre 2006.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M. H., and Budzinski, H. (2011). PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: From glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83(2), 175-185.
- Tata, J. R. (2006). Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology* 246(1-2), 10-20.
- Tesch, F. W. (2003). *The eel*, 5th Edition. Wiley-Blackwell Publishing.
- Thouvenin, B., Le Hir, P., and Romana, L. A. (1994). Dissolved oxygen model in the Loire Estuary. OLSÉN & OLSÉN, FREDENSBORG, DENMARK., 169-178.
- Tiedje, J. M., Quensen, J. F., Chee-Sanford, J., Schimel, J. P., and Boyd, S. A. (1993). Microbial reductive dechlorination of PCBs. *Biodegradation* 4(4), 231-240.
- Tittlemier, S. A., Halldorson, T., Stern, G. A., and Tomy, G. T. (2002). Vapor pressures, aqueous solubilities, and Henry's law constants of some brominated flame retardants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(9), 1804-1810.

- Tomy, G. T., Palace, V. P., Halldorson, T., Braekevelt, E., Danell, R., Wautier, K., Evans, B., Brinkworth, L., and Fisk, A. T. (2004). Bioaccumulation, Biotransformation, and Biochemical Effects of Brominated Diphenyl Ethers in Juvenile Lake Trout (*Salvelinus namaycush*). *Environmental Science & Technology* 38(5), 1496-1504.
- Tsai, W.-T. (2006). Human Health Risk on Environmental Exposure to Bisphenol-A: A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* 24(2), 225-255.
- Tsukamoto, K., and Aoyama, J. (1998). Evolution of freshwater eels of the genus *Anguilla*: a probable scenario. In *Fish biology in Japan: an anthology in honour of Hiroya Kawanabe* (M. Yuma, I. Nakamura, and K. Fausch, Eds.), Vol. 18, pp. 139-148. Springer Netherlands.
- Tsukamoto, K., Nakai, I., and Tesch, W. V. (1998). Do all freshwater eels migrate? *Nature* 396(6712), 635-636.
- Turque, N., Palmier, K., Le Mével, S., Alliot, C., and Demeneix, B. A. (2005). A rapid, physiologic protocol for testing transcriptional effects of thyroid-disrupting agents in premetamorphic *Xenopus* tadpoles. *Environmental Health Perspectives* 113(11), 1588-1593.
- Turyk, M. E., Anderson, H. A., Freels, S., Chatterton Jr, R., Needham, L. L., Patterson Jr, D. G., Steenport, D. N., Knobeloch, L., Imm, P., and Persky, V. W. (2006). Associations of organochlorines with endogenous hormones in male Great Lakes fish consumers and nonconsumers. *Environmental Research* 102(3), 299-307.
- Turyk, M. E., Anderson, H. A., and Persky, V. W. (2007). Relationships of thyroid hormones with polychlorinated biphenyls, dioxins, furans, and DDE in adults. *Environmental Health Perspectives* 115(8), 1197-1203.
- Turyk, M. E., Persky, V. W., Imm, P., Knobeloch, L., Chatterton, R., and Anderson, H. A. (2008). Hormone disruption by PBDEs in adult male sport fish consumers. *Environmental Health Perspectives* 116(12), 1635-1641.
- UNEP 2009 (2009). CN.524.2009. TREATIES-4. Stockholm convention on persistent organic pollutants, Stockholm, 22 may 2001. Adoption of amendments to Annexes A, B and C by decisions SC-4/10, 4/11, 4/12, 4/13, 4/14, 4/15, 4/16, 4/17 and 4/18.
- UNEP 2011 (2011). C.N.703.2011.TREATIES-8. Stockholm convention on persistent organic pollutants, Stockholm, 22 may 2001. Adoption of an amendment to Annex A by decision SC-5/3.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA), H. C. D. (2009). Screening-level hazard characterization: Alkylphenols category. In (pp. 1-55).
- van den Berg, K. J. (1990). Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin. *Chemico-Biological Interactions* 76(1), 63-75.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., and Kennedy, S. W. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for

- PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106(12), 775.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N., and Peterson, R. E. (2006). The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological Sciences* 93(2), 223-241.
- Van Den Thillart, G., Van Ginneken, V., Körner, F., Heijmans, R., Van Der Linden, R., and Gluvers, A. (2004). Endurance swimming of European eel. *Journal of Fish Biology* 65(2), 312-318.
- Van Ginneken, V., Durif, C., Dufour, S., Sbaihi, M., Boot, R., Noorlander, K., Doornbos, J., Murk, A. J., and Van Den Thillart, G. (2007). Endocrine profiles during silvering of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) living in saltwater. *Animal Biology* 57(4), 453-466.
- Van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., Van den Thillart, G., and Murk, A. (2009). PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Aquatic Toxicology* 92(4), 213-220.
- van Ginneken, V. J. T., and Maes, G. E. (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.
- van Ginneken, V. J. T., and van den Thillart, G. E. E. J. M. (2000). Physiology: Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* 403(6766), 156-157.
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F. J. R., and Schoenfelder, G. (2012). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Ciência & Saúde Coletiva* 17, 407-434.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., and Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24(2), 139-177.
- Vane, C. H., Harrison, I., and Kim, A. W. (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in sediments from the Mersey Estuary, UK. *Science of The Total Environment* 374(1), 112-126.
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A. F., and Viana, M. T. (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research* 4(1), 1-25.
- Verreault, J., Skaare, J. U., Jenssen, B. M., and Gabrielsen, G. W. (2004). Effects of organochlorine contaminants on thyroid hormone levels in Arctic breeding glaucous gulls, *Larus hyperboreus*. *Environmental Health Perspectives* 112(5), 532-537.
- Vial, J., and Jarde, A. (1999). Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC method. *Analytical Chemistry* 71(14), 2672-2677.
- Vinggaard, A. M., Hnida, C., and Larsen, J. C. (2000). Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation in vitro. *Toxicology* 145(2-3), 173-183.

- Vom Saal, F. S., and Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 926-933.
- Wang, S.-L., Su, P.-H., Jong, S.-B., Guo, Y. L., Chou, W.-L., and Pöpke, O. (2005). In utero exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls and its relations to thyroid function and growth hormone in newborns. *Environmental Health Perspectives* 113(11), 1645-1650.
- Wang, T., Lu, J., Xu, M., Xu, Y., Li, M., Liu, Y., Tian, X., Chen, Y., Dai, M., and Wang, W. (2013). Urinary bisphenol A concentration and thyroid function in Chinese adults. *Epidemiology* 24(2), 295-302.
- Wang, Y., Rogan, W. J., Chen, P. C., Lien, G. W., Chen, H. Y., Tseng, Y. C., Longnecker, M. P., and Wang, S. L. (2014). Association between maternal serum perfluoroalkyl substances during pregnancy and maternal and cord thyroid hormones: Taiwan Maternal and Infant Cohort Study. *Environmental Health Perspectives* 122(5), 529-534.
- Waszak, I., Dabrowska, H., and Komar-Szymczak, K. (2014). Comparison of common persistent organic pollutants (POPs) in flounder (*Platichthys flesus*) from the Vistula (Poland) and Douro (Portugal) River estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 81(1), 225-233.
- Weiss, J. M., Andersson, P. L., Lamoree, M. H., Leonards, P. E. G., van Leeuwen, S. P. J., and Hamers, T. (2009). Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin. *Toxicological Sciences* 109(2), 206-216.
- Wester, P. W., Muller, J. J. A., Slob, W., Mohn, G. R., Dortant, P. M., and Kroese, E. D. (2012). Carcinogenic activity of benzo[a]pyrene in a 2 year oral study in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* 50(3-4), 927-935.
- White, K. L. (1986). An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Carcinogenesis Reviews* 4(2), 163-202.
- White, R., Jobling, S., Hoare, S. A., Sumpter, J. P., and Parker, M. G. (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135(1), 175-182.
- Wilhelm, M., Wittsiepe, J., Lemm, F., Ranft, U., Krämer, U., Fürst, P., Röseler, S.-C., Greshake, M., Imöhl, M., Eberwein, G., Rauchfuss, K., Kraft, M., and Winneke, G. (2008). The Duisburg birth cohort study: Influence of the prenatal exposure to PCDD/Fs and dioxin-like PCBs on thyroid hormone status in newborns and neurodevelopment of infants until the age of 24 months. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 659(1-2), 83-92.
- Willhite, C. C., Ball, G. L., and McLellan, C. J. (2008). Derivation of a bisphenol a oral reference dose (RfD) and drinking-water equivalent concentration. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 11(2), 69-146.
- Woo, G.-H., Shibutani, M., Ichiki, T., Hamamura, M., Lee, K.-Y., Inoue, K., and Hirose, M. (2007). A repeated 28-day oral dose toxicity study of nonylphenol in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals. *Archives of Toxicology* 81(2), 77-88.

- Woodhead, A. D., Setlow, R. B., and Pond, V. (1982). Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the proliferation of ectopic thyroid tissue in *Poecilia formosa*, the Amazon molly*. *Journal of Fish Biology* 20(4), 455-463.
- Xi, Y., Li, D., and San, W. (2013). Exposure to the endocrine disruptor nonylphenol alters structure and function of thyroid gland in rats. *Regulatory Peptides* 185(10), 52-56.
- Xu, X., Liu, Y., Sadamatsu, M., Tsutsumi, S., Akaike, M., Ushijima, H., and Kato, N. (2007). Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. *Neuroscience Research* 58(2), 149-155.
- Yamano, K. (2005). The role of thyroid hormone in fish development with reference to aquaculture. *JARQ* 39(3), 161-168.
- Yamauchi, K., Ishihara, A., Fukazawa, H., and Terao, Y. (2003). Competitive interactions of chlorinated phenol compounds with 3,3',5-triiodothyronine binding to transthyretin: detection of possible thyroid-disrupting chemicals in environmental waste water. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187(2), 110-117.
- Yang, X., Xie, H., Chen, J., and Li, X. (2013). Anionic phenolic compounds bind stronger with transthyretin than their neutral forms: nonnegligible mechanisms in virtual screening of endocrine disrupting chemicals. *Chemical Research in Toxicology* 26(9), 1340-1347.
- Ying, G.-G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment International* 32(3), 417-431.
- Ying, G.-G., Williams, B., and Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International* 28(3), 215-226.
- Yu, L., Deng, J., Shi, X., Liu, C., Yu, K., and Zhou, B. (2010). Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic–pituitary–thyroid axis of zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology* 97(3), 226-233.
- Yu, W.-G., Liu, W., and Jin, Y.-H. (2009a). Effects of perfluorooctane sulfonate on rat thyroid hormone biosynthesis and metabolism. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(5), 990-996.
- Yu, W.-G., Liu, W., Jin, Y.-H., Liu, X.-H., Wang, F.-Q., Liu, L., and Nakayama, S. F. (2009b). Prenatal and postnatal impact of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on rat development: a cross-foster study on chemical burden and thyroid hormone system. *Environmental Science & Technology* 43(21), 8416-8422.
- Zaccaroni, A., Gamberoni, M., Mandrioli, L., Sirri, R., Mordenti, O., Scaravelli, D., Sarli, G., and Parmeggiani, A. (2009). Thyroid hormones as a potential early biomarker of exposure to 4-nonylphenol in adult male shubunkins (*Carassius auratus*). *Science of The Total Environment* 407(10), 3301-3306.
- Zhang, S., Bursian, S. J., Martin, P. A., Chan, H. M., Tomy, G., Palace, V. P., Mayne, G. J., and Martin, J. W. (2009). Reproductive and Developmental Toxicity of a Pentabrominated Diphenyl Ether Mixture, DE-71, to Ranch Mink (*Mustela vison*) and Hazard Assessment for Wild Mink in the Great Lakes Region. *Toxicological Sciences* 110(1), 107-116.

- Zhang, X., Tian, H., Wang, W., and Ru, S. (2013). Exposure to monocrotophos pesticide causes disruption of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis in adult male goldfish (*Carassius auratus*). *General and Comparative Endocrinology* 193(0), 158-166.
- Zhang, Y., and Tao, S. (2009). Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. *Atmospheric Environment* 43(4), 812-819.
- Zhao, X., Wang, S., Li, D., You, H., and Ren, X. (2013). Effects of perchlorate on BDE-47-induced alteration thyroid hormone and gene expression of in the hypothalamus–pituitary–thyroid axis in zebrafish larvae. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(3), 1176-1185.
- Zhao, X., Zhang, H., Ni, Y., Lu, X., Zhang, X., Su, F., Fan, J., Guan, D., and Chen, J. (2011). Polybrominated diphenyl ethers in sediments of the Daliao River Estuary, China: Levels, distribution and their influencing factors. *Chemosphere* 82(9), 1262-1267.
- Zhou, T., Taylor, M. M., DeVito, M. J., and Crofton, K. M. (2002). Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicological Sciences* 66(1), 105-116.
- Zhu, P., Bian, Z., Xia, Y., Han, Y., Qiao, S., Zhao, R., Jin, N., Wang, S., Peng, Y., and Wang, X. (2009). Relationship between urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons and thyroid hormone levels in Chinese non-occupational exposure adult males. *Chemosphere* 77(7), 883-888.
- Zoeller, R. T. (2005). Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Molecular and Cellular Endocrinology* 242(1–2), 10-15.
- Zoeller, R. T. (2007). Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences. *Thyroid* 17(9), 811-817.
- Zoeller, R. T., Bansal, R., and Parris, C. (2005). Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146(2), 607-612.
- Zoeller, R. T., and Crofton, K. M. (2000). Thyroid hormone action in fetal brain development and potential for disruption by environmental chemicals. *Neurotoxicology* 21(6), 935-945.
- Zoeller, R. T., and Rovet, J. (2004). Timing of Thyroid Hormone Action in the Developing Brain: Clinical Observations and Experimental Findings. *Journal of Neuroendocrinology* 16(10), 809-818.

Annexes

Annexe 1. Liste des composés étudiés

Annexe 2 : Chromatogramme HPLC obtenu par analyse de la solution étalon

Annexe 3 : Chromatogramme UHPLC après transposition, obtenu par analyse de la solution étalon

Annexe 4 : Chromatogramme UHPLC après optimisation, obtenu par analyse de la solution étalon

Annexe 5 : Résultats des contaminations par les HAP en zones subtidale et intertidale : comparaison entre les vasières

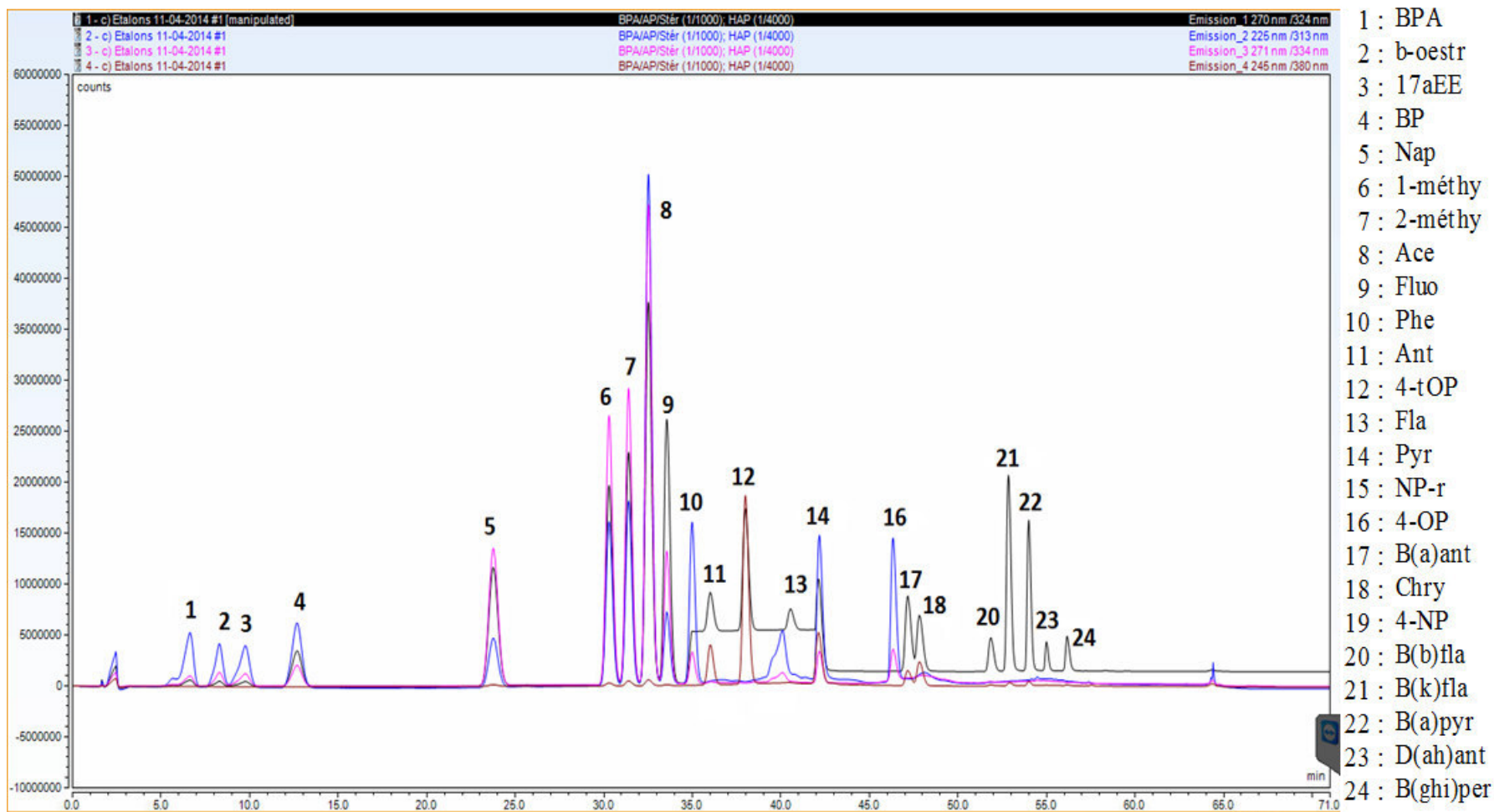
Annexe 6 : Matériels et méthodes : analyses histologiques de la glande thyroïde et mesures des concentrations plasmatiques en T3, T4 et TSH.

Annexe 1. Liste des composés étudiés

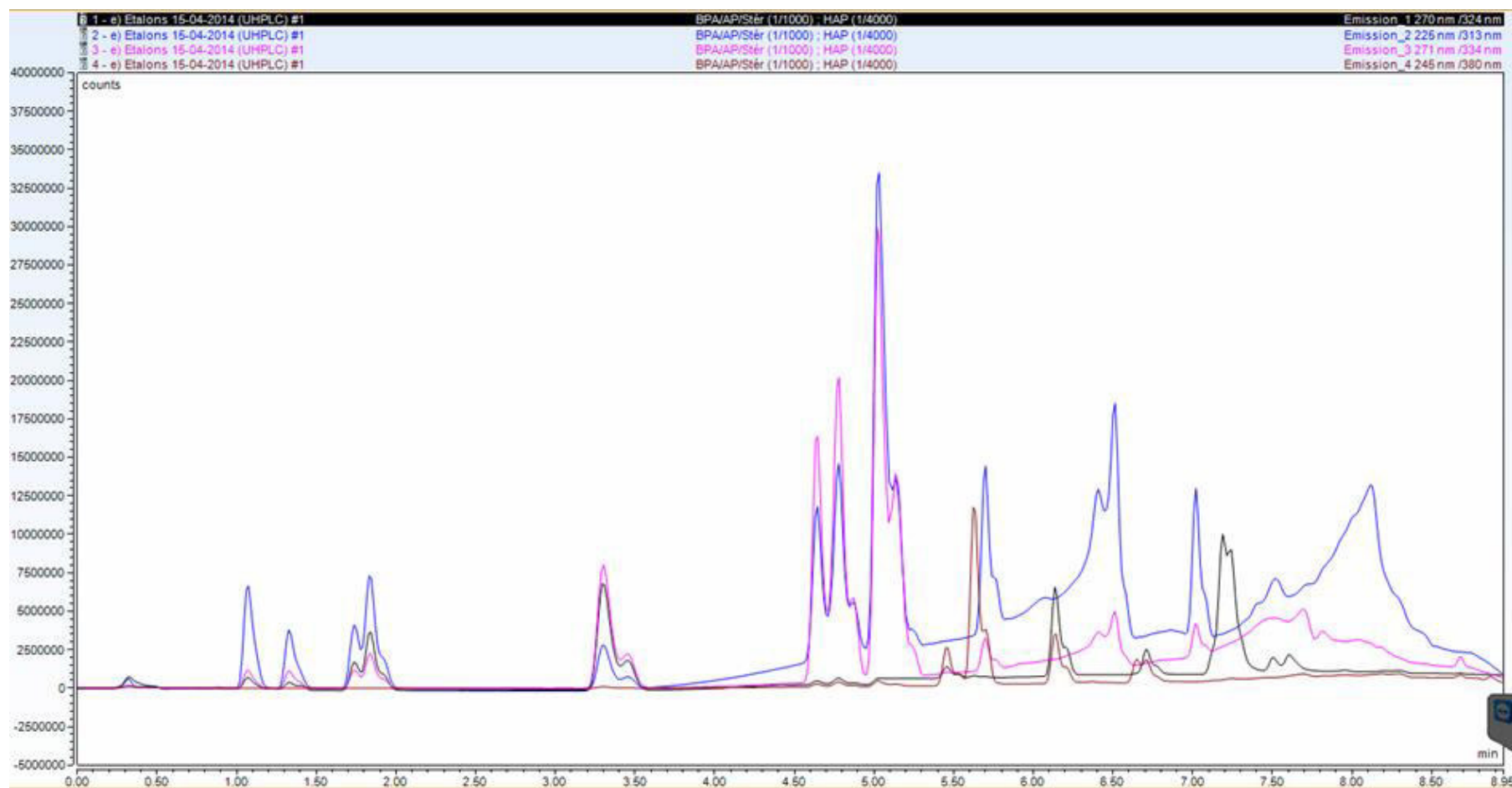
Famille	Sous-Groupes	Composé	Formule Brute	N° CAS	Masse Molaire (g/mol)
Polychlorobiphényles (PCB)	<i>PCB-dl</i>	PCB 77	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	32598-13-3	291,99
		PCB 81	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	70362-50-4	291,99
		PCB 105	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	32598-14-4	326,43
		PCB 114	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	74472-37-0	326,43
		PCB 118	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	31508-00-6	326,43
		PCB 123	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	65510-44-3	326,43
		PCB 126	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	57465-28-8	326,43
		PCB 156	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	38380-08-4	360,88
		PCB 157	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	69782-90-7	360,88
	PCB 167	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	52663-72-6	360,88	
	PCB 169	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	32774-16-6	360,88	
	PCB 189	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	39635-31-9	395,32	
	<i>PCB-ndl</i>	PCB 28	C ₁₂ H ₇ Cl ₃	7012-37-5	257,54
		PCB 52	C ₁₂ H ₆ Cl ₄	35693-99-3	291,99
		PCB 101	C ₁₂ H ₅ Cl ₅	37680-73-2	326,43
		PCB 138	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	35065-28-2	360,88
		PCB 153	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	35065-27-1	360,88
		PCB 180	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	35065-29-3	395,32
Polybromodiphényles éthers (PBDE)	PBDE 28	C ₁₂ H ₇ Br ₃ O	41318-75-6	406,89	
	PBDE 47	C ₁₂ H ₆ Br ₄ O	5436-43-1	485,79	
	PBDE 99	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	60348-60-9	564,69	
	PBDE 100	C ₁₂ H ₅ Br ₅ O	189084-64-8	564,69	
	PBDE 153	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	68631-49-2	643,58	
	PBDE 154	C ₁₂ H ₄ Br ₆ O	207122-15-4	643,58	
	PBDE 183	C ₁₂ H ₃ Br ₇ O	189084-67-1	722,48	
Substances Perfluoroalkylées (PFAS)	<i>Acide perfluorosulfinate</i> Acide perfluorooctylsulfinate (PFOSi)				
	<i>Acides perfluorosulfoniques</i>	Acide perfluorobutanesulfonique (PFBS)	C ₄ F ₉ SO ₃ H	375-73-5	300,10
		Acide perfluorohexanesulfonique (PFHxS)	C ₆ F ₁₃ SO ₃ H	355-46-4	400,11
		Acide perfluoroheptanesulfonique (PFHpS)	C ₇ F ₁₅ SO ₃ H	375-92-8	450,12
		Acide perfluorooctanesulfonique (PFOS)	C ₈ F ₁₇ SO ₃ H	1763-23-1	500,13
		Acide perfluorodécanesulfonique (PFDS)	C ₁₀ F ₂₁ SO ₃ H	13419-61-9	600,14
	<i>Acides perfluorocarboxyliques</i>	Acide perfluorobutanoïque (PFBA)	C ₄ HF ₇ O ₂	375-22-4	214,04
		Acide perfluoropentanoïque (PFPA)	C ₅ HF ₉ O ₂	356-42-3	264,05
		Acide perfluorohexanoïque (PFHxA)	C ₆ HF ₁₁ O ₂	307-24-4	314,06
		Acide perfluoroheptanoïque (PFHpA)	C ₇ HF ₁₃ O ₂	375-85-9	364,06
Acide perfluorooctanoïque (PFOA)		C ₈ HF ₁₅ O ₂	335-67-1	414,08	
Acide perfluorononanoïque (PFNA)		C ₉ HF ₁₇ O ₃	375-95-1	464,08	
Acide perfluorodécanoïque (PFDA)		C ₁₀ HF ₁₉ O ₄	335-76-2	514,09	
Acide perfluoroundécanoïque (PFUnA)		C ₁₁ HF ₂₁ O ₅	2058-94-8	564,09	
Acide perfluorodécanoïque (PFDoA)		C ₁₂ HF ₂₃ O ₆	307-55-1	614,10	
Acide perfluorotridécanoïque (PFTrDA)	C ₁₃ HF ₂₅ O ₇	72629-94-8	664,11		
Acide perfluorotétradécanoïque (PFTeDA)	C ₁₄ HF ₂₇ O ₈	376-06-7	714,12		

Famille	Sous-Gruppe	Composé	Formule Brute	N° CAS	Masse Molaire (g/mol)
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)	<i>Composés parents</i>	Naphtalène	C ₁₀ H ₈	91-20-3	128,17
		1-méthylnaphtalène	C ₁₁ H ₁₀	90-12-0	142,20
		2-méthylnaphtalène	C ₁₁ H ₁₀	91-57-6	142,20
		Acénaphène	C ₁₂ H ₁₀	83-32-9	154,21
		Fluorène	C ₁₃ H ₁₀	86-73-7	166,22
		Phénanthrène	C ₁₄ H ₁₀	85-01-8	178,23
		Anthracène	C ₁₄ H ₁₀	120-12-7	178,23
		Fluoranthène	C ₁₆ H ₁₀	206-44-0	202,25
		Pyrène	C ₁₆ H ₁₀	129-00-0	202,25
		Benzo(a)anthracène	C ₁₈ H ₁₂	56-55-3	228,29
		Chrysène	C ₁₈ H ₁₂	218-01-9	228,29
		Benzo(b)fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂	205-99-2	252,31
		Benzo(k)fluoranthène	C ₂₀ H ₁₂	207-08-9	252,31
		Benzo(a)pyrène	C ₂₀ H ₁₂	50-32-8	252,31
		Benzo(ghi)pérylène	C ₂₂ H ₁₂	191-24-2	276,33
		Dibenzo(ah)anthracène	C ₂₂ H ₁₄	53-70-3	278,35
	<i>Métabolites (OH-HAP)</i>	2-hydroxynaphtalène (2-OHNa)	C ₁₀ H ₈ O	135-19-3	144,17
		2-hydroxyfluorène (2-OHF)	C ₁₃ H ₁₀ O	2443-58-5	182,22
		1-hydroxyphénanthrène (1-OHPhe)	C ₁₄ H ₁₀ O	2433-56-9	194,23
		9-hydroxyphénanthrène (9-OHPhe)	C ₁₄ H ₁₀ O	484-17-3	194,23
1-hydroxypyrene (1-OHPyr)		C ₁₆ H ₁₀ O	5315-79-7	218,25	
Alkylphénols (AP)	4-n-Butylphénol	C ₁₀ H ₁₄ O	1638-22-8	150,22	
	4-ter-Octylphénol	C ₁₄ H ₂₂ O	140-66-9	206,32	
	4-n-Octylphénol	C ₁₄ H ₂₂ O	1806-26-4	206,32	
	4-n-Nonylphénol	C ₁₅ H ₂₄ O	104-40-5	220,35	
	4-Nonylphénol ramifié	C ₁₅ H ₂₄ O	84852-15-3	220,35	
Phénol		Bisphénol A	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	80-05-7	228,29

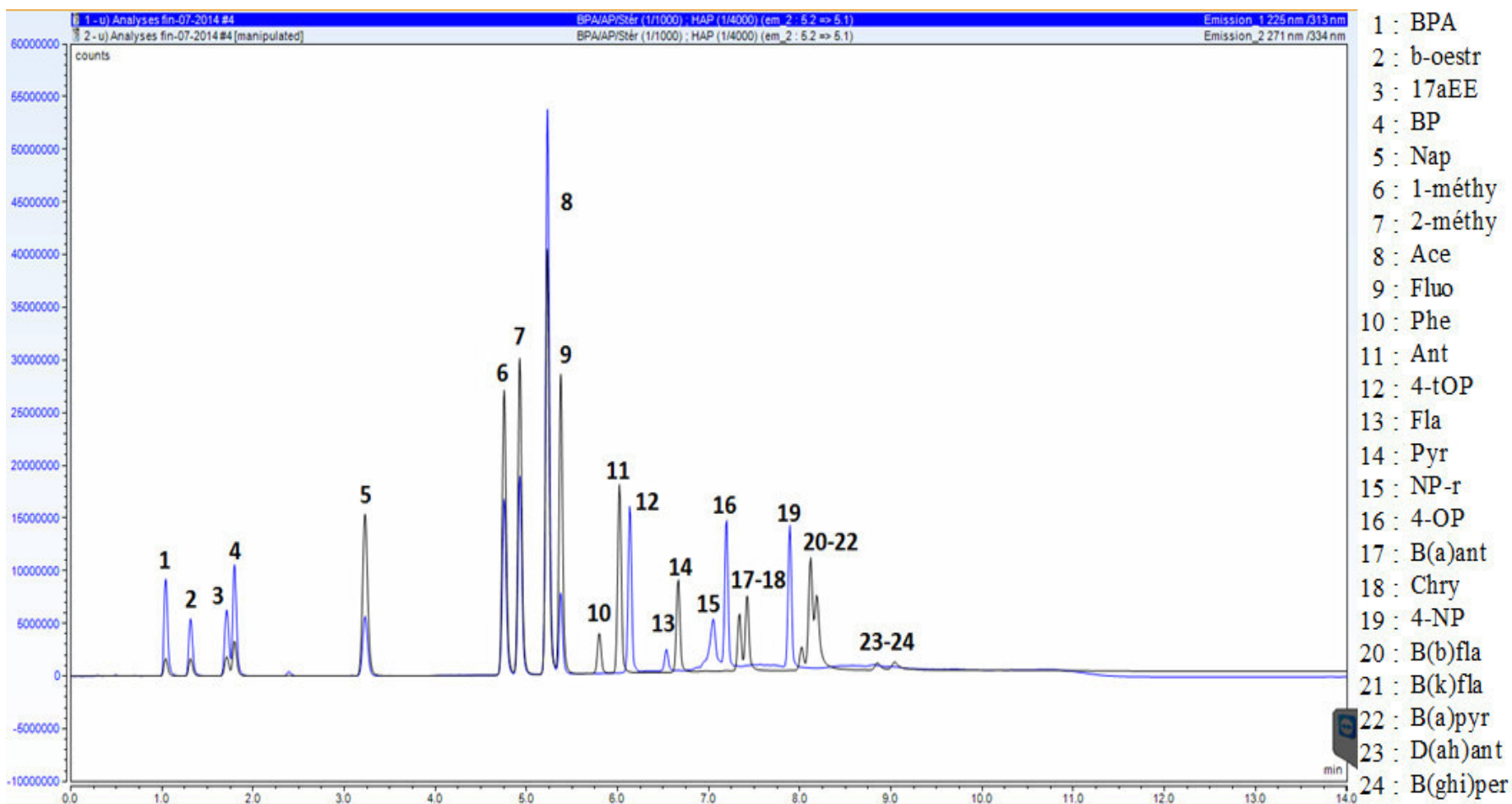
Annexe 2 : Chromatogramme HPLC obtenu par analyse de la solution étalon



Annexe 3 : Chromatogramme UHPLC après transposition, obtenu par analyse de la solution étalon



Annexe 4 : Chromatogramme UHPLC après optimisation, obtenu par analyse de la solution étalon



Annexe 5 : Résultats des contaminations par les HAP en zones subtidale et intertidale : comparaison entre les vasières

Zone	Site	Saison	Unité	∑ HAP	Nap	1-méthy	2-méthy	Ace	Fluo	Phe	Ant	Fla
Subtidale	Bellevue Sud	Été 2012	[C] (ng/g séd)	654,9 ± 52,1 a	12,6 ± 2,2 a	4,1 ± 1,0 b	13,8 ± 2,9 b	3,3 ± 1,1 a	4,6 ± 0,9 a	42,1 ± 1,8 a	30,6 ± 6,6 b	96,1 ± 18,8 a
			[C] (n/g COT)	22051,3 ± 1755,0 a	424,0 ± 75,3 a	138,3 ± 34,2 b	463,8 ± 99,0 b	110,2 ± 38,6 a	156,2 ± 30,5 a	1416,9 ± 60,3 a	1028,6 ± 220,9 b	3235,9 ± 633,1 a
Intertidale	Bellevue Sud	Été 2011	[C] (ng/g séd)	848,2 ± 250,3 a	17,7 ± 2,6 a	6,3 ± 0,7 a	37,8 ± 13,8 a	4,5 ± 1,9 a	5,0 ± 1,5 a	48,0 ± 18,2 a	6,6 ± 8,7 a	85,0 ± 12,1 a
			[C] (n/g COT)	26663,3 ± 7860,2 a	557,4 ± 82,8 a	198,7 ± 21,0 a	1187,2 ± 435,1 a	141,8 ± 59,4 a	158,3 ± 46,7 a	1508,0 ± 571,3 a	207,7 ± 273,2 a	2670,7 ± 380,2 a
Subtidale	Rezé	Été 2012	[C] (ng/g séd)	622,9 ± 85,5 a	13,4 ± 0,7 b	4,9 ± 0,3 b	18,1 ± 2,5 a	3,4 ± 1,1 a	4,7 ± 0,5 a	38,6 ± 8,4 a	32,2 ± 8,9 b	70,5 ± 7,7 a
			[C] (n/g COT)	23864,9 ± 3274,9 a	513,7 ± 28,3 b	189,3 ± 10,5 a	693,1 ± 97,3 a	132,1 ± 41,5 a	180,1 ± 21,0 a	1477,6 ± 321,3 a	1235,6 ± 339,5 b	2701,1 ± 293,6 a
Intertidale	Rezé	Été 2011	[C] (ng/g séd)	824,1 ± 204,0 a	25,0 ± 8,2 a	8,8 ± 3,4 a	53,0 ± 31,9 a	4,4 ± 0,9 a	6,8 ± 2,0 a	54,9 ± 14,3 a	9,2 ± 7,1 a	80,5 ± 5,1 a
			[C] (n/g COT)	26352,7 ± 6536,5 a	800,5 ± 261,3 a	281,4 ± 110,4 a	1694,6 ± 1021,0 a	139,9 ± 28,5 a	216,5 ± 64,2 a	1755,4 ± 458,1 a	292,5 ± 228,2 a	2574,7 ± 162,2 a
Subtidale	Haute Indre	Été 2012	[C] (ng/g séd)	2004,5 ± 1122,2 b	21,1 ± 3,0 a	5,6 ± 0,9 a	18,1 ± 2,1 a	5,9 ± 3,8 a	9,7 ± 2,2 a	161,8 ± 72,2 b	88,8 ± 41,8 b	396,2 ± 316,0 b
			[C] (n/g COT)	81814,5 ± 45804,7 b	859,4 ± 124,4 a	229,2 ± 36,9 a	737,7 ± 85,9 a	240,2 ± 154,8 a	395,7 ± 90,2 b	6604,0 ± 2947,7 b	3625,4 ± 1708,0 b	16172,3 ± 12896,4 b
Intertidale	Haute Indre	Été 2011	[C] (ng/g séd)	867,9 ± 269,4 a	22,5 ± 3,6 a	8,1 ± 1,7 a	45,4 ± 22,5 a	4,2 ± 1,1 a	6,4 ± 2,5 a	58,4 ± 17,2 a	7,5 ± 6,6 a	84,1 ± 14,5 a
			[C] (n/g COT)	27373,5 ± 8494,7 a	710,2 ± 114,4 a	254,7 ± 53,7 a	1431,0 ± 710,2 a	133,5 ± 33,9 a	202,2 ± 79,3 a	1841,7 ± 542,0 a	235,8 ± 207,8 a	2653,1 ± 458,7 a
Subtidale	Donges	Été 2012	[C] (ng/g séd)	322,8 ± 44,6 b	9,1 ± 1,4 b	3,6 ± 0,7 b	10,6 ± 1,2 b	1,7 ± 0,6 a	3,1 ± 0,8 b	21,4 ± 0,6 b	15,1 ± 7,6 b	43,7 ± 2,6 b
			[C] (n/g COT)	17736,5 ± 2452,2 a	498,9 ± 78,7 b	197,5 ± 35,9 a	584,0 ± 64,0 b	95,2 ± 32,9 a	170,6 ± 46,1 a	1175,0 ± 32,6 a	827,1 ± 414,9 b	2403,3 ± 141,7 a
Intertidale	Donges	Été 2011	[C] (ng/g séd)	778,5 ± 339,8 a	19,8 ± 3,3 a	9,2 ± 3,2 a	44,8 ± 23,4 a	3,9 ± 2,2 a	9,1 ± 6,1 a	63,2 ± 35,7 a	6,4 ± 2,6 a	73,8 ± 22,4 a
			[C] (n/g COT)	31033,6 ± 13553,6 a	790,9 ± 130,4 a	366,5 ± 125,9 a	1785,0 ± 934,1 a	155,9 ± 87,9 a	362,4 ± 243,4 a	2519,8 ± 1423,6 a	256,4 ± 103,5 a	2941,6 ± 893,3 a
Subtidale	Mifanin	Été 2012	[C] (ng/g séd)	317,3 ± 69,5 b	9,2 ± 1,4 a	3,4 ± 0,6 a	12,7 ± 4,8 a	2,9 ± 2,7 a	3,9 ± 1,6 a	22,7 ± 5,3 b	14,7 ± 6,5 a	37,6 ± 6,2 b
			[C] (n/g COT)	19232,4 ± 4210,0 b	560,6 ± 87,1 a	207,7 ± 37,7 a	771,5 ± 291,1 a	176,1 ± 164,2 a	233,4 ± 97,5 a	1378,4 ± 319,9 b	892,6 ± 393,3 a	2277,5 ± 377,6 b
Intertidale	Mifanin	Été 2011	[C] (ng/g séd)	786,2 ± 277,4 a	17,2 ± 7,1 a	5,4 ± 2,1 a	29,4 ± 18,1 a	4,9 ± 3,0 a	7,4 ± 2,6 a	69,0 ± 21,2 a	7,1 ± 3,6 a	95,2 ± 11,5 a
			[C] (n/g COT)	50429,0 ± 17809,4 a	1102,9 ± 457,0 a	346,6 ± 131,9 a	1888,2 ± 1159,3 a	316,7 ± 192,6 a	476,6 ± 168,8 a	4425,8 ± 1358,3 a	453,6 ± 228,3 a	6103,2 ± 741,7 a

Zone	Site	Saison	Unité	Pyr	B(a)ant	Chry	B(b)fla	B(k)fla	B(a)pyr	D(ah)ant	B(ghi)per
Subtidale	Bellevue Sud	Été 2012	[C] (ng/g séd)	82,2 ± 9,7 a	94,5 ± 10,7 a	30,3 ± 3,3 a	56,2 ± 3,3 b	29,5 ± 2,1 a	105,7 ± 17,0 a	20,5 ± 1,3 a	28,9 ± 3,2 a
			[C] (n/g COT)	2767,6 ± 328,2 a	3182,0 ± 360,4 a	1021,6 ± 109,8 a	1890,7 ± 111,1 a	994,3 ± 70,9 a	3558,5 ± 571,0 a	689,1 ± 45,4 a	973,5 ± 108,0 a
Été 2011		[C] (ng/g séd)	101,0 ± 35,3 a	71,2 ± 17,8 a	67,9 ± 38,0 a	93,3 ± 30,8 a	46,4 ± 16,1 a	116,7 ± 30,2 a	38,6 ± 16,5 a	102,1 ± 64,0 a	
		[C] (n/g COT)	3174,6 ± 1108,3 a	2239,7 ± 561,0 a	2135,5 ± 1194,8 a	2933,5 ± 967,4 a	1459,3 ± 505,5 a	3669,2 ± 947,4 a	1212,0 ± 517,5 a	3209,5 ± 2010,6 a	
Subtidale	Rezé	Été 2012	[C] (ng/g séd)	66,6 ± 5,9 a	88,0 ± 13,6 a	27,9 ± 4,8 a	62,6 ± 21,4 a	31,6 ± 9,5 a	110,5 ± 27,8 a	23,0 ± 5,6 a	26,8 ± 6,1 b
			[C] (n/g COT)	2551,6 ± 225,5 a	3370,5 ± 520,8 a	1070,5 ± 183,5 a	2397,0 ± 821,8 a	1211,5 ± 363,9 a	4234,3 ± 1064,4 a	880,6 ± 216,3 a	1026,0 ± 233,9 a
Été 2011		[C] (ng/g séd)	93,1 ± 21,9 a	66,6 ± 18,1 a	61,0 ± 31,0 a	88,0 ± 23,5 a	42,5 ± 12,6 a	100,3 ± 22,4 a	35,4 ± 12,8 a	94,6 ± 52,8 a	
		[C] (n/g COT)	2976,4 ± 703,0 a	2129,6 ± 575,9 a	1950,2 ± 992,9 a	2814,6 ± 752,9 a	1360,2 ± 403,9 a	3208,1 ± 719,5 a	1133,5 ± 411,0 a	3024,7 ± 1690,4 a	
Subtidale	Haute Indre	Été 2012	[C] (ng/g séd)	338,6 ± 184,4 b	283,7 ± 179,8 b	70,6 ± 38,0 a	138,9 ± 81,1 a	69,8 ± 29,4 a	274,0 ± 135,8 b	46,9 ± 20,7 a	74,8 ± 44,4 a
			[C] (n/g COT)	13818,7 ± 7528,1 b	11579,0 ± 7338,0 b	2879,7 ± 1549,3 a	5670,1 ± 3311,7 a	2850,8 ± 1200,2 a	11185,1 ± 5544,2 b	1916,2 ± 846,7 a	3051,2 ± 1811,6 a
Été 2011		[C] (ng/g séd)	98,9 ± 39,2 a	70,1 ± 16,0 a	67,7 ± 38,6 a	93,5 ± 33,5 a	47,6 ± 16,1 a	115,0 ± 25,1 a	35,9 ± 12,6 a	102,6 ± 63,8 a	
		[C] (n/g COT)	3118,1 ± 1235,8 a	2212,6 ± 503,5 a	2134,6 ± 1216,9 a	2948,3 ± 1055,1 a	1501,1 ± 507,3 a	3627,1 ± 792,6 a	1133,7 ± 397,4 a	3235,7 ± 2013,1 a	
Subtidale	Donges	Été 2012	[C] (ng/g séd)	37,2 ± 0,5 b	49,5 ± 4,9 a	14,7 ± 2,6 a	34,1 ± 2,3 b	16,1 ± 0,2 b	36,1 ± 25,0 a	13,1 ± 1,8 b	13,6 ± 0,2 b
			[C] (n/g COT)	2043,6 ± 28,1 a	2719,9 ± 268,7 a	806,3 ± 140,2 a	1875,6 ± 126,5 b	883,3 ± 8,6 b	1984,1 ± 1374,1 a	722,1 ± 100,8 a	749,9 ± 8,8 b
Été 2011		[C] (ng/g séd)	90,2 ± 35,4 a	62,3 ± 12,5 a	58,6 ± 38,1 a	88,3 ± 26,5 a	42,8 ± 14,2 a	81,4 ± 66,7 a	33,2 ± 15,2 a	91,4 ± 62,5 a	
		[C] (n/g COT)	3595,9 ± 1411,6 a	2482,4 ± 499,1 a	2335,3 ± 1518,9 a	3521,0 ± 1057,8 a	1706,7 ± 565,8 a	3243,9 ± 2657,3 a	1324,9 ± 605,4 a	3644,9 ± 2491,7 a	
Subtidale	Mindin	Été 2012	[C] (ng/g séd)	35,4 ± 4,2 b	48,8 ± 8,5 b	13,1 ± 2,0 b	35,0 ± 1,3 b	15,5 ± 0,8 b	36,1 ± 23,3 a	12,4 ± 1,3 a	13,9 ± 1,9 b
			[C] (n/g COT)	2147,9 ± 252,6 b	2955,6 ± 515,8 b	791,2 ± 119,7 b	2120,7 ± 81,1 b	939,5 ± 51,2 b	2189,7 ± 1411,8 a	748,8 ± 78,9 b	841,0 ± 117,2 b
Été 2011		[C] (ng/g séd)	107,5 ± 36,3 a	76,6 ± 12,2 a	61,1 ± 36,0 a	77,2 ± 19,5 a	42,6 ± 14,5 a	78,9 ± 60,4 a	28,6 ± 13,2 a	78,0 ± 52,8 a	
		[C] (n/g COT)	6897,4 ± 2328,3 a	4915,6 ± 781,0 a	3921,4 ± 2312,5 a	4954,7 ± 1251,9 a	2730,4 ± 933,9 a	5061,6 ± 3874,4 a	1832,8 ± 845,8 a	5001,5 ± 3386,1 a	

a, b, c : indices tenant compte des différences interzones

Annexe 6 : Matériels et méthodes : analyses histologiques de la glande thyroïde et mesures des concentrations plasmatiques en T3, T4 et TSH.

1) Autopsie et histologie de la glande thyroïde

Tous les animaux ont été anesthésiés avec de l'isoflurane en utilisant une concentration adaptée à la taille des animaux et sacrifiés par ponction cardiaque. Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés. Après centrifugation, les échantillons de plasma obtenus ont été stockés à -80 ° C jusqu'à l'analyse. Une autopsie a été pratiquée sur chacun des animaux euthanasiés afin de rechercher des anomalies macroscopiques des organes. La glande thyroïde a été prélevée, pesée et les tissus ont été fixés dans une solution de formol tamponné (formalin 10%). Les tissus ont été préparés en utilisant un automate (Citadel 1000, Shandon) et inclus dans la paraffine. Des coupes de 5 µm de la glande ont été réalisées puis colorées à l'hématoxyline-éosine (automate Microm HMS 740) avant observation.

La taille des follicules thyroïdiens a été mesurée en cinq sections différentes de la périphérie (externe) et l'intérieur de la glande. Pour chaque zone (périphérie et interne), au moins cinq images ont été analysées et les mesures de la taille des follicules ont été réalisées à partir de cinq follicules choisis au hasard sur chacune des images. Un total de 25 mesures a donc été réalisé pour chacune des deux zones observées par glande. Toutes les mesures ont été effectuées en aveugle, sans connaître le traitement de l'animal et par un seul observateur pour chacune des 3 séries de mesures (mère, juvéniles de 21 jours et juvéniles de 75 jours).

2) Concentration plasmatiques en hormones thyroïdiennes

Les concentrations en thyroxine totale (T4 totale) et triiodothyronine libre (T3 libre) ont été déterminées dans les échantillons de plasma de rat en utilisant des kits de dosages radio-immunologique (kit RIA, Beckman Coulter). Un compteur gamma (Assistant 10DET1470010, Perkin Elmer) a été utilisé pour déterminer l'activité de l'anticorps monoclonal marqué à l'iode 125 spécifique de chaque hormone (T3 et T4) dans les solutions étalons et les échantillons. Les coefficients de variation intra-essai étaient inférieurs à 6,2% pour la T4 totale et à 6,4% pour la T3 libre. La variation inter-essai a été évitée par la mesure de tous les échantillons en une seule série d'analyse. Les limites de détection de la T4 totale et de la T3 libre étaient de 3,37 ng/mL et 0,11 pg/mL respectivement. Les concentrations plasmatiques de TSH ont été déterminées au moyen d'un kit de test ELISA (kit Rat TSH

ELISA, BioVendor) et la lecture a été réalisée au moyen d'un analyseur automatisé de microplaques (ETI MAX 3000, DiaSorin).

3) Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel d'analyse de données STATISTICA 7 (StatSoft, Inc.), en utilisant la portée comme unité d'analyse. Pour évaluer les effets, chaque groupe de dose (*i.e.* 50 mg/kg/jour et 200 mg/kg/jour) a été comparé au groupe contrôle (0 mg/kg/jour). Un test de valeurs aberrantes, test de Grubbs, a été appliqué aux données avec un risque d'erreur de 5%. Les conditions d'application des tests paramétriques, c'est-à-dire l'homogénéité de la variance et la normalité, ont été vérifiées respectivement à l'aide des tests de Bartlett et Shapiro. Pour toutes les données répondant à ces conditions, un test d'analyses de la variance (ANOVA) a été utilisé pour déterminer les effets du traitement. Lorsque les conditions de test paramétrique n'étaient pas respectées, un test de Kruskal-Wallis ANOVA (KW) a été effectué. Quand ces tests étaient significatifs, des tests *post hoc* appropriés étaient utilisés : le test de différence significative minimale (LSD) de Fisher ou le test de comparaison multiple par paire (MCP).

Évaluation de la contamination des sédiments et de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) dans l'estuaire de la Loire par des substances chimiques de type perturbateurs thyroïdiens et interprétation en termes d'écotoxicité et de risque sanitaire

Parmi les perturbateurs endocriniens, les composés agissant sur le système thyroïdien n'ont été étudiés que récemment malgré l'importance majeure de cette fonction dans de nombreux processus physiologiques de l'organisme (*e.g.* croissance, métabolisme, développement). L'estuaire de la Loire est un espace soumis à de fortes pressions anthropiques, sources de contaminations potentiellement néfastes au fonctionnement du système thyroïdien des organismes vivants et de l'Homme. Dans cette étude, six familles de perturbateurs thyroïdiens (PT) potentiels ou avérés, les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényles éthers (PBDE), les substances perfluoroalkylés (PFAS), les alkylphénols (AP), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et le bisphénol A (BPA) ont été investigués. La présence de composés de type PT a été démontrée dans les sédiments de l'estuaire qui ont également révélé une activité perturbatrice appréciée par des tests *in vitro*. De par son importance écologique et économique, l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) a également été étudiée comme espèce sentinelle de la contamination chimique de l'estuaire. Chez cette espèce, des corrélations entre la présence de ces contaminants dans l'organisme et le statut thyroïdien (concentrations en hormones et expression génique) ont été trouvées. Enfin, dans le but de pouvoir déterminer les effets chez l'Homme d'une consommation de poissons contaminés, un focus spécifique en terme de caractérisation du danger ciblant l'un de ces contaminants, le 4-nonylphénol, a permis de mettre en évidence chez le rat une relation de causalité entre développement neurologique et exposition à cette substance chimique.

Mots-clés : Perturbateurs thyroïdiens, Polluants organiques persistants, Estuaire de la Loire, Sédiments, Anguille Européenne, Écotoxicité, Risque Sanitaire

Evaluation of the contamination of sediments and European eels (*Anguilla Anguilla*) in the Loire estuary by chemical disruptor of the thyroid gland and interpretation in terms of ecotoxicity and sanitary consequence.

Among endocrine disruptors, compounds acting on the thyroid system have only recently been studied despite the great importance of this function in many physiological processes (*e.g.* growth, metabolism, development). The Loire estuary is an area subject to strong anthropogenic pressures, sources of contaminations potentially harmful to the functioning of the thyroid system of living organisms including humans. In this study, six families of potential or recognized thyroid disruptor compounds (TDC) were investigated: polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), perfluoroalkyl substances (PFAS), alkylphenols (AP), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and bisphenol A (BPA). The presence of TDC has been demonstrated in the sediments of the estuary, which also revealed a disruptive activity assessed using *in vitro* assays. Due to its ecological and economic importance, the European eel (*Anguilla anguilla*) was also studied as a sentinel species of the chemical contamination of the estuary. In this species, correlations between the presence of TDC in the body and the thyroid status (hormone concentrations and gene expression) were found. Eventually, in order to determine the effects of contaminated fish consumption in humans, a specific focus in terms of hazard characterization targeting specifically 4-nonylphenol, allowed highlighting a causal relationship between exposure to this chemical and neurodevelopment in rats.

Keywords: Thyroid disruptors, Persistent organic pollutants, Loire estuary, Sediment, European eel, Ecotoxicity, Sanitary risk