



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

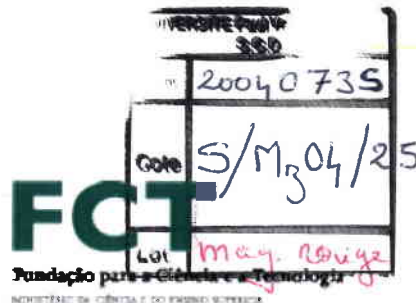
## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



**THÈSE DE DOCTORAT**  
*PRÉSENTÉE A*  
**L'UNIVERSITÉ DE METZ**  
*POUR L'OBTENTION DU TITRE DE*  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE METZ**  
**SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE**  
**OPTION : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT**

*PAR*  
**Ilizabete MAGALHÃES-ANTOINE**

---

**DÉVELOPPEMENT D'UN TEST D'AGGLUTINATION  
POUR LA DÉTECTION, *IN SITU*, DE LA VITELLOGÉNINE :  
BIOMARQUEUR DE LA CONTAMINATION DES ÉCOSYSTÈMES  
AQUATIQUES PAR LES ŒSTROGÈNES MIMÉTIQUES**

---

**SOUTENUE LE 10 DÉCEMBRE 2004 DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :**

|                        |                           |
|------------------------|---------------------------|
| <b>Pr. I. PERES</b>    | <b>Rapporteur</b>         |
| <b>Pr. C. CASELLAS</b> | <b>Rapporteur</b>         |
| <b>Pr. P. VASSEUR</b>  | <b>Examineur</b>          |
| <b>Pr. J. FALLA</b>    | <b>Directeur de Thèse</b> |
| <b>Pr. J.-C. PIHAN</b> | <b>Directeur de Thèse</b> |

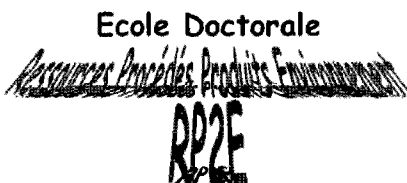
**Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie  
(Laboratoire ESE-CNRS, unité FR2635)  
IUT de Thionville-Yutz  
Impasse A. Kastler  
57970 YUTZ**

**Equipe de Production des Ecosystèmes et Ecotoxicologie  
(Laboratoire LBFE)  
UFR SciFa  
Campus Bridoux, rue du G. Delestraint  
57070 Metz**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



031 536303 2



## THÈSE DE DOCTORAT

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ DE METZ

POUR L'OBTENTION DU TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE METZ

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE

OPTION : TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

PAR

Ilizabete MAGALHÃES-ANTOINE

| UNIVERSITÉ Paul Verlaine - METZ<br>S.C.D. |            |
|-------------------------------------------|------------|
| N° Inv.                                   | 2004 0735  |
| Cote                                      | S/M304/25  |
| Loc.                                      | Mag. 12042 |

---

# DÉVELOPPEMENT D'UN TEST D'AGGLUTINATION POUR LA DÉTECTION, *IN SITU*, DE LA VITELLOGÉNINE : BIOMARQUEUR DE LA CONTAMINATION DES ÉCOSYSTÈMES AQUATIQUES PAR LES ŒSTROGÈNES MIMÉTIQUES

---

SOUTENUE LE 10 DÉCEMBRE 2004 DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Pr. I. PERES  
Pr. C. CASELLAS  
Pr. P. VASSEUR  
Pr. J. FALLA  
Pr. J.-C. PIHAN

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de Thèse  
Directeur de Thèse

Laboratoire d'Immunologie-Microbiologie  
(Laboratoire ESE-CNRS, unité FR2635)  
IUT de Thionville-Yutz  
Impasse A. Kastler  
57970 YUTZ

Equipe de Production des Ecosystèmes et Ecotoxicologie  
(Laboratoire LBFE)  
UFR SciFa  
Campus Bridoux, rue du G. Delestraint  
57070 Metz

A mes parents, ma sœur, mon mari

*et ...*

*à mon parrain...*



## ***Remerciements***

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Messieurs les Professeurs Jairo FALLA et Jean-Claude PIHAN pour leur compétence, leurs conseils, leur disponibilité et surtout leur aide sans laquelle ce travail n'aurait pas été aussi abouti. Je veux aussi les remercier pour leur confiance et pour m'avoir permis de participer à l'élaboration de différents projets.

Je remercie également Mesdames les Professeurs Isabel PERES et Claude CASELLAS d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et pour l'intérêt qu'elles ont porté à ce travail.

Mes remerciements vont aussi à Madame le Professeur Paule Vasseur qui, a accepté de faire parti des membres du jury.

Je remercie également le Président de la Fondation portugaise pour la Science et la Technologie, Monsieur le Professeur Fernando RAMÔA RIBEIRO d'avoir cru en mon travail et d'avoir permis qu'il se réalise.

Je tiens également à remercier chaleureusement Mademoiselle Marie-Laure LEDRICH ainsi que Messieurs Frédéric MELCHIOR, Philippe LAVAL-GILLY et Laurent FOUCAUD pour leur disponibilité de tous les instants et leurs nombreux conseils qui ont permis d'améliorer la qualité de cette recherche.

J'associe également à ce travail l'ensemble du personnel du département Génie Biologique de l'IUT de Thionville-Yutz pour leurs aides et leur gentillesse.

Enfin, je tiens à remercier mes parents, ma sœur et mon mari pour leur soutien inconditionnel durant ce travail.



## ***Avant-Propos***

Ce travail a été co-financé (Bourse de doctorat : SFRH / BD / 3924 / 2000) par la Fondation pour la Science et la Technologie (FCT : Fundação para a Ciência e a Tecnologia, appartenant au ministère de la Science et de l'Enseignement Supérieur portugais) et par le Fond Social Européen (FSE), dans la cadre du III<sup>ème</sup> plan communautaire d'appui financier.

De plus, ce travail a fait l'objet de trois articles scientifiques dont deux ont été publiés en 2004.

## ***Table des Matières***

|                                                                                                                          |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Remerciements.....                                                                                                       | 1          |
| Avant-Propos .....                                                                                                       | 3          |
| Table des Matières .....                                                                                                 | 4          |
| Abréviations.....                                                                                                        | 6          |
| Listes des poissons .....                                                                                                | 7          |
| <b>Introduction .....</b>                                                                                                | <b>9</b>   |
| <b>Partie I. Analyse Bibliographique .....</b>                                                                           | <b>15</b>  |
| I. A. Les œstrogènes mimétiques.....                                                                                     | 17         |
| I. A. - 1. Les œstrogènes.....                                                                                           | 19         |
| I. A. - 2. Les molécules d'origine industrielle .....                                                                    | 33         |
| I. B. Les Effets .....                                                                                                   | 54         |
| I. B. - 1. Effets sur l'espèce humaine .....                                                                             | 54         |
| I. B. - 2. Effets sur les espèces piscicoles .....                                                                       | 57         |
| I. C. La vitellogénine : Biomarqueur d'exposition .....                                                                  | 72         |
| I. C. - 1. La vitellogénine.....                                                                                         | 73         |
| I. C. - 2. Biomarqueur des œstrogènes mimétiques .....                                                                   | 78         |
| I. D. Détection de la production anormale de VTG .....                                                                   | 84         |
| I. D. - 1. Dosages indirects .....                                                                                       | 84         |
| I. D. - 2. Dosages directs .....                                                                                         | 84         |
| I. E. Le test d'agglutination à billes de latex (ou LAT pour Latex Agglutination Test).....                              | 96         |
| I. E. - 1. Historique.....                                                                                               | 96         |
| I. E. - 2. Principe des tests d'agglutination à billes de latex.....                                                     | 97         |
| I. E. - 3. Facteurs influençant l'adsorption des anticorps.....                                                          | 100        |
| I. E. - 4. Etude de l'adsorption des anticorps sur la surface des billes de latex à l'aide de modèles mathématiques..... | 102        |
| I. E. - 5. Immunoagglutination.....                                                                                      | 107        |
| <b>Partie II. Matériels et Méthodes.....</b>                                                                             | <b>113</b> |
| II. A. Purification de la vitellogénine.....                                                                             | 115        |
| II. A. - 1. Induction de la synthèse de VTG de carpe (Cyprinus carpio).....                                              | 115        |
| II. A. - 2. Première méthode de purification.....                                                                        | 116        |
| II. A. - 3. Deuxième méthode de purification.....                                                                        | 117        |
| II. A. - 4. Etudes électrophorétiques.....                                                                               | 118        |
| II. B. Production des anticorps monoclonaux spécifiques de la vitellogénine.....                                         | 122        |
| II. B. - 1. Immunisation des souris.....                                                                                 | 122        |
| II. B. - 2. Culture cellulaire.....                                                                                      | 122        |
| II. B. - 3. Fusion .....                                                                                                 | 124        |
| II. B. - 4. Sélection des hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques de la vitellogénine..                           | 126        |
| II. B. - 5. Clonage.....                                                                                                 | 127        |
| II. B. - 6. Production des anticorps monoclonaux.....                                                                    | 130        |
| II. C. Sélection des anticorps monoclonaux multi-espèces.....                                                            | 135        |
| II. C. - 1. Les poissons.....                                                                                            | 135        |
| II. C. - 2. Etudes histologiques.....                                                                                    | 135        |
| II. C. - 3. Etude de l'affinité des anticorps monoclonaux.....                                                           | 136        |
| II. D. Développement du test d'agglutination .....                                                                       | 138        |
| II. D. - 1. Protocole d'adsorption des anticorps monoclonaux.....                                                        | 138        |
| II. D. - 2. Etude du pH d'adsorption.....                                                                                | 140        |
| II. D. - 3. Etude de la cinétique d'adsorption des Acms retenus pour leur spécificité vis-à-vis de la VTG .....          | 141        |
| II. D. - 4. Etude de l'immunoréactivité .....                                                                            | 144        |

|                                                                                    |            |
|------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Partie III. Résultats et Discussion.....</b>                                    | <b>147</b> |
| III. A. Purification de la vitellogénine de carpe .....                            | 149        |
| III. A. - 1. Induction de la synthèse de vitellogénine.....                        | 149        |
| III. A. - 2. Méthode de purification .....                                         | 155        |
| III. A. - 3. Deuxième méthode de purification .....                                | 162        |
| III. B. Production des anticorps monoclonaux spécifiques de la vitellogénine ..... | 167        |
| III. B. - 1. Production des Acms anti- VTG de carpe .....                          | 167        |
| III. B. - 2. Sélection des Acms anti-VTGs multi-espèces .....                      | 172        |
| III. C. Développement d'un test d'agglutination.....                               | 179        |
| III. C. - 1. Développement avec des billes de 2 µm .....                           | 180        |
| III. C. - 2. Essai préliminaire avec des billes de 1 µm.....                       | 189        |
| III. C. - 3. Optimisation du test avec les billes de 1 µm .....                    | 195        |
| III. C. - 4. Essai sur le terrain .....                                            | 213        |
| <b>Conclusions et Perspectives.....</b>                                            | <b>217</b> |
| <b>Références Bibliographiques.....</b>                                            | <b>225</b> |
| <b>Annexes .....</b>                                                               | <b>253</b> |

## *Abréviations*

|                                             |                                                    |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| Ac : Anticorps                              | L-glu : L-glutamine                                |
| Acp : Anticorps polyclonaux                 | MS : Mass spectrophotometry                        |
| Acm : Anticorps monoclonaux                 | n.d. : non détecté                                 |
| Ag : Antigène                               | 4-NP : Nonylphénol                                 |
| ApnEO : Alkylphénol polyéthoxylate          | NPnEO : Nonylphénol polyéthoxylate                 |
| BBP : Butylbenzylphthalate                  | NTB : Nitrobluetetrazolium                         |
| BCF : Facteur de bioconcentration           | ŒM : Œstrogène mimétique                           |
| BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate  | 4-OP : Octylphénol                                 |
| Bio A : Biochanine A                        | OPnEO : Octylphénol polyéthoxylate                 |
| BPA : Bisphénol A                           | PAE : Phtalates                                    |
| BSA : Bovin serum albumin                   | PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis          |
| DBP : Dibutylphthalate                      | PBS : Phosphate buffer salin                       |
| DDE : Dichlorodiphényldichloroéthane        | PCB : Polychlorobiphényle                          |
| DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane       | PCDD : Polychlorodibenzodioxine                    |
| DEHP : Diéthylhexylphthalate                | PCDF : Polychlorodibenzofuranne                    |
| DEP : Diéthylphthalate                      | PCN : Polychloronaphtalène                         |
| DES : Diéthylstilbestrol                    | PCQ : Polychloroquaterphényle                      |
| Diad : Diadzéine                            | PEG : Polyéthylène glycol                          |
| DiBP : Di-iso-butylphthalate                | PM : Poids moléculaire                             |
| DiPP : Di-iso-propylphthalate               | PVDF : Polyvinylidène difluoride                   |
| DMP : Diméthylphthalate                     | RE : Récepteur des œstrogènes                      |
| DPP : Dipropylphthalate                     | RIA : Radioimmunoassay                             |
| E1 : Œstrone                                | RPMI 1640 : Roosevelt park memorial institute 1640 |
| E2 : Œstradiol                              | SBSE : Stir bar sorptive extraction                |
| E3 : Œstriol                                | SDS : Sodium dodécyl sulfate                       |
| EE2 : Ethinylœstradiol                      | Seq : Séquence                                     |
| ELISA : Enzyme linked immunoassay           | SPE : Solid phase extraction                       |
| ERE : Élément de réponse aux œstrogènes     | STEP: Station d'épuration                          |
| Form : Formonométine                        | SSA : Acide sulfosalicylique                       |
| FSH : Follicule stimulating hormone         | SVF: Serum de veau foetal                          |
| GEN : Génistéine                            | TBS : Tris buffer salin                            |
| GH : Growth Hormone                         | TTBS : Tris buffer salin + Tween 20                |
| GnRH : Gonadotropin releasing hormone       | TCB : Trichlorobiphényle                           |
| GtH I : Gondatophin hormone                 | TCDD : Tétrachlorodibenzodioxine                   |
| HAZ : Hypoxanthine, Azaserine               | TDE : Trichlorodiphényldichloroéthane              |
| HAT : Hypoxanthine, Aminoptérine, Thymidine | TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine       |
| HCH : Hexachlorocyclohexane                 | TPBS : Phosphate buffer salin + Tween 20           |
| HPLC : High performance liquid              | VTG : Vitellogénine                                |
| HSP: Heat shock protein                     | ZON : Zéaralénone                                  |
| Ig : Immunoglobuline                        |                                                    |
| LAT : Latex agglutination test              |                                                    |
| LC : Liquid chromatography                  |                                                    |

## *Listes des poissons*

| Nom français          | Nom anglais         | Nom latin                         |
|-----------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Anguille vivipare     | Eelpout             | <i>Zoarces viviparus</i>          |
| Anguille              | Eel                 | <i>Anguilla anguilla</i>          |
| Barbeau               | Barbel              | <i>Barbus barbus</i>              |
| Bar rayé              | Striped bass        | <i>Genus morone</i>               |
| Bar de mer            | Sea bass            | <i>Dicentrarchus labrax</i>       |
| Brème                 | Bream               | <i>Abramis brama</i>              |
| Brochet               | Pike                | <i>Esox lucius</i>                |
| Carpe                 | Carp                | <i>Cyprinus carpio</i>            |
| Carassin              | Crucian carp        | <i>Carassius carassius</i>        |
| Carrelet              | Wild flounder       | <i>Pleuronectes yokohamae</i>     |
| Chevesne              | Chub                | <i>Leusiscus cephalus</i>         |
| Choquemort            | Mummichog           | <i>Fundulus heteroclitus</i>      |
| Flet                  | Flounder            | <i>Platichthys flexus</i>         |
| Gag                   | Gag                 | <i>Mycteroperca microlepis</i>    |
| Gardon                | Roach               | <i>Rutilus rutilus</i>            |
| Gobie                 | Goby                | <i>Acanthogobius flavimanus</i>   |
| Grenadier de Roche    | Roundnose grenadier | <i>Coryphaenoides rupestris</i>   |
| Guppy                 | Guppy               | <i>Poecilia reticulata</i>        |
| Hoplostete rouge      | Orange roughy       | <i>Hoplostethus atlanticus</i>    |
| Hotu                  | Common nose         | <i>Chondrostoma nasus</i>         |
| Limande               | Dab                 | <i>Limanda limanda</i>            |
| Mafou                 | Cobia               | <i>Rachycentron pondicurum</i>    |
| Médaka                | Médaka              | <i>Oryzias latipes</i>            |
| Merlan                | Whiting             | <i>Merlangius merlangus</i>       |
| Omble de l'arctique   | Artic char          | <i>Salvelinus alpinus</i>         |
| Petote                | Sheepshead minnow   | <i>Cyprinodon variegatus</i>      |
| Perche                | Perch               | <i>Perca fluviatilis</i>          |
| Plie                  | Plaice              | <i>Hipoglossoïde platessoïde</i>  |
| Poisson plat          | Platfish            | <i>Xyphophorus maculus</i>        |
| Poisson tête de boule | Fathead minnow      | <i>Pimephales promelas</i>        |
| Poisson zèbre         | Zebrafish           | <i>Danio rerio</i>                |
| Rotengle              | Rudd                | <i>Scardinius erythrophtalmus</i> |
| Saumon atlantique     | Atlantic salmon     | <i>Salmo salar</i>                |
| Sole anglaise         | English sole        | <i>Pleuronectes vetulus</i>       |
| Tacaud                | Bib / Pout          | <i>Trisopterus luscus</i>         |
| Tilapia               | Tilapia             | <i>Sarotherodon melanotheron</i>  |
| Truite arc-en-ciel    | Rainbow trout       | <i>Oncorhynchus mykiss</i>        |
| Truite commune        | Brown trout         | <i>Salmo trutta</i>               |
| Vairon                | Minnow              | <i>Phoxinus phoxinus</i>          |
| Vandoise              | Dace                | <i>Leusiscus leusiscus</i>        |





# ***Introduction***



## ***Introduction***

Certains polluants, qualifiés d'œstrogènes mimétiques (ŒMs), sont rejetés dans les écosystèmes aquatiques par les stations d'épuration traitant des effluents domestiques, industriels, et/ou agricoles. En effet, les traitements d'épuration traditionnels ne permettent pas d'éliminer totalement ces polluants. Ces toxiques s'accumulent alors dans l'eau, dans les sédiments et finalement dans les poissons où ils induisent des pathologies. Les poissons sont les bioindicateurs les plus utilisés pour diagnostiquer ce type de pollution. Dans ce cas, le biomarqueur détecté est la synthèse anormale de vitellogénine (VTG) par les poissons mâles ou les jeunes immatures.

Le but de ce travail est de développer un test d'agglutination pour la détection *in situ* de la VTG. Le fonctionnement de ce type de test est basé sur l'interaction immunologique entre un anticorps (Acs), fixé sur des billes de latex, et l'antigène (la vitellogénine).

Dans le cadre de cette démarche, pour induire la production d'anticorps monoclonaux spécifiques de la VTG il est nécessaire, au préalable, de développer une nouvelle méthode de purification non dénaturante de cette protéine, permettant d'obtenir une solution pure et suffisamment concentrée.

De plus, dans l'objectif d'élargir l'utilisation de ce test à différentes espèces de poissons, une étude de la conservation phylogénétique des différentes molécules de VTG a été réalisée. Cette étude doit aboutir à la sélection d'un anticorps monoclonal reconnaissant un grand nombre de ces différentes molécules de VTG.

Enfin, il est intéressant de déterminer si la carpe, comme d'autres espèces, produit plusieurs molécules de VTG, et dans ce cas, si ces deux molécules sont synthétisées dans les mêmes conditions ou bien si leur production caractérise un état physiologique.

L'analyse bibliographique (Partie I) présente une liste non exhaustive des ŒMs les plus connus (sources et devenir dans l'environnement) ; leurs effets sur l'espèce humaine et sur les poissons ; les différentes méthodes existantes de dosage de la VTG ; et enfin, l'intérêt et les étapes de développement d'un test d'agglutination pour détecter sa production anormale, *in situ*.

Les résultats obtenus et leur discussion (Partie 3) s'articulent, au terme d'une présentation du matériel et des méthodes utilisées (Partie 2), selon 4 axes :

- la purification de la vitellogénine de carpe *Cyprinus carpio*,
- l'obtention et la production d'anticorps monoclonaux spécifiques d'un épitope commun à la vitellogénine de plusieurs espèces de poissons,
- le développement d'un test d'agglutination spécifique, rapide, simple d'utilisation, pour pouvoir être utilisé directement sur le terrain,
- l'application sur le terrain en utilisant les anticorps monoclonaux produits.

Les conclusions présentent la complexité du développement d'un test d'agglutination, et l'intérêt, de ce type de test, dans la compréhension des processus contrôlant la synthèse de la VTG.





# ***Partie I.***

## ***Analyse Bibliographique***

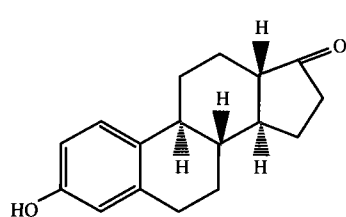




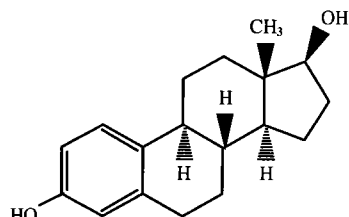
## ***I. A. Les œstrogènes mimétiques***

A l'heure actuelle, les écosystèmes aquatiques sont contaminés par différents types de molécules, naturelles ou anthropiques, responsables de transformations parfois irréversibles de la morphologie ou de la physiologie des organismes, qui vivent dans les milieux aquatiques ou en dépendent. Parmi ces molécules, certaines possèdent la capacité de mimer les effets des œstrogènes. Cette nouvelle famille de polluants, appelée œstrogènes mimétiques (ŒMs), regroupe un large éventail de substances d'origines et d'utilisations très diverses tels que des produits industriels, pharmaceutiques, phytosanitaires mais également des composés naturels produits par l'Homme, les animaux, les végétaux et les champignons.

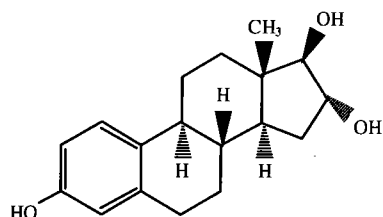
Ces substances sont chimiquement très différentes (Figure 1 et Annexe 1). En effet, alors que tous les composés d'origine biotique et leurs dérivés sont des stéroïdes apparentés aux œstrogènes, certains produits de synthèse sont également considérés comme des ŒMs : les polychlorobiphényles (PCBs) et leurs métabolites hydroxylés (les dioxines tels que les PCDDs et PCDFs), les alkylphénols, les phtalates, le bisphénol A (composé aromatique), mais également certains pesticides organochlorés (DDT et ses métabolites, endosulfane, toxaphène, HCH et la dieldrine) ainsi que des fongicides (comme la vinclozoline).



œstrone (E1)

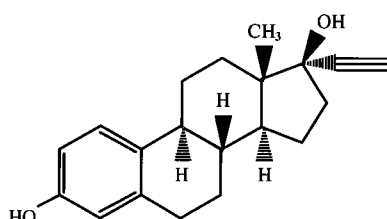


17β-œstradiol (E2)



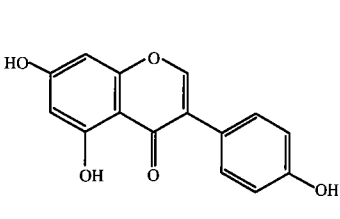
œstriol (E3)

### ŒSTROGENES HUMAINS ET ANIMAUX



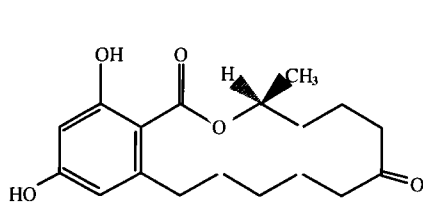
17α-éthinyloœstradiol (EE2)

### ŒSTROGENES DE SYNTHESE



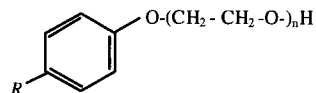
génistéine (GEN)

### PHYTŒSTROGENES

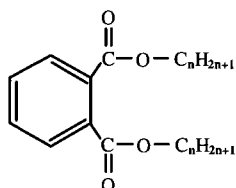


zéaralénone (ZON)

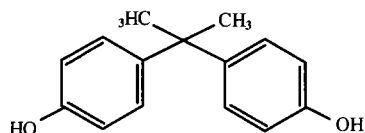
### MYCŒSTROGENES



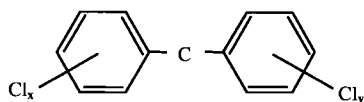
Alkylphénols polyéthoxylates



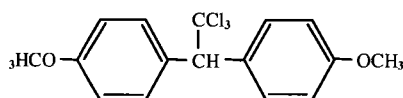
Phtalates (PAEs)



Bisphénol A (BPA)



PCBs



Endosulfan (ES)

### SUBSTANCES INDUSTRIELLES

**Figure 1 :** Exemples de différentes structures chimiques des œstrogènes mimétiques (une présentation exhaustive de ces molécules est répertoriée dans l'annexe 1).

## ***I. A. - 1. Les œstrogènes***

### ***I. A. - 1. 1. Les œstrogènes d'origine animale ou humaine***

#### ***I. A. - 1. 1. 1. Rôles***

Dans le règne animal, l'œstrone (E1), le 17 -œstradiol (E2) et l'œstriol (E3) sont des hormones stéroïdiennes secrétées, respectivement, par le cortex adrenal, les ovaires et le placenta. Ces trois œstrogènes sont majoritairement des hormones femelles indispensables au développement et au fonctionnement de leurs organes reproducteurs, ainsi qu'à la mise en place des caractères sexuels secondaires (seins...) (Vander *et al.*, 1995).

Les œstrogènes naturels peuvent être classés dans la catégorie des ŒMs car ils représentent une source exogène d'hormones pour le biotope.

#### ***I. A. - 1. 1. 2. Sources de pollution***

##### ***Source animale***

Les élevages intensifs d'animaux domestiques (ovins, bovins, porcins ou volailles) constituent la source d'œstrogènes animaux la plus importante. Dans le cas des bovins, le taux urinaire de E2 a été estimé à 13 ng/l (Erbe *et al.*, 1997, Ying *et al.*, 2002). Concernant les volailles, sa concentration dans les fumiers a été évaluée entre 14 et 533 ng/g de matière sèche (Shemesh et Shore, 1994, Shore *et al.*, 1995, Shore *et al.*, 1998, Ying *et al.*, 2002). Les fumiers issus de ces différents élevages sont, pour la majorité, épandus. La lixiviation des sols peut alors entraîner ces hormones dans les eaux de surface ou souterraine qu'elles polluent comme l'ont montré Shore *et al.* (1995) ainsi que Peterson *et al.* (2001). D'après ces études une concentration constante de E2 de 5 ng/l a été mesurée dans certaines eaux souterraines américaines, au printemps (Shore *et al.*, 1995, Peterson *et al.*, 2001, Ying *et al.*, 2002). Une partie de cette pollution peut également être conduite vers les stations d'épurations (STEPS) (Centner, 2004).

### Source humaine

Les hormones stéroïdiennes (E1, E2 et E3), sont aussi excrétées par l'Homme. Les quantités journalières d'hormones stéroïdiennes, excrétées dans les urines, varient entre 1 et 8 ng/l en fonction du type d'hormone, de l'âge et du sexe du sujet. Il reste, de plus, particulièrement élevé chez la femme enceinte (259 à 6000 ng/l en fonction de l'hormone) (Tableau 1).

Tableau 1 : Estimation de la quantité d'hormones stéroïdiennes (en µg/l) éliminée par voie urinaire chez l'espèce humaine (Johnson *et al.*, 2000).

| Population                          | Œstrone | Œstradiol | Œstriol |
|-------------------------------------|---------|-----------|---------|
| Femmes menstrualisées (15 à 59 ans) | 8       | 3,5       | 4,8     |
| Femmes ménopausées (> 59 ans)       | 4       | 2,3       | 1       |
| Femmes enceintes (derniers mois)    | 600     | 259       | 6000    |
| Hommes                              | 3,9     | 1,6       | 1,5     |

A partir de ces estimations, il a été possible de modéliser la quantité d'hormones urinaires d'origine humaine arrivant en station d'épuration (Johnson *et al.*, 2000). Cette modélisation a aboutit aux trois relations suivantes :

- $[E1] \text{ en ng/l} = P / 114,3 F$ ,
- $[E2] \text{ en ng/l} = P / 262,8 F$ ,
- $[E3] \text{ en ng/l} = P / 23,64 F$ ,

où P est le nombre d'habitants desservis par la station d'épuration et F est le débit entrant des effluents bruts en litres par jour (l/jour).

En comparant les résultats prédictifs obtenus avec ces trois relations et les concentrations mesurées dans différents effluents bruts domestiques (en terme de P et de F), il a été démontré que, dans la majorité des cas, les concentrations mesurées sont similaires aux taux prédictifs (Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Cargouët *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004). Cette concordance entre la modélisation et la mesure montre que les œstrogènes arrivant dans les STEPs sont majoritairement d'origine humaine et résultent de leur élimination par les urines. On peut aussi noter que les quantités excrétées *via* les selles sont très faibles par rapport à celles éliminées dans les urines (Johnson *et al.*, 2000).

Les résultats prédictifs peuvent aussi parfois surestimer la réalité : un pourcentage non négligeable de stéroïdes peut en effet, être adsorbé sur des particules en suspension (jusqu'à 20 %) qui sont éliminées par une étape de filtration préliminaire (Johnson *et al.*, 2000) ; une autre proportion des œstrogènes présents dans les effluents bruts resterait sous une forme conjuguée (Tilton *et al.*, 2002), contrairement à ce qui a été avancé par Belfroid *et al.*(1999), Larsson *et al.* (1999) et Ternes *et al.* (1999a) selon lesquels la totalité de ces molécules sont déconjuguées lors de leur transport dans les égouts vers les STEP. Une partie de ces oestrogènes pourrait également être métabolisée lors de ce même transport, comme l'E2 qui peut être oxydé en E1 (Laganà *et al.*, 2004) et l'E3 qui s'oxyde en E2 puis en E1. Ceci pourrait expliquer que dans certains effluents, ces deux hormones ne soient pas détectées (Johnson *et al.*, 2000).

En dernier lieu, certaines stations d'épuration traitent à la fois des effluents bruts d'origines domestiques et industrielles (Harries *et al.*, 1999, Cargouët *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a). Belfroid *et al.* (1999) montrent que les effluents bruts industriels peuvent également contenir des œstrogènes (E1 : <0,1-11 ng/l ; E2 : <0.4-1,8 ng/l et E3 : <0,4-1,8).

I. A. - 1. 1. 3. *Epuration des eaux usées*

Dans les stations d'épuration, ces œstrogènes peuvent être métabolisés, avec un rendement qui peut varier entre 45 % et 98 % pour l'E1, entre 33 % et 99,9 % pour l'E2 et entre 40 % et 97 % pour l'E3 (Tableau 2, Annexe 2, 3 et 4) (Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Cargouët *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004).

Tableau 2 : Niveaux de contamination en hormones stéroïdiennes (en ng/l) de divers effluents bruts et traités de STEP (84 STEP) et eaux de surface (150 sites de prélèvements), entre 1996 et 2002 (Routledge *et al.*, 1998, Belfroid *et al.*, 1999, Larsson *et al.*, 1999, Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Fawell *et al.*, 2001, Kashiwada *et al.*, 2002, Todorov *et al.*, 2002, Williams *et al.*, 2003, Cargouët *et al.*, 2004, Hemming *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a).

| Composés  | Effluent brut           | Effluent traité        | % d'élimination        | Eau de surface         |
|-----------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Œstrone   | <0,5 – 140 <sup>a</sup> | n.d. – 76 <sup>a</sup> | 44 – 98 <sup>b</sup>   | n.d. – 12 <sup>a</sup> |
| Œstradiol | n.d. – 48 <sup>a</sup>  | n.d. – 64 <sup>a</sup> | 33 – 99,9 <sup>b</sup> | n.d. – 27 <sup>a</sup> |
| Œstriol   | n.d. – 120 <sup>a</sup> | n.d. – 28 <sup>a</sup> | 40 - >97 <sup>b</sup>  | n.d. – 5 <sup>a</sup>  |

<sup>a</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée ; <sup>b</sup> valeur minimale estimée – valeur maximale estimée

Ce rendement d'épuration est variable, et peut être amélioré selon les processus d'épuration employés tels que l'utilisation de boues activées (Ternes *et al.*, 1999b). Dans ce cas, le rendement augmente avec le temps de rétention hydraulique (c'est à dire le temps de passage dans la STEP et donc le temps de contact des effluents avec les boues activées) (Johnson *et al.*, 2000). D'autres facteurs d'origine externe peuvent également influencer le rendement d'épuration de ces hormones, comme par exemple la température (qui favorise l'activité bactérienne et la dégradation chimique) et les précipitations (qui influent sur la durée de rétention hydraulique et sur l'adsorption organique) (Harries *et al.*, 1999, Ternes *et al.*, 1999a, Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Tilton *et al.*, 2002, Cargouët *et al.*, 2004, Hemming *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a).

Dans tous les cas, les rendements d'élimination de ces hormones n'étant pas de 100 %, elles sont présentes dans les effluents traités où elles peuvent encore atteindre des concentrations de 76 ng/l pour l'E1, 64 ng/l pour l'E2 et 28 ng/l pour l'E3 (Tableau 2 et Annexes 2, 3 et 4) (Routledge *et al.*, 1998, Belfroid *et al.*, 1999, Larsson *et al.*, 1999, Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Kashiwada *et al.*, 2002, Todorov *et al.*, 2002, Williams *et al.*, 2003, Cargouët *et al.*, 2004, Hemming *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a).

#### ***I. A. - 1. 1. 4. Situation dans l'environnement***

##### ***Milieu naturel***

Les effluents traités dans les STEPs sont déversés dans les fleuves, les rivières ou les estuaires. Cargouët *et al.* (2004) ont observé que les concentrations en hormones (E1, E2 et E3) présentes dans la Seine, en aval de 4 stations d'épuration (Evry, Valenton, Colombes et Achères) desservant Paris et ses environs, sont environ deux fois supérieures à celles mesurées en amont (Annexes 2, 3 et 4). De plus, leur concentration ne descend pas en dessous de 1,1 ng/l (Cargouët *et al.*, 2004).

Toutefois, en s'éloignant du point de rejet des STEPs, la dilution de l'effluent induit une diminution de la concentration en hormones. A cela s'ajoute l'adsorption de ces molécules sur les sédiments et/ou sur les particules en suspension dans l'eau, ainsi que leur biodégradation bactérienne (Williams *et al.*, 2003). Ces phénomènes expliquent que, dans certains cours d'eau et

à certains moments de l'année, ces oestrogènes puissent être indétectables (Ternes *et al.*, 1999b, Kashiwada *et al.*, 2002, Williams *et al.*, 2003).

### ***Eaux de consommation***

Dans la région parisienne, les deux points de prélèvement d'eau de consommation sont situés à Vigneux (sur la Seine entre les stations d'épuration d'Evry et de Valenton) et à Méry-sur-Oise (sur l'Oise). Ils présentent des concentrations en hormones E1, E2 et E3, respectivement, de 1,4, 1,7 et 2,2 ng/l, pour Vigneux et une concentration de 1,8 ng/l pour les trois molécules à Méry-sur-Oise (Cargouët *et al.*, 2004). Ces concentrations sont plus élevées que celles mesurées dans des eaux de consommation provenant du sud de l'Allemagne où les concentrations sont plutôt de l'ordre de 0,4 (E1), 0,7 (E2) et 0,3 ng/l (E3) (Kuch et Ballschmiter, 2001).

Or, les eaux de consommation subissent un certain nombre de traitements de potabilisation dont une étape de désinfection au chlore. D'après une étude réalisée sur l'E2, un traitement avec 1,5 mg/l de chlore pendant 36 heures suffirait à éliminer 27 µg/l de cette hormone (Lee *et al.*, 2004). Une autre étude fait également état de l'élimination totale des trois stéroïdes naturels par les différents processus de potabilisation de l'eau utilisés régulièrement en Angleterre comme l'ozonation, la coagulation et le traitement au charbon actif (Webb *et al.*, 2003).

Par conséquent dans le cas de l'œstrone, du 17 -œstradiol et de l'œstriol, la contamination de l'Homme *via* l'eau de boisson semble limitée. Une contamination éventuelle par l'alimentation des poissons contaminés par exemple, reste cependant envisageable.

### ***Absorption par les poissons***

Les hormones E1, E2, et E3 dissoutes dans l'eau ou adsorbées sur les particules en suspension ou dans les sédiments, peuvent pénétrer dans l'organisme des poissons, *via* l'alimentation et/ou la filtration de l'eau par les branchies. Les hormones peuvent alors s'accumuler dans les tissus avec un temps de persistance qui est fonction des espèces. Ainsi, des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées à un effluent traité contenant 5,8 ng/l de E1 et 1,1 ng/l de E2, élimineraient ces hormones seulement après 4 semaines d'exposition, une partie de ces hormones étant éliminée comme chez l'être humain, sous forme conjuguée

(Larsson *et al.*, 1999). La quantité accumulée et le temps de bioaccumulation de ces oestrogènes sont dépendants de la quantité de tissus adipeux. Par exemple, les larves de carrelets (*Pleuronectes yokohamae*) éliminent l'E2 une heure après avoir été replacées dans une eau propre. Quant aux jeunes immatures, ceux-ci ne commencent à éliminer l'E2 qu'après 24 h d'épuration (Specker et Chandlee, 2003).

## ***I. A. - 1. 2. L'œstrogène de synthèse : l'éthinylœstradiol***

### ***I. A. - 1. 2. 1. Rôles***

Le 17 -éthinylœstradiol (EE2) est un dérivé synthétique du 17 -œstradiol. Sa structure moléculaire a été élaborée pour la rendre plus stable de manière à augmenter sa demi-vie dans l'organisme humain (EE2 : 17 heures, E2 : 20 min) (Lai *et al.*, 2002). Cette hormone synthétique est le composant majeur de plusieurs pilules contraceptives et de divers traitements hormonaux de substitution pour la ménopause (Johnson *et al.*, 2000). D'autres hormones synthétiques, dérivés moins stables de l'EE2, sont également utilisés dans la fabrication d'autres pilules ou médicaments : le mestranol (ethinylœstradiol-3-méthyl éther), la norethisterone, l'acétate de norethisterone, la progestine et la lynestrenol (Larsson *et al.*, 1999).

### ***I. A. - 1. 2. 2. Source de pollution***

L'apport journalier en EE2 par la pilule contraceptive et les traitements hormonaux sont respectivement d'environ 35 µg et 27 µg par femme. En moyenne 26 % de l'EE2 absorbé sont excrétés dans les urines (Johnson *et al.*, 2000), sous une forme conjuguée (Ternes *et al.*, 1999a).

L'importance de la pollution par les hormones de synthèse varie d'un pays à l'autre, le pourcentage de femmes consommant des hormones de synthèse étant différent. Les quantités totales absorbées s'élèvent en Suisse à environ 3,5 mg/jour, parmi lesquelles 2,9 mg/jour sont éliminées (Larsson *et al.*, 1999). La consommation allemande s'élève à 137µg/jour (Ternes *et al.*, 1999a) alors qu'en Angleterre, seulement 13 % de la population féminine prend la pilule et 3 % suit un traitement hormonal de substitution (Johnson *et al.*, 2000). En France, le pourcentage de femmes prenant la pilule est plus élevé avec 21,6 % (Cargouët *et al.*, 2004).



De même que pour les oestrogènes naturels, un modèle de prédiction des quantités urinaires arrivant en STEP a pu être établi :

$$[EE2] \text{ en ng/l} = P / 1428 F$$

où P est le nombre d'habitants desservi par la STEP et F, le flux d'effluent brut arrivant à la STEP en l/jour. Ce modèle est calculé sur la base d'un taux moyen d'excrétion de l'EE2 égal à 26 %. Les résultats obtenus avec ce modèle indiquent cependant qu'il sous-estime la réalité (Johnson *et al.*, 2000, Williams *et al.*, 2003). Johnson *et al.* (2000) expliquent cette différence par une sous-estimation du pourcentage en EE2 réellement excrété qui peut être bien supérieur à 26 % puisqu'il peut atteindre une valeur maximale de 90 % (Johnson *et al.*, 2000). Par ailleurs, le modèle ne comptabilise pas les femmes utilisant des moyens de contraception ou des compléments hormonaux composés d'autres hormones de synthèses tels que le mestranol, la norethisterone, l'acétate de norethisterone, la progestine et la lynestrenol (Larsson *et al.*, 1999). Ces hormones sont rapidement métabolisées en EE2 soit avant d'être excrétées, soit au cours de leur transport dans les égouts. Elles seraient, de ce fait, responsable d'une partie du surplus de EE2 détecté dans les effluents bruts (Ternes *et al.*, 1999a).

### I. A. - 1. 2. 3. *Epuration des eaux usées*

L'EE2 arrive au niveau des STEP sous une forme déconjuguée lors de son transport avec les eaux usées (Ternes *et al.*, 1999a). Au Brésil, en Allemagne, en Italie et en France, la concentration en EE2 présente dans les effluents bruts étudiés varierait du non détectable (n.d.) à 10 ng/l (Tableau 3 et annexe 5) (Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Laganà *et al.*, 2004).

**Tableau 3 :** Concentration en EE2 (en ng/l) détectée dans divers effluents bruts et traités de STEP (63 STEP) et dans plusieurs eaux de surface (41 points de prélèvements), entre 1996 et 2002 (Routledge *et al.*, 1998, Belfroid *et al.*, 1999, Larsson *et al.*, 1999, Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Fawell *et al.*, 2001, Williams *et al.*, 2003, Cargouët *et al.*, 2004, Hemming *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a).

| Composé          | Effluent brut          | Effluent traité         | % d'élimination       | Eau de surface          |
|------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Ethinylœstradiol | n.d. – 10 <sup>a</sup> | n.d. – 500 <sup>a</sup> | 34 - >98 <sup>b</sup> | n.d. – 4,3 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée ; <sup>b</sup> valeur minimale estimée - valeur maximale estimée

L'absence de quantité de EE2 détectable dans certains effluents bruts domestiques pourraient être due au faible nombre de femmes prenant la pilule dans l'aire desservi par la STEP (Laganà *et al.*, 2004) et/ou à la dilution très rapide de l'EE2 (Cargouët *et al.*, 2004).

Les pourcentages de dégradation de l'EE2 par les processus d'épuration varient de 34 % à plus de 98 %. Par conséquent, comme pour les hormones naturelles, l'EE2 peut également être, en partie, éliminé par les processus d'épuration. Toutefois sa biodégradation par les microorganismes semble plus difficile. En effet, Ternes *et al.* (1999a) montrent que seulement 20 % de EE2 ont disparu après 24 heures passés en batch en contact avec des boues activées, alors que pour l'E2, plus de 95 % des molécules disparaissent après 1 à 3 heures (Ternes *et al.*, 1999a). Un rendement de 98 %, peut toutefois être atteint en augmentant les temps de rétention hydraulique à 26 heures et le temps de contact avec les boues à 20 jours (Johnson *et al.*, 2000). Cependant, dans la pratique, le temps passé, dans les STEPs, (temps de rétention hydraulique + temps de contact avec les boues) par les effluents bruts varie en moyenne entre 2 et 10 heures ce qui conduit à un rendement d'épuration de 53 % environ (Exemple des STEPs parisiennes) (Cargouët *et al.*, 2004).

D'après une autre étude, réalisée aux USA en 2000, des taux de 500 ng/l en EE2 ont été mesurés sur la période de mars-avril dans les effluents traités d'une STEP (Hemming *et al.*, 2004). Mais ce niveau de pollution semble exceptionnel et serait lié à l'augmentation de la population féminine étudiante. En général, les valeurs retrouvées dans la majorité des effluents traités sont comprises entre non détectable (n.d.) et 42 ng/ml (Annexe 5) (Routledge *et al.*, 1998, Belfroid *et al.*, 1999, Larsson *et al.*, 1999, Ternes *et al.*, 1999b, Johnson *et al.*, 2000, Williams *et al.*, 2003, Cargouët *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a).

## ***I. A. - 1. 2. 4. Situation dans l'environnement***

### ***Milieu naturel***

Comme les hormones naturelles, l'EE2 présent dans les effluents traités est une source de pollution locale au niveau du rejet des STEPs. Les résultats observés en France, le confirment puisque les quantités mesurées en aval des 4 stations d'épuration desservant la région parisienne, sont supérieures à celles mesurées en amont (Cargouët *et al.*, 2004). Les concentrations en EE2

diminuent, ensuite, au fur et à mesure de l'éloignement du rejet, du fait de la dilution des rejets, des dégradations chimique et biologique, et de l'adsorption sur les sédiments.

La demi-vie physico-chimique de l'EE2 dans les écosystèmes aquatiques est plus élevée que celle de l'E1 et de l'E2 (4 à 6 jours et 2 à 3 jours, respectivement). De plus, le coefficient de répartition de l'EE2 entre les sédiments et la colonne d'eau, est supérieur à celui des hormones naturelles. Selon les conditions de débit, il varie entre 34 et 98 %, alors que pour l'E1 et l'E2, il est compris, respectivement, entre 7-68 % et 12-78 % (Williams *et al.*, 1999). L'EE2 s'adsorbe donc plus facilement sur les sédiments, où il est plus stable (physico-chimiquement). Par conséquent, l'EE2 séjourne plus longtemps dans les eaux de surface (incluant les sédiments) que les hormones naturelles.

### ***Eaux de consommation***

L'EE2 peut également être retrouvé dans les sites de prélèvement d'eaux de boisson. Ainsi, dans la région parisienne, les deux sites de pompage de la Seine et de l'Oise, sont pollués par de l'EE2. Les concentrations retrouvées dans l'eau y sont équivalentes à celles des trois hormones naturelles (1,1 ng/l à Vigneux et 1,4 ng/l à Méry-sur-Oise) (Cargouët *et al.*, 2004).

L'espèce humaine pourrait donc être contaminée par de l'EE2 *via* l'eau de boisson. Cependant d'après Webb *et al.* (2003), les quantités absorbées, comprises entre <1 et 2 ng/jour, seraient négligeables par rapport à la production humaine endogène en stéroïdes, même chez les jeunes garçons pré-pubères dont la production minimale en œstradiol est de 6 µg/jour (Webb *et al.*, 2003). Comme pour les hormones naturelles, la pollution des eaux de surface par l'EE2 ne semble donc pas, pour l'instant, présenter de danger direct pour l'espèce humaine.

### ***Absorption par les poissons***

Par contre, la pollution des eaux de surface (eau et sédiment) par l'EE2, peut poser des problèmes *via* les espèces piscicoles. Tout d'abord, Lai *et al.* (2002) ont estimé que le facteur de bioaccumulation de l'EE2 chez les poissons varierait entre 170 et 332, ce qui est plus de 10 fois supérieur aux facteurs de bioaccumulation des hormones naturelles (E1 : 3,6-30, E2 : 5,8-61, E3 : 1,8-13) (Lai *et al.*, 2002). D'autre part, l'EE2 est très difficilement métabolisé par les

poissons comme le montre sa demi-vie qui est, en moyenne, de 3,54 jours (Lai *et al.*, 2002). Cette hormone devrait donc affecter les poissons sur de plus longues durées induisant un risque plus élevé de contamination de l'espèce humaine *via* la consommation de poissons par rapport à celui par les hormones naturelles.

### ***I. A. - 1. 3. Les phytoestrogènes et les mycoestrogènes***

#### ***I. A. - 1. 3. 1. Rôles***

Les phytoestrogènes et les mycoestrogènes sont des composés stéroïdiens, produits respectivement par les plantes et les champignons.

La famille des phytoestrogènes est constituée de quatre grands groupes de composés : les lignanes (le secoisolariciresinol et le matairesinol), les coumestrans (le coumestrol), les phytostérols (le  $\beta$ -sitostérol) et les flavonoïdes. Ces derniers sont eux-mêmes composés de trois sous-groupes : les isoflavones (la diadzéine et la génistéine), les flavones (le kaempferol) et les flavonones (la naringenine). Ces substances sont présentes dans diverses graines de céréales (seigle, blé...), fruits (pamplemousse, orange...), légumes (carottes, épinards, choux-fleurs, haricots, soja...), baies, noix et noisettes, etc. (Bennetau-Pelissero *et al.*, 1998, Mazur *et al.*, 1998, Safe et Gaido, 1998, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001, Hutabarat, 2001, Albertazzi et Purdie, 2002, Zhang *et al.*, 2002, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003, Grace *et al.*, 2003, Ososki et Kennelly, 2003, Laganà *et al.*, 2004). Leur fonction principale est d'agir comme anti-oxydants (Albertazzi et Purdie, 2002).

Quant aux mycoestrogènes, le plus connu est la zéaralénone. Ce composé est une toxine macrocyclique produite par de nombreuses espèces fongiques (*Fusarium* et *Aspergillus*) se développant sur les céréales (Ososki et Kennelly, 2003, Laganà *et al.*, 2004).

#### ***I. A. - 1. 3. 2. Sources de pollution***

##### ***Alimentation humaine***

Les deux sources alimentaires en phytoestrogènes, destinées à l'espèce humaine, sont les végétaux mais également les produits alimentaires enrichis en farines et/ou en protéines de soja,

comme certains desserts (yaourts, laits chocolatés, ou desserts à la vanille, etc), quelques fromages, sauces (de soja ou à la lécithine), ou encore certains laits en poudre pour bébé. La consommation des végétaux apporte principalement quatre phytoestrogènes : les deux isoflavones, la génistéine et la diadzéine, et les deux lignanes, le secoisolariciresinol et le matairesinol. Le coumestrol a également été retrouvé dans environ 50 % des légumes étudiés par Mazur *et al.* (1998), mais à des quantités beaucoup plus faibles. Quant à l'enrichissement des produits alimentaires en farines et/ou protéines en de soja, il serait responsable d'un apport supplémentaire en génistéine et en diadzéine (Hutabarat, 2001, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003) et dans une moindre mesure en lignanes (Mazur *et al.*, 1998).

Les quantités ingérées par l'espèce humaine vont donc essentiellement dépendre du régime alimentaire des populations concernées. Au Japon, pays où la consommation en soja est la plus importante, l'apport en isoflavone varierait entre 50 et 200 mg/jour (Albertazzi et Purdie, 2002). En France, les quantités d'isoflavones consommées s'élèveraient à environ 100 mg/jour pour un adulte omnivore, et entre 15,7 et 34,3 mg/jour pour un bébé âgé de 4 mois. Ces isoflavones seraient, dans ce cas là, plutôt apportées par des aliments enrichis en farines et/ou en protéines de soja (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Concernant les régimes végétariens, il semblerait, paradoxalement, qu'ils apportent moins d'isoflavones (taux plasmatique de 89 ng/ml) qu'une alimentation omnivore (144 ng/ml) ou à base de soja (233 ng/ml). Par ailleurs, les régimes alimentaires, de type omnivore, lactovégétarien et macrobiotique sont également une source de lignanes ; des taux urinaires en lignanes s'élevant à 23,9 nmol/jour, 4,64 nmol/jour et 2,32 nmol/jour, ont été mesurés chez des femmes suivant, respectivement, ces trois types de régimes. Le taux très élevé en lignane du régime macrobiotique est lié à une alimentation plus riche en germes de soja, en haricots verts ou en choux de Bruxelles. (Mazur *et al.*, 1998).

D'autre part, de plus en plus de compléments alimentaires prescrits aux femmes ménopausées, contiennent des phytoestrogènes, comme la génistéine et la diadzéine, pour pallier à leur déficit hormonal. Ces aliments spécifiques apporteraient entre 2,4 et 98,2 mg/jour d'isoflavones (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003).

Les isoflavones ingérées subissent alors plusieurs transformations. Les isoflavones inactivées (forme glycosilée pour la génistéine et la diadzéine) (Grace *et al.*, 2003), peuvent être activées par clivage du groupement glycosile (Albertazzi et Purdie, 2002). Dans le foie, elles

subissent une conjugaison avec des groupements  $\beta$ -glucuronides ou sulfates. Ces conjugués sont ensuite éliminés, *via* les urines. Quant aux deux lignanes (matairesinol et secoisolariciresinol) et au mycœstrogène (zéaralénone), leur métabolisation par la flore intestinale aboutit respectivement à la production d'entérolactone, d'entérodiol, et de  $\alpha$ -zéaralénol et de  $\beta$ -zéaralénol. Ces substances sont par la suite également excrétées après conjugaison *via* les urines (Mazur *et al.*, 1998, Albertazzi et Purdie, 2002, Laganà *et al.*, 2004). Ces produits de métabolisation sont alors véhiculés jusqu'aux stations d'épuration pour être, théoriquement, dégradés.

### ***Alimentation animale***

L'alimentation traditionnelle des animaux d'élevage, est la première source de phytoestrogènes et de mycœstrogènes (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Dans quelques cas, leurs apports sont augmentés pour pallier à des carences ou pour bénéficier de certains avantages apportés par ces suppléments alimentaires. Par exemple, en pisciculture, le rendement de croissance des poissons est amélioré par une alimentation enrichie en protéines de soja (Bennetau-Pelissero *et al.*, 1998, Latonnelle *et al.*, 2002b, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Dans les élevages de bovins, la zéaralénone a également longtemps été utilisée comme promoteur de croissance et réducteur de stress, ceci jusqu'à son interdiction par l'Union Européenne en 1985 (Laganà *et al.*, 2004).

Les mycœstrogènes et les phytoestrogènes ingérés par les animaux, sont par la suite éliminés de l'organisme *via* les urines. Ils passent alors dans les sols suite à l'épandage des fumiers puis, après lixiviation, dans les eaux de surface.

### ***Sources industrielles***

Une autre source de pollution par les hormones végétales et fongiques est industrielle. Il a, par exemple, été démontré que les effluents des usines de production des huiles végétales sont riches en phytostérols, comme le  $\beta$ -sitostérol (Dias *et al.*, 2002). Une autre étude réalisée par Jackson *et al.* (2002), a également dévoilé qu'entre 4 et 31 % des isoflavones, utilisées dans la préparation de produits alimentaires à base de soja, sont également éliminés dans les effluents industriels. Ces isoflavones sont perdues au cours des différents processus de préparation

(chauffage, broyage, etc.) (Jackson *et al.*, 2002). L'étude de Dias *et al.* (2002), indique également que le  $\beta$ -sitostérol est présent dans les effluents d'autres industries non alimentaires comme les industries productrices de papiers et certaines industries pharmaceutiques (le  $\beta$ -sitostérol de soja peut être utilisé pour produire des corticostéroïdes) (Dias *et al.*, 2002).

Ces effluents industriels sont ensuite, comme les effluents domestiques, véhiculés jusqu'à des STEPS spécifiques ou des STEPS mixtes, c'est-à-dire traitant à la fois les deux types d'effluents (Pawlowski *et al.*, 2004a).

**I. A. - 1. 3. 3. Epuration des eaux usées**

Les dosages réalisés sur des effluents bruts domestiques arrivant en STEPs, montrent la présence de phytoestrogènes et de mycoestrogènes (Tableau 4, annexe 6) (Tilton *et al.*, 2002, Laganà *et al.*, 2004). Les traitements subis en station d'épuration induisent une métabolisation des phytoestrogènes avec un rendement d'épuration qui varie environ entre 73 et 88 % (Laganà *et al.*, 2004). Selon les auteurs de cette étude, les phytoestrogènes présents dans ces effluents, proviendraient des lavages des feuilles des végétaux au cours des phases d'irrigation ou de précipitations abondantes. Par ailleurs, d'autres études ont démontré qu'une partie des phytoestrogènes ingérés par l'homme étaient éliminés *via* les urines. Par exemple, en Angleterre, des doses en génistéine, en diadzéine, en entérolactone et en entérodiol variant de 0 à 784, de 0 à 1332, de 0 à 63640 et de 0 à 2850 ng/ml ont été mesurées sur un échantillon de 234 urines (Grace *et al.*, 2003).

Tableau 4 : Concentrations en phyto- et en mycoestrogènes (ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEPs (3 STEPs) et dans diverses eaux de surface (2 points de prélèvements) (2001-2002) (Tilton *et al.*, 2002, Laganà *et al.*, 2004).

| Composés       | Effluent brut          | Effluent traité     | % d'élimination      | Eau de surface           |
|----------------|------------------------|---------------------|----------------------|--------------------------|
| Phytoestrogène | 8 – 384 <sup>a</sup>   | 3 – 90 <sup>a</sup> | 73 – 88 <sup>b</sup> | 1 - <50 <sup>a</sup>     |
| Mycoestrogène  | n.d. – 18 <sup>a</sup> | 3 – 30 <sup>a</sup> | 30 – 53 <sup>b</sup> | n.d. – < 10 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée ; <sup>b</sup> valeur minimale estimée – valeur maximale estimée

Concernant la métabolisation des mycoestrogènes, elle semble difficile. En effet, un rendement de seulement 53 % peut être obtenu pour la zéaralénone et un rendement variant respectivement entre 30 et 38 % pour ses deux métabolites, l' -zéaralénol et le -zéaralénol,

(Laganà *et al.*, 2004). Pour les auteurs de cette étude, l'origine des mycœstrogènes dans les effluents bruts analysés, serait animale et proviendrait de leur utilisation en tant que promoteur de croissance (Laganà *et al.*, 2004) bien que ces mêmes auteurs précisent que leur utilisation a été interdite en Europe depuis 1985 et que les mesures présentées ont été réalisées en 2001 (Laganà *et al.*, 2004). Une autre étude, réalisée en Allemagne, fait également état de la présence d' -zéaralénol dans les effluents de deux STEPS, traitant à la fois des effluents industriels et domestiques, avec des concentrations comprises entre 20 et 30 ng/l (Pawlowski *et al.*, 2004a).

### ***I. A. - 1. 3. 4. Situation dans l'environnement***

#### ***Milieu naturel***

Plus de 20 % environ des phytoestrogènes et des mycœstrogènes sont déversés dans les écosystèmes aquatiques, soit jusqu'à 83 ng/l de génistéine, 16 ng/l de diadzéine, 90 ng/l de -sitostérol, 10 ng/l de zéaralénone, 30 ng/l de -zéaralénol et 5 ng/l d' -zéaralénol (Annexe 5). Dans les eaux de surface, leur concentration tend à diminuer (Laganà *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a), sûrement du fait des phénomènes de dilution, de biodégradation, de dégradation physico-chimique ou d'adsorption sur les sédiments.

#### ***Absorption par les poissons***

Depuis plusieurs années, le soja est utilisé en pisciculture comme complément alimentaire (Bennetau-Pelissero *et al.*, 1998, Latonnelle *et al.*, 2002b, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). A ce jour, aucune étude n'a montré que les phytoestrogènes, présents dans le soja, sont bioaccumulés dans les tissus des animaux. Cependant, l'apparition de perturbations morphologiques chez des animaux consommant, régulièrement, des phytoestrogènes, laissent supposer qu'ils les bioaccumulent (Bennetau-Pelissero *et al.*, 1998, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001, Latonnelle *et al.*, 2002b, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). En effet, le développement de ces anomalies implique que le toxique perdure dans l'organisme.



## ***I. A. - 2. Les molécules d'origine industrielle***

### ***I. A. - 2. 1. Les alkylphénols***

#### ***I. A. - 2, 1. 1. Rôles***

Les alkylphénols polyéthoxylates (ApnEOs) et leurs monomères, les alkylphénols (les nonylphénols et les octylphénols) sont des substances anthropiques, très largement utilisées, dans divers secteurs industriels, depuis plus de quarante ans, comme par exemple (Bennie, 1999, Heemken *et al.*, 2001) :

- Les surfactants non-ioniques pour le prétraitement de la laine,
- Les agents mouillants et assouplissants dans la production de cuir et de papier,
- Les agents nettoyants dans les industries du métal,
- Les agents émulsifiants pour les pesticides et les peintures,
- Les agents dispersants de certaines pulvérisations,
- Les agents plastifiants dans la production de plastique en PVC (Polychlorure de vinyle).

Depuis les années 1980, leur utilisation n'a fait que s'accroître. En 1989, les productions canadienne et américaine avaient atteint, respectivement, un seuil annuel de 5500 tonnes de nonylphénols et de 180000 tonnes d'alkylphénols (Blackburn et Waldock, 1995, Maguire, 1999). Quant à la consommation anglaise en nonylphénols, jusqu'en 1990, elle s'étalait entre 16000 et 19000 tonnes par an, parmi lesquelles 6500 tonnes auraient été déversées dans l'environnement aquatique (Bennie, 1999). En Allemagne, en 1995, la consommation en alkylphénols s'élevait à 20000 tonnes, dont 14000 tonnes étaient des nonylphénols, et les 6000 tonnes restantes étaient composées entre autre d'octylphénols et de butylphénols. Dans ce pays, la majorité de la production des nonylphénols (11500 tonnes) était utilisée pour produire des alkylphénols polyéthoxylates, avec 1 à 40 unités éthoxylate (Heemken *et al.*, 2001).

#### ***I. A. - 2. 1. 2. Epuration des eaux usées***

Pendant les processus de fabrication de différents produits industriels, les alkylphénols polyéthoxylates et/ou les alkylphénols non utilisés sont éliminés dans les effluents bruts

industriels. Par ailleurs, une quantité non négligeable de ces mêmes composés serait éliminé dans les effluents domestiques. Ces derniers proviendraient de l'évacuation de plusieurs produits ménagers dans les égouts (Laganà *et al.*, 2004). Ces deux types d'effluents seraient alors véhiculés par les eaux usées jusqu'aux STEPs pour être traités.

Les concentrations présentes dans les effluents bruts peuvent atteindre des taux de 320 ng/l en 4-*tert*-octylphénol (4-OP) et 8768 ng/l en 4-nonylphénol (4-NP) (Blackburn et Waldock, 1995, Larsson *et al.*, 1999, Körner *et al.*, 2000, Bolz *et al.*, 2001, Heemken *et al.*, 2001, Inoue *et al.*, 2002, Kashiwada *et al.*, 2002, Todorov *et al.*, 2002, Hemming *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004). Les taux d'épuration du 4-NP varient entre 40 et 85 % (Körner *et al.*, 2000, Laganà *et al.*, 2004). Quant au 4-OP, son rendement d'épuration est au mieux de 13 %, et, dans certains cas, les concentrations retrouvées après traitement peuvent être supérieures à celles des effluents bruts (Körner *et al.*, 2000) (Tableau 5, annexe 7).

Tableau 5 : Contamination par les alkylphénols (ng/l) de différents effluents bruts et traités de STEPs (37 STEPs) et de diverses eaux de surface (155 points de prélèvements), entre 1994 et 2002 (Blackburn et Waldock, 1995, Larsson *et al.*, 1999, Körner *et al.*, 2000, Bolz *et al.*, 2001, Heemken *et al.*, 2001, Inoue *et al.*, 2002, Kashiwada *et al.*, 2002, Todorov *et al.*, 2002, Hemming *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004).

| Composés            | Effluent brut            | Effluent traité             | % d'élimination      | Eau de surface            |
|---------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------|
| Σ NPs               | -                        | <200 – 330000 <sup>a</sup>  | -                    | <30 – 180000 <sup>a</sup> |
| 4-NP                | 2130 – 8768 <sup>a</sup> | 320 – 22800 <sup>a</sup>    | 40 – 85 <sup>b</sup> | n.d. – 1466 <sup>a</sup>  |
| Σ NPnEO (n = 1 à 2) | -                        | 83100 – 429000 <sup>a</sup> | -                    | 0,8 – 289 <sup>a</sup>    |
| 4-OP                | 180 – 320 <sup>a</sup>   | 280 – 357 <sup>a</sup>      | < 13 <sup>b</sup>    | n.d. – 189 <sup>a</sup>   |
| Σ OPnEO (n = 1 à 2) | -                        | -                           | -                    | 0,4 – 84 <sup>a</sup>     |

<sup>a</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée ; <sup>b</sup> valeur minimale estimée – valeur maximale estimée

Ceci peut être expliqué par la métabolisation bactérienne des alkylphénols polyéthoxylates présents dans les effluents bruts qui proviennent des industries métalliques, agro-alimentaires, pharmaceutiques et de production de résines plastiques, desservis par les STEPs concernées (Körner *et al.*, 2000). En effet, la métabolisation de ces molécules complexes entraîne la production d'alkylphénols (OPs et/ou NPs) (Figure 2).

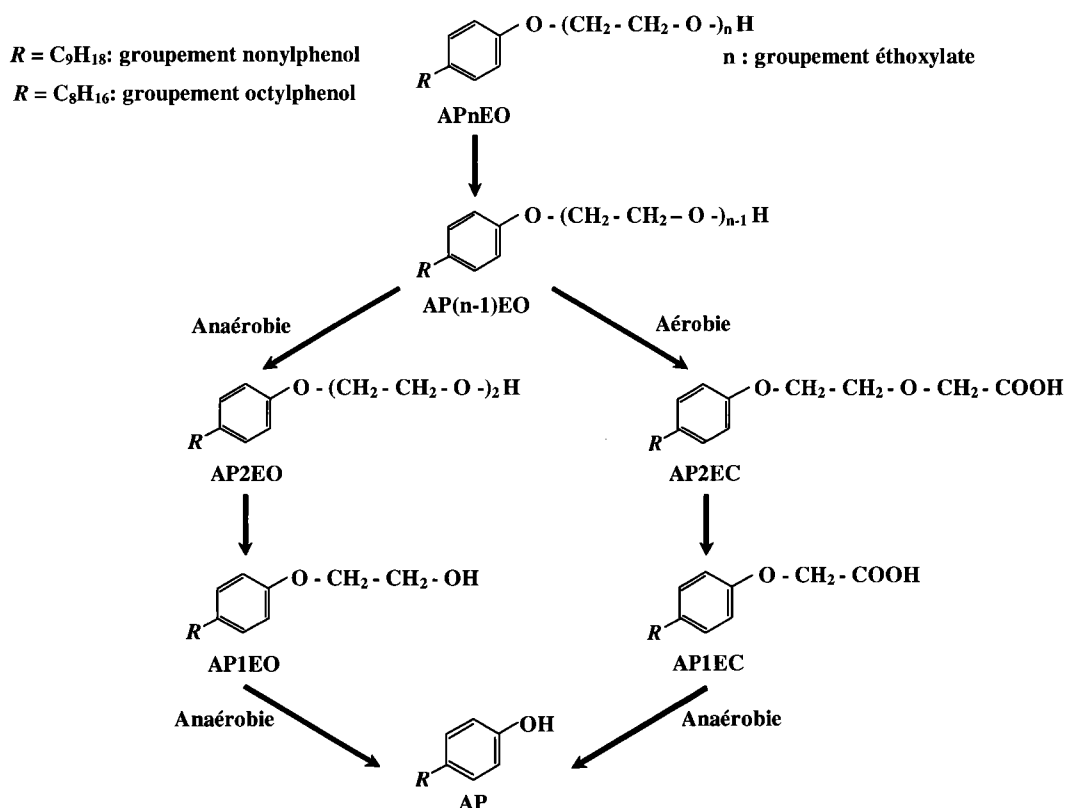


Figure 2 : Biodégradation des alkylphénols polyéthoxylates (APnEO) (Bennie, 1999, Maguire, 1999).

Les quantités importantes de 4-OP (ou de 4-NP) nouvellement formées peuvent alors masquer la biodégradation des OPs et des NPs présents dans les effluents bruts. Ceci pourrait expliquer que, dans les effluents traités de trois STEPs américaines, des molécules de nonylphénol mono- et diéthoxylates (NP2EO, NP1EO) sont également détectées à des concentrations cumulées comprises entre 83100 et 429000 ng/ml (Tableau 5, annexe 7) (Todorov *et al.*, 2002).

Quelques études font également état de l'accumulation des alkylphénols dans les boues activées (Körner *et al.*, 2000, Bolz *et al.*, 2001). Körner *et al.* (2000) ont ainsi mesuré une concentration en 4-NP égale à 30000 µg/kg de matière sèche. Par contre, dans l'étude de Bolz *et al.* (2001), les concentrations en 4-NP détectées sont plus faibles et varient entre 2500 et 3700 µg/kg de matière sèche. Ces alkylphénols lorsqu'ils sont épandus avec les boues, peuvent alors polluer les sols, puis les eaux souterraines et de surface.

### ***I. A. - 2. 1. 3. Situation dans l'environnement***

#### ***Milieu naturel***

La pollution des eaux de surface par les alkylphénols mono ou diéthoxylates et par les alkylphénols, est essentiellement due au déversement des effluents traités provenant des STEP (Bolz *et al.*, 2001). Quand ces polluants se retrouvent dans l'eau, ils se partagent entre la colonne d'eau et les sédiments. Ainsi, dans les rivières anglaises Aire et Calder, il a été estimé que 30 à 40 % des octylphénols peuvent s'adsorber sur le sédiment en suspension (Johnson *et al.*, 1998). De même, dans plusieurs fleuves et rivières d'Allemagne, des concentrations en alkylphénols et alkylphénols mono ou diéthoxylates, adsorbées sur les sédiments, comprises respectivement entre 17-1378 µg/kg et 30-1797 µg/kg de matière sèche ont été mesurées (Bolz *et al.*, 2001, Heemken *et al.*, 2001).

Les concentrations solubles mesurées dans les fleuves et les rivières varieraient, entre non détectable (n.d.) et 1466 ng/l et n.d. et 189 ng/l, pour le 4-NP et le 4-OP, respectivement (Tableau 5, annexe 7). Mais d'après l'étude de Blackburn *et al.* (1995), ces quantités ne correspondent qu'à la partie immergée de l'iceberg. En effet, dans cette étude, des taux de 180000 ng/l en NPs, tous isomères confondus, solubles et adsorbés sur des particules en suspension, ont pu être mesurés (Blackburn et Waldock, 1995).

Ces pollutions de l'eau et des sédiments seraient responsables de la pollution de plusieurs estuaires. Ainsi, en Allemagne, l'estuaire du fleuve Elbe et une partie de la côte de la mer du Nord où se déverse ce fleuve, sont pollués par du 4-OP (16 ng/l), du 4-NP (63 ng/l), et des alkylphénols mono ou diéthoxylates (63 et 21 ng/l). Sept estuaires anglais présentent également une pollution par des NPs (solubles ou adsorbés) avec des concentrations pouvant atteindre 320 ng/ml (Blackburn et Waldock, 1995). Ceci est possible car la demi-vie des alkylphénols dans les écosystèmes aquatiques est très longue : environ 10 jours pour les octylphénols (Johnson *et al.*, 1998).

### ***Eaux de consommation***

Concernant les eaux de boisson, une étude effectuée sur 4 eaux minérales japonaises, a démontré la présence de 4-NP et de 4-OP dans trois d'entre-elles, à des concentrations moyennes de 40 ng/l et 50 ng/l, respectivement (Inoue *et al.*, 2002). Or, d'après Lee *et al.* (2004), un traitement au chlore, comme celui effectué pendant les processus de potabilisation de l'eau, suffirait à éliminer 220 µg/l de 4-NP (Lee *et al.*, 2004). Les rivières japonaises contenant 1000 fois moins de 4-NP (Kashiwada *et al.*, 2002), les eaux de boissons n'auraient, théoriquement, pas dû être contaminées. Ce paradoxe peut provoquer une certaine inquiétude vis-à-vis de pays tels que l'Angleterre, l'Allemagne et l'Italie, où les concentrations en 4-NP dans les eaux de surface peuvent être plus élevées que celles mesurées au Japon (Annexe 7) (Blackburn et Waldock, 1995, Bolz *et al.*, 2001, Laganà *et al.*, 2004).

### ***Absorption par les poissons***

Les alkylphénols présents dans les eaux de surface, sous forme soluble ou adsorbée sur les sédiments, peuvent être ingérés par les poissons. Une partie de ces toxiques va alors s'accumuler dans les tissus. Ainsi, des poissons exposés à 5,36 µg/l de 4-NP, pendant 28 à 31 jours, concentrent dans leurs tissus, environ 3,8 µg/g de cette molécule ce qui correspond à un facteur de bioconcentration (BCF) de 550 (Villeneuve *et al.*, 2002). Cette concentration est supérieure à celle des hormones stéroïdiennes, E1 (3,6-30), E2, (5,8-61) et E3 (1,8-13), et également à celle de l'hormone de synthèse EE2 (170-332) (Lai *et al.*, 2002).

Les alkylphénols s'accumulent principalement dans les muscles et le foie. Pedersen *et al.* (2003) montrent ainsi que 0,33 mg et 0,14 mg de OPs peuvent se fixer respectivement dans les muscles et le foie de truites arc-en-ciel, considérant que les muscles représentent environ 67 % de la masse totale des animaux contre 3 % pour le foie, le facteur de bioconcentration du foie semble supérieur à celui des muscles. Cependant, les quantités bioaccumulées sont très faibles par rapport aux quantités ingérées, à savoir 150 mg. Une grande proportion des OPs ingérés est donc éliminée *via* les selles ou les urines. Ces toxiques peuvent alors être à nouveau libérés dans les eaux : 16 % de la quantité ingérée par les poissons a en effet été retrouvée dans l'eau (Pedersen *et al.*, 2003).

## ***I. A. - 2. 2. Le bisphénol A***

### ***I. A. - 2. 2. 1. Sources de pollution***

#### ***Sources industrielles***

Le bisphénol A (BPA) est un composé aromatique bicyclique qui entre dans la production des polycarbonates, des résines époxy et résines polyester styrène. Ces polymères et ces résines sont utilisés dans la fabrication d'amalgames dentaires, de vernis pour le traitement de surface des boîtes de conserve et comme agents retardant des produits inflammables ou explosifs (Safe et Gaido, 1998, Lindholst *et al.*, 2000, Laganà *et al.*, 2004). En 1993, la production annuelle mondiale en BPA, était de 640000 tonnes parmi lesquelles, environ 109 tonnes furent déversées dans l'environnement :  $3,5 \times 10^{-5}$  % dans l'air, 24 % dans les sols et 75 % dans l'eau (43 % dans la colonne d'eau et 32 % dans le sédiment) (Lindholst *et al.*, 2000). Cette production ne cessa d'augmenter par la suite. En 1995, l'Allemagne produisait déjà à elle seule, 210000 tonnes et quant à l'union européenne, elle était responsable de 30 % de la production mondiale (Fromme *et al.*, 2002). La contamination de l'environnement se fait pendant les processus de fabrication industrielle, mais le BPA peut également être libéré par le produit fini (Fromme *et al.*, 2002).

#### ***Source humaine***

Le BPA présent dans les résines ou les amalgames utilisés en odontologie peut être libéré dans la salive. Il est alors absorbé au niveau des intestins et passe dans le sang. Après une étape de conjugaison avec l'acide glucuronique dans le foie, le BPA est, finalement, rejeté dans les urines à des concentrations comprises entre 220 à 450 pg/ml (Kawaguchi *et al.*, 2004).

### ***I. A. - 2. 2. 2. Epuration des eaux usées***

Le BPA excrété par l'organisme humain (essentiellement le BPA d'origine industrielle) est évacué vers les STEP s où il est métabolisé. Les quantités arrivant dans ces STEP s dépendent de l'origine du BPA. Ainsi, lorsque les STEP s reçoivent uniquement des effluents bruts d'origine domestique, la charge en BPA est beaucoup moins élevée que si les STEP s reçoivent

simultanément des effluents industriels. Ceci explique la différence de concentration en BPA observée entre les STEPs mixtes allemandes (542-3010 ng/l, 40 % industrielle) et domestiques italiennes (332-339 ng/l), étudiées respectivement par Körner *et al.* (2000) et Laganà *et al.* (2004) (Annexe 8).

**Tableau 6 :** Contamination par le bisphénol A (ng/l) de différents effluents bruts et traités de STEPs (59 STEPs) et de diverses eaux de surface (260 points de prélèvements), entre 1997 et 2003 (Larsson *et al.*, 1999, Körner *et al.*, 2000, Bolz *et al.*, 2001, Heemken *et al.*, 2001, Fromme *et al.*, 2002, Kashiwada *et al.*, 2002, Hemming *et al.*, 2004, Kawaguchi *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004).

| Composé | Effluent brut           | Effluent traité         | % d'élimination      | Eau de surface          |
|---------|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| BPA     | 332 – 3010 <sup>a</sup> | n.d. – 702 <sup>a</sup> | 85 – 91 <sup>b</sup> | n.d. – 410 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée ; <sup>b</sup> valeur minimale estimée – valeur maximale estimée

Les rendements d'épuration du BPA peuvent atteindre un maximum de 91 % (Tableau 6) (Körner *et al.*, 2000, Laganà *et al.*, 2004). Ces rendements résultent d'une métabolisation du BPA (Körner *et al.*, 2000), et/ou du piégeage de celui-ci par les boues activées (Bolz *et al.*, 2001, Fromme *et al.*, 2002). Boltz *et al.* (2001) et Fromme *et al.* (2002) ont mesuré des taux de BPA, piégés dans les boues activées de plusieurs STEPs, variant entre n.d. et 3675 µg/kg et 4 et 1363 µg/kg (de matière sèche), respectivement. L'adsorption du BPA dans les boues activées est due à son caractère lipophile (log K<sub>ow</sub>=3,4) qui est inférieur à celui des nonylphénols (log K<sub>ow</sub> > 4). Par conséquent, la différence d'épuration entre le BPA et les NPs (85-91 %, et 40-85 %), observée par Bolz *et al.* (2001) et Laganà *et al.* (2004), ne semble pas due à une plus grande adsorption du BPA dans les boues mais au contraire à une meilleure biodégradation du BPA par rapport aux NPs.

### I. A. - 2. 2. 3. Situation dans l'environnement

#### Milieu naturel

Plusieurs études, réalisées dans différents pays, montrent que la pollution des eaux de surface par le BPA est très largement répandue (Tableau 6). Ainsi, sur 261 prélèvements réalisés en automne 1998 sur 109 fleuves et rivières du Japon, 109 étaient contaminés par du BPA (Kashiwada *et al.*, 2002) alors que seulement 52 étaient contaminés par des NPs. Par contre, la pollution au BPA est beaucoup moins répandue que la pollution par les hormones stéroïdiennes

(222/256). D'autres part, en terme de concentration retrouvée, le niveau de contamination des eaux de surface au BPA (58 ng/l) est supérieur à celui des hormones (1,8 ng/l) et inférieur à celui des NPs (150 ng/l) (Kashiwada *et al.*, 2002). Cette différence entre le BPA et les NPs semble être assez générale puisqu'elle a également été observée dans une autre étude, réalisée en Allemagne (Bolz *et al.*, 2001). Enfin, le BPA possédant un plus faible pouvoir lipophile que les NPs, les quantités adsorbées sur le sédiment sont beaucoup plus faibles (taux maximum de 190 µg/kg pour le BPA et 259 µg/kg de matière sèche pour les NPs) (Bolz *et al.*, 2001, Fromme *et al.*, 2002)

Les demi-vies, chimique ou microbiologique, assez longue du BPA (respectivement 28 jours et 2,5–4 jours) facilitent sa dispersion dans les eaux de surface, ce qui explique, par exemple, la contamination de la mer du nord, à l'embouchure du Fleuve allemand Elbe, qui peut atteindre des taux de 20 ng/l, alors que celui-ci ne reçoit aucune pollution directe par des rejets de STEPs (Annexe 7) (Heemken *et al.*, 2001).

### ***Eaux de consommation***

Une étude réalisée en laboratoire sur l'effet des traitements au chlore, comme ceux effectués pendant les processus de potabilisation de l'eau, semble indiquer qu'un traitement de 10 min suffirait à éliminer une concentration d'environ 2,282 mg/l de BPA (Lee *et al.*, 2004). Cette concentration étant plus d'un million de fois supérieure à celle détectée dans les eaux de surface actuellement étudiées (Tableau 6), la contamination de l'Homme par l'eau de boisson semble impossible. Pourtant, au Japon, du BPA a été détecté dans des eaux de boisson à des concentrations de 80 ng/l (Inoue *et al.*, 2002). Les traitements de potabilisation à grande échelle pourraient donc être peu efficaces.

### ***Absorption par les poissons***

Le bisphénol A, présent dans l'eau ou bien adsorbé sur les sédiments, peut être ingéré par les poissons. Dans leur organisme, comme chez l'Homme, il est absorbé au niveau intestinal puis passe dans le sang. Sa demi-vie a alors été estimée à 3,75 h. Ensuite, le BPA peut être véhiculé jusqu'au foie où il peut subir une conjugaison avec de l'acide glucuronique (Larsson *et al.*, 1999,



Lindholst *et al.*, 2000, Lindholst *et al.*, 2001) avant d'être à nouveau libéré dans le sang (2 à 6 h après l'exposition) (Lindholst *et al.*, 2001). Il peut aussi se bioaccumuler. Ainsi, des animaux exposés à des concentrations variant entre 10 et 500 µg/l de BPA, bioaccumulent jusqu'à 4,36 µg/g (de poisson) de cette substance (Lindholst *et al.*, 2000).

Le BPA peut également être véhiculé vers les muscles où il peut aussi se bioaccumuler bien qu'à des concentrations plus faibles (0,83 µg/g de poisson) (Lindholst *et al.*, 2000). En fait, il semblerait que la bioaccumulation dans les muscles n'intervienne qu'après la saturation du foie. De plus, le BPA stocké dans les muscles ne serait pas biodisponible, seul le BPA présent dans le foie induirait alors des effets œstrogéniques (Lindholst *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les facteurs de bioconcentration (BCF) du BPA dans le foie et les muscles de diverses espèces de poissons (8,7-38,4 et 1,7-3,6, respectivement) (Lindholst *et al.*, 2000) sont du même ordre de grandeur que ceux évalués pour les hormones stéroïdiennes E1 (3,6-30), E2, (5,8-61) et E3 (1,8-13) et très inférieurs à ceux trouvés pour le 4-NP (550) (Villeneuve *et al.*, 2002) et l'hormone de synthèse EE2 (170-332) (Lai *et al.*, 2002).

## ***I. A. - 2. 3. Les phtalates***

### ***I. A. - 2. 3. 1. Sources de pollution***

#### ***Sources industrielles***

Les esters de phtalates (PAEs) sont des composés anthropiques utilisés dans la production de différentes matières premières telles que les résines de polychlorure de vinyle (PVC), de polyacétate de vinyle, de cellulose, d'époxy et de polyuréthane. Ces plastiques entrent dans la fabrication de plusieurs produits finis utilisés dans la construction, dans les industries de l'automobile, de l'électroménager, du vêtement, des jouets, des emballages et pour la fabrication de machines à usage médical. Les PAEs entrent également dans la production de : cosmétiques, encres, peintures, pesticides et insecticides (Vitali *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 1997, Hewitt et Servos, 2001, Gavala *et al.*, 2003, Adhoum et Monser, 2004, Silva *et al.*, 2004).

Les PAEs les plus répandus sont le diméthyl- (DMP), le diéthyl- (DEP), le di-iso-propyl- (DiPP), le dipropyl- (DPP), le di-iso-butyl- (DiBP), le di-*n*- butyl- (DBP), le *n*-butyl benzyl-

(BBP), le di-2-éthylhexyl- (DEHP) et le di-*n*-octylphtalate. En 1975, la production mondiale annuelle variait entre 1,4-1,8 tonnes. Depuis, leur production ne cesse d'augmenter. Ainsi en 1987, elle était déjà de 5 tonnes dont 4 tonnes de DEHP (Vitali *et al.*, 1997).

Une certaine proportion de ces phtalates peut être déversée dans l'environnement, ceci à chaque échelon des processus industriels où ils interviennent. Par exemple, dans le cas des industries plastiques et produits dérivés, les PAEs peuvent être libérés lors des phases de production (en particulier au cours du chauffage des matières premières), lors de leur utilisation dans la fabrication des produits finis (fenêtre, porte, et diverses tuyauteries) mais également lors de l'utilisation de ces produits (libération dans le liquide circulant par exemple) (Vitali *et al.*, 1997, Marttinen *et al.*, 2003). Les PAEs sont alors, pour la majorité, évacués vers des STEP (Vitali *et al.*, 1997).

### ***Source humaine***

La contamination de l'espèce humaine par les PAEs, existe (Silva *et al.*, 2003, Calafat *et al.*, 2004). Les voies de contamination sont multiples : ingestion, inhalation, absorption à travers le derme, ou bien par voie intraveineuse ou parentérale chez les patients suivant des traitements médicaux impliquant du matériel fabriqué avec des esters de phtalates (Wahl *et al.*, 1999, Calafat *et al.*, 2004). Chez l'espèce humaine, les esters de PAEs sont rapidement métabolisés en monoesters qui, à leur tour, peuvent être métabolisés en oxydes. Les monoesters et les oxydes obtenus subissent alors une glucuronisation. Les conjugués obtenus sont ensuite excrétés dans les urines ou les selles (Silva *et al.*, 2003, Silva *et al.*, 2004). Les mesures réalisées par Silva *et al.* (2004), montrent la présence de plusieurs monoester de phtalates tel que le monométhyl phtalate (57-179 ng/ml), le monocyclohexyl phtalate (38-201 ng/ml) et le monocyclopentyl phtalate (39-88 ng/ml), et deux oxydes, le mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phtalate (25-125 ng/ml) et le mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phtalate (11-47 ng/ml) dans plusieurs échantillons urinaires provenant de donneurs volontaires, indemnes de toutes pollutions avec des phtalates (Silva *et al.*, 2004).

Les substances éliminées dans les urines sont alors évacuées vers les STEP (Vitali *et al.*, 1997).

### ***I. A. - 2. 3. 2. Epuration des eaux usées***

Dans les STEP, le rendement d'élimination des PAEs semble très élevé. Dans le cas du DEHP, un rendement d'élimination de 97 % a été mesuré dans une STEP finlandaise (Marttinen *et al.*, 2003). Mais cette valeur ne correspond cependant pas à 97 % de biodégradation. En fait, seulement 14 % sont réellement biodégradés. Les 68 % restant sont adsorbés par les boues activées (Marttinen *et al.*, 2003). Ainsi, en Allemagne, les boues activées de 35 stations d'épuration différentes présentaient des taux en DEHP et en DBP compris entre 27,9-154 mg/kg et entre 0,2-1,7 mg/kg respectivement (Fromme *et al.*, 2002). Les PAEs peuvent persister dans ces boues, leur temps de persistance étant d'autant plus long que leurs chaînes latérales sont longues (Gavala *et al.*, 2003). Cette contamination des boues activées crée alors un risque de pollution des sols et des nappes phréatiques (par lixiviation des sols), lorsque les boues sont épandues (Schnaak. *et al.*, 1997, Gavala *et al.*, 2003).

C'est pourquoi, depuis quelques années, plusieurs équipes de recherche tentent de trouver de nouveaux mélanges bactériens pour accélérer la biodégradation de ces polluants dans les boues : en conditions aérobies et acclimatées, ou en conditions anaérobies. Dans les deux cas, le DBP peut être très rapidement biodégradé (demi-vies inférieures à 2 jours et 5,1 jours, respectivement). Le DEP est aussi assez rapidement biodégradé en condition anaérobie, avec une demi-vie de 8,6 jours. Par contre, le DEHP n'est que très difficilement biodégradé en condition anaérobie. Sa demi-vie a été estimée, en laboratoire, à 198 jours (Gavala *et al.*, 2003). Ce résultat est confirmé en STEP, puisqu'au bout de 19 jours de traitement anaérobie, seuls 32% du DEHP présent ont été réellement biodégradés (Marttinen *et al.*, 2003). Toutefois, l'avantage de ces nouveaux mélanges bactériens est qu'après l'épandage des boues dans les sols, la biodégradation peut continuer voire même être plus rapide que dans les boues. Ainsi, la demi-vie du DOP dans les sols (chaîne latérale plus longue que le DEHP) ne serait plus que de 28,4 jours (Wang *et al.*, 2004).

I. A. - 2. 3. 3. Situation dans l'environnement

Milieu naturel

Les PAEs présents dans les différents effluents traités en STEPs (domestiques et/ou industriels) et ceux présents dans les pesticides peuvent polluer les écosystèmes aquatiques (Vitali *et al.*, 1997). La persistance des PAEs dans ces écosystèmes dépend des processus de dégradation physico-chimique et biotique. En fait, les processus de dégradation physico-chimique sont insuffisants pour permettre une autoépuration de l'environnement : la demi-vie physico-chimique des PAEs est de l'ordre de plusieurs années. Quant aux processus de biodégradation bactérienne ou par d'autres espèces aquatiques, leur efficacité reste variable mais ils permettent de diminuer la demi-vie des PAEs dans l'eau douce qui atteint finalement des valeurs comprises entre 1 et 30 jours selon la température, la longueur et les ramifications des chaînes latérales (Vitali *et al.*, 1997).

Les caractéristiques physico-chimiques des PAEs font qu'ils ont tendance à s'adsorber sur les particules en suspension dans l'eau et sur les sédiments (Vitali *et al.*, 1997). Une étude italienne réalisée sur le fleuve Ebre, montre que tous les phtalates peuvent être retrouvés dans les sédiments à des concentrations pouvant atteindre 487,3 µg/kg pour le DEHP (Annexe 9) (Calafat *et al.*, 2004). Cependant, les valeurs mesurées dans les sédiments peuvent être encore plus élevées. Dans une autre étude, réalisée sur 35 échantillons de sédiments provenant de plusieurs fleuves et rivières allemandes, des concentrations en DBP et en DEHP de 2,2 et 8,4 mg/kg ont été ainsi mesurées (Tableau 7, Annexe 9) (Fromme *et al.*, 2002).

Tableau 7 : Contamination par les phtalates (ng/l) de différents effluents bruts et traités de STEPs (48 STEPs) ainsi que de diverses eaux de surface (121 points de prélèvement) et sédiments (10 points de prélèvement ; en µg/kg), entre 1994 et 2002 (Vitali *et al.*, 1997, Fromme *et al.*, 2002, Brossa *et al.*, 2003, Marttinen *et al.*, 2003, Calafat *et al.*, 2004, Hemming *et al.*, 2004).

| Composés  | Effluent brut       | Effluent traité | %               | Eau de surface            | Sédiment                 |
|-----------|---------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|--------------------------|
| Phtalates | 209200 <sup>a</sup> | n.d. – 182000   | 97 <sup>c</sup> | n.d. – 97800 <sup>b</sup> | n.d. – 8444 <sup>b</sup> |

<sup>a</sup> valeur mesurée ; <sup>b</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée ; <sup>c</sup> valeur estimée.

Toutefois, l'eau des fleuves et des rivières peut aussi être polluée par des PAEs, et dans ce cas des concentrations très élevées ont également été détectées : 44300 ng/l pour le DBP et

97800 ng/l pour le DEHP (Tableau 7, Annexe 9) (Vitali *et al.*, 1997, Fromme *et al.*, 2002, Brossa *et al.*, 2003). Quant aux écosystèmes marins, ils peuvent également être touchés par cette pollution. Dans certains cas, la pollution marine peut même être supérieure à la pollution des eaux douces. C'est, par exemple, le cas présenté dans l'étude de Brossa *et al.* (2003) où l'eau de mer contient deux fois plus de DBP et quatre fois plus de DEHP. De plus, un autre phtalate peut être détecté dans l'eau de mer, le BBP (150 ng/l). Ce dernier semble être plutôt d'origine agricole car il est uniquement détecté dans les eaux d'irrigation au contraire des deux autres PAEs qui sont présents, à la fois, dans les effluents traités et dans les eaux d'irrigation (Brossa *et al.*, 2003). Par conséquent si, dans ce cas, l'eau de mer est plus polluée, c'est parce qu'elle reçoit, à la fois, les eaux polluées du fleuve par les effluents de STEPs et les eaux d'irrigation (Brossa *et al.*, 2003).

### ***Eaux de consommation***

Dans l'eau du robinet prélevée dans le sud de la Catalogne, en Espagne, la présence de deux PAEs a été détectée, à des concentrations de 1340 ng/l pour le DBP et 4260 ng/l pour le DEHP. Ces concentrations sont environ deux fois supérieures à celles de la rivière qui traverse cette région. Par contre, elles sont à peu près équivalentes à celles de l'effluent traité de la STEP qui dessert une partie de cette région. Par ailleurs, les eaux d'irrigation semblent également être une source de pollution puisqu'on y trouve également des taux élevés de ces polluants (DBP : 3570 ng/l, DEHP : 5210 ng/l) (Brossa *et al.*, 2003).

### ***Absorption par les poissons***

En théorie, du fait de leur lipophilicité, les PAEs ingérés par les poissons devraient s'accumuler facilement dans les tissus. Plusieurs études ont été réalisées pour évaluer leurs effets œstrogéniques sur ces animaux, mais aucune ne présente de résultats sur leur bioaccumulation dans les organes ou les tissus de poisson (Giam *et al.*, 1998, Kim *et al.*, 2002). Cependant, le fait qu'ils induisent des changements physiologiques indique qu'ils sont véhiculés et qu'ils pénètrent dans les organes où ont lieu ces changements.

## ***I. A. - 2. 4. Les PCBs***

### ***I. A. - 2. 4. 1. Sources de pollution***

Les PCBs regroupent l'ensemble des biphényles chlorés dont la formule brut est la suivante :  $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ . Compte tenu, des différents niveaux de substitution et des différents isomères de position, 209 congénères et 10 isomères sont théoriquement possibles. Cependant, l'encombrement stérique des différents groupements fonctionnels permet la formation de seulement 182 d'entre eux. Les PCBs présents sur le marché, correspondent à des mélanges complexes pouvant contenir 40 à 60 congénères différents. De plus, malgré différentes étapes de purification, les produits finis peuvent également contenir d'autres substances polychlorées toxiques, comme les polychlorodibenzofurannes (PCDFs), les polychlorodibenzodioxines (PCDD), les polychloroquaterphényles (PCQ) et les polychloronaphtalènes (PCN) (Mhiri et Tandeau de Marsac, 1997).

Synthétisés pour la première fois en 1881, la production industrielle des PCBs débute réellement en 1929, aux USA. Ils sont utilisés, entre autres, comme :

- fluides diélectriques (isolants) dans les transformateurs, les condensateurs de puissance, pour l'électroménager ou l'éclairage,
- fluides caloporteurs dans certaines installations thermiques,
- fluides hydrauliques et lubrifiants,
- additifs dans les formulations d'insecticides et de bactéricides,
- agents plastifiants et/ou adhésifs pour les peintures, colles, encres, plastiques, etc (Mhiri et Tandeau de Marsac, 1997).

La majorité de ces composés est synthétisée par 10 pays, parmi lesquels les USA, l'Allemagne, l'Italie, l'Espagne, l'Angleterre, le Japon et la France. Cette production a été estimée à 1,1-1,5 millions de tonnes depuis 1929. En France, les PCBs ont été très utilisés pendant les années 50-70. De 1955 à 1984, la production française avoisinait 115000 tonnes. Depuis 1975, l'utilisation des PCBs comme additifs, a été interdite en France et, depuis 1987, leur vente et leur acquisition, ou la commercialisation d'appareils contenant plus de 100 mg/kg de PCBs, ont été prohibées. En 1992, le taux limite de PCBs toléré dans les produits électriques a

été ramené à 50 mg/kg. Enfin, une directive européenne prévoit l’interdiction totale des PCBs d’ici 2010 (Mhiri et Tandeau de Marsac, 1997).

La pollution de l’environnement par les PCBs, peut se faire lors de leur synthèse ou lors de la fabrication des produits finis. Ces substances étant des produits très volatiles, leur entrée dans l’environnement se ferait plutôt par voie aérienne (Font *et al.*, 1996, Falandysz *et al.*, 2004).

**I. A. - 2. 4. 2. Epuration des eaux usées**

Lors de leur synthèse ou de leur utilisation, certains PCBs sont évacués vers les STEP. Des concentrations variant de quelques nanogrammes par litre jusqu’à 3200 ng/l ont ainsi été détectées dans certains effluents traités d’origine industrielle en Suisse, en Espagne et aux USA (Tableau 8, annexe 10) (Font *et al.*, 1996).

Du fait de leur structure chimique complexe, ces polluants ne sont pas dégradés par les processus traditionnels d’épuration de l’eau (Wang *et al.*, 2003) et sont généralement soit évacués avec les effluents traités et déversés dans les écosystèmes aquatiques (Wang *et al.*, 2003), soit piégés par les boues activées (Brambilla *et al.*, 2004). Dans ce cas, les PCBs vont tout d’abord contaminer les sols lors de l’épandage des boues puis, au cours de la lixiviation de ces sols, ils vont contaminer à leur tour les eaux souterraines et de surface (Brambilla *et al.*, 2004).

**Tableau 8 :** Contamination par les PCBs de différents effluents de STEP et de diverses eaux de surface en ng/l entre 1980 et 1992, dans 8 pays différents d’Europe et d’Amérique (Font *et al.*, 1996).

| Composés       | Effluent de STEP        | Fleuve / rivière        | Estuaire / océan        | Mer                      |
|----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Isomère de PCB | -                       | 0,06 – 164 <sup>a</sup> | -                       | 0,08 – 0,79 <sup>a</sup> |
| Σ PCBs         | 500 – 3200 <sup>a</sup> | 8 – 222 <sup>a</sup>    | 0,07 – 0,6 <sup>a</sup> | 1,3 – 4,6 <sup>a</sup>   |
| Aroclore       | 3,4 – 1547 <sup>a</sup> | <1 – 620 <sup>a</sup>   | -                       | -                        |

<sup>a</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée

### ***I. A. - 2. 4. 3. Situation dans l'environnement***

#### ***Milieu naturel***

Le dosage des PCBs dans des milieux polaires est difficile à réaliser du fait des caractéristiques très hydrophobes de ces substances, des propriétés chimiques différentes entre isomère et de leurs faibles concentrations dans les milieux polaires (Font *et al.*, 1996, Verweij *et al.*, 2004). Ces dosages impliquent souvent une phase d'extraction et/ou de concentration (Contreras López, 2003, Wang *et al.*, 2003). Les analyses réalisées dans différents pays, comme l'Allemagne, les Pays-Bas, le Canada, le Japon, la Belgique, la Croatie et l'Espagne, ont ainsi permis de montrer que les PCBs sont toujours présents, quelque soit le type d'eaux de surfaces : fleuves et rivières, estuaires, océans et mers (Tableau 8, annexe 10) (Font *et al.*, 1996).

Cependant, la majorité des PCBs s'adsorbe sur les sédiments (Verweij *et al.*, 2004). Différentes études réalisées aux USA, aux Pays-Bas, montrent des taux élevés de PCBs avec des concentrations comprises entre 116 et 304 ng/g de matière sèche (Sapozhnikova *et al.*, 2004), et “ < 3 ” et 1100 ng/g (Verweij *et al.*, 2004), respectivement. Ces sédiments servent de réservoir à PCBs et leur déplacement dans les cours d'eau permet leur transport bien au-delà des estuaires (Font *et al.*, 1996). Par ailleurs, les PCBs ont une longue durée de vie dans les écosystèmes aquatiques (stabilité chimique importante, très faible biodégradabilité) (Smith et Gangolli, 2002).

#### ***Eaux de consommation***

Dans l'eau de boisson de divers pays d'Europe, la concentration en PCBs peut s'élever à 0,5 µg/l pour la somme de tous les isomères et jusqu'à 0,1 µg/l pour certains isomères spécifiques (Font *et al.*, 1996), valeur proche de la limite maximale autorisée dans les eaux de boisson établie par l'Union Européenne qui est comprise entre 0,1-0,2 µg/l. C'est pour cette raison que plusieurs équipes de recherche tentent de trouver des moyens pour diminuer la pollution des écosystèmes aquatiques par les PCBs. La méthode de dépollution la plus largement répandue est la méthode thermique (Mhiri et Tandeau de Marsac, 1997). D'autres méthodes, dégradation bactérienne (Mhiri et Tandeau de Marsac, 1997) ou irradiation, (Curry et Mincher,



1999) ont été développées ou sont en cours de développement pour dépolluer les sols, les effluents de STEPs et les sédiments.

**Absorption par les poissons**

L'absorption des PCBs par les poissons se fait plutôt par ingestion des sédiments en suspension, et/ou *via* l'alimentation, selon l'espèce de poisson. Ainsi, il semblerait que la contamination des gobies (*Acanthogobius flavimanus*) et des soles anglaises (*Pleuronectes vetulus*) se fasse plutôt *via* l'ingestion de sédiments (Voorspoels *et al.*, 2004) alors que pour les carpes (*Cyprinus carpio*), elle serait plutôt due à leur alimentation (Verweij *et al.*, 2004).

Les PCBs absorbés peuvent s'accumuler dans l'organisme du poisson (Tableau 9 ; Annexe 11) : dans les muscles (Bordajandi *et al.*, 2003, Falandysz *et al.*, 2004, Sapozhnikova *et al.*, 2004, Verweij *et al.*, 2004), dans le foie (Mormede et Davies, 2003, Sapozhnikova *et al.*, 2004, Voorspoels *et al.*, 2004) mais également dans les gonades (Sapozhnikova *et al.*, 2004) et dans les branchies (Sapozhnikova *et al.*, 2004). D'après l'étude de Sapozhnikova *et al.* (2004), l'échelle de bioaccumulation des PCBs chez les Tilapias (*Sarotherodon melanotheron*) est la suivante : Foie > gonades > branchies > muscles (Sapozhnikova *et al.*, 2004). Cette différence est corrélée avec la composition lipidique de ces organes. En effet, les PCBs étant des composés très lipophiles, ils se stockent principalement dans les graisses. La différence de masse grasseuse peut également expliquer que les anguilles (*Anguilla anguilla*) bioaccumulent plus de PCBs que les truites communes (*Salmo trutta*), les perches (*Perca fluviatilis*), les gardons (*Rutilus rutilus*) et les vandoises (*Leusiscus leusiscus*) (Bordajandi *et al.*, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2003).

**Tableau 9 :** Bioaccumulation des PCBs et PCDD/Fs chez les poissons (16 espèces) (Bordajandi *et al.*, 2003, Mormede et Davies, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2003, Falandysz *et al.*, 2004, Verweij *et al.*, 2004, Voorspoels *et al.*, 2004).

| Composés    | Foie                     | Muscle                 |                            |                          |
|-------------|--------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------|
|             | ng/g de lipide           | ng/g de lipide         | ng/g (poids sec)           | ng/g (poids              |
| Σ PCBs      | 18,5 – 9880 <sup>a</sup> | 21 – 5320 <sup>a</sup> | 0,77 – <12,54 <sup>a</sup> | 1,6 – 126 <sup>a</sup>   |
| Σ PCDD / Fs | -                        | -                      | 1,22 – 1,69 <sup>a</sup>   | 1,69 – 4,39 <sup>a</sup> |

<sup>a</sup> valeur minimale détectée - valeur maximale détectée

Une partie des PCBs ingérés va être éliminée :

- *via* les urines après biotransformation les rendant plus hydrophiles,
- par leur excrétion dans les selles, dans les œufs ou dans le sperme (Contreras López, 2003).

Quand la quantité de toxique éliminée est inférieure à la quantité ingérée par les poissons, les toxiques se concentrent dans l'organisme (Contreras López, 2003). La structure des PCBs, et plus précisément leur degré de chloration, influe sur le processus de bioconcentration. Ainsi, les congénères moins chlorés sont plus rapidement métabolisés et éliminés (Bordajandi *et al.*, 2003).

## ***I. A. - 2. 5. Les pesticides***

### ***I. A. - 2. 5. 1. Sources de pollution industrielle***

Les pesticides sont des produits chimiques destinés à lutter contre les parasites, les insectes et les champignons qui détruisent les cultures. La population mondiale étant en croissance constante, les besoins alimentaires ne cessent de croître. Pour subvenir à ces besoins, les rendements agricoles ont été améliorés grâce, entre autre, à l'utilisation de plus de pesticides. Ainsi, au Bénin, depuis 1990, les quantités de pesticides, introduites dans l'environnement, sont passées de moins de 500 m<sup>3</sup> à environ 4862 m<sup>3</sup> en 1998 (Okoumassoun *et al.*, 2002).

Les pesticides regroupent plusieurs types de produits chimiques différents tels que les pyréthroïdes (Garey et Wolff, 1998, Werner *et al.*, 2002, Yilmaz *et al.*, 2004), les dicarboximides (Radice *et al.*, 2002), les azoles (Hurst et Sheahan, 2003), les pesticides organophosphorés (Ingelse *et al.*, 2001, Lambropoulou et Albanis, 2001) et organochlorés (Okoumassoun *et al.*, 2002). Tous ne sont pas des ŒMs (Garey et Wolff, 1998, Mills *et al.*, 2001, Hurst et Sheahan, 2003). La majorité des pesticides œstrogéniques appartient en effet à la classe des organochlorés (Okoumassoun *et al.*, 2002, Muir *et al.*, 2003) comme la dieldrine, le lindane, l'heptachlore, le methoxychlore, l'endosulfan (Gormley et Teather, 2003), l'hexachlorocyclohexane (HCH) (Singh et Canario, 2004) et le DDT (dichlorodiphényltrichloroéthane) et ses métabolites (Mills *et al.*, 2001), le *p,p'*-DDE, le *p,p'*-DDT, et le *p,p'*-TDE. Certains pyréthroïdes (le Fenvalerate et le Sumithrine) (Garey et Wolff, 1998), fongicides dicarboximides (le procymidone) (Radice *et al.*, 2002) et certains fongicides appartenant à la classe chimique des azoles (l'époxiconazole, le

penconazole et le propiconazole) présentent également une activité œstrogénique (Hurst et Sheahan, 2003).

## ***I. A. - 2. 5. 2. Situation dans l'environnement***

### ***Milieu naturel***

La pollution des écosystèmes aquatiques par les pesticides se fait lors de leur utilisation (Dabrowski *et al.*, 2002).

Tout d'abord, il y a une contamination des sols. La persistance des différents pesticides dans les sols fait que ces derniers deviennent des réservoirs à pesticides. Par exemple, en Chine, 20 ans après l'interdiction de l'utilisation du DDT et du HCH, des concentrations non négligeables sont encore présentes dans les sols : jusqu'à 5,3 et 3,4 µg/kg (Feng *et al.*, 2003). Ensuite, la lixiviation des sols entraîne une partie des pesticides vers les eaux souterraines et les eaux de surface (Feng *et al.*, 2003). Ce transport dépend :

- du mode et de la fréquence d'application des pesticides et de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, demi-vie et  $K_{ow}$ ) (Dabrowski *et al.*, 2002) ;
- des caractéristiques des sols et des écosystèmes végétaux qui y poussent (composition carbonée des sols ; type et surface des récoltes ; type et densité des végétaux constituant les berges : barrières naturelles entre les sols et les eaux de surface) (Dabrowski *et al.*, 2002) ;
- et de certains facteurs externes comme les précipitations (Dabrowski *et al.*, 2002).

Dans les eaux de surface, les pesticides se partagent entre la phase aqueuse et le sédiment, de façon différente selon leur propriété lipophile. Ainsi, l'azinphos-méthyl est, plus fréquemment, détecté dans la phase aqueuse alors que le chlorpyrifos et l'endosulfan le sont plutôt dans les sédiments (Dabrowski *et al.*, 2002).

### ***Absorption par les poissons***

Selon le pesticide et plus précisément selon sa répartition entre la colonne d'eau et les sédiments, la voie d'entrée dans l'organisme des poissons est différente. Les pesticides dissous dans l'eau vont plutôt entrer *via* les branchies ou la peau. Quant à ceux adsorbés sur les

sédiments, ils pénètrent plutôt par ingestion. Par ailleurs, comme les pesticides contaminent les animaux de tous les niveaux trophiques, les poissons peuvent donc être aussi contaminés *via* l'alimentation (Muir *et al.*, 2003).

**Tableau 10 :** Bioaccumulation des pesticides chez diverses espèces de poissons (15 espèces ) (Okoumassoun *et al.*, 2002, Bordajandi *et al.*, 2003, Mormede et Davies, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2003, Falandysz *et al.*, 2004, Verweij *et al.*, 2004, Voorspoels *et al.*, 2004).

| Composés                                                                                                                                                                               | Immature                |                           |                         |                           |                         |                       |                             |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------------|
|                                                                                                                                                                                        | Muscle                  | Foie                      | Muscle                  | Foie                      | Muscle                  | Foie                  | +                           |
| Aldrine                                                                                                                                                                                | -                       | <0,03 - 5,3 <sup>a</sup>  | -                       | <0,03 - 3,8 <sup>a</sup>  | -                       | -                     | <30000 <sup>b</sup>         |
| Dieldrine                                                                                                                                                                              | -                       | 22 - 55,7 <sup>a</sup>    | -                       | <0,03 - 3,8 <sup>a</sup>  | -                       | -                     | 0,09 - <80000 <sup>b</sup>  |
| Chlordane                                                                                                                                                                              | -                       | 103 - 855 <sup>a</sup>    | -                       | 22,9 - 270 <sup>a</sup>   | -                       | -                     | -                           |
| Σ DDTs                                                                                                                                                                                 | 475 - 6380 <sup>a</sup> | 410 - 4350 <sup>a</sup>   | 256 - 1360 <sup>a</sup> | 384 - 1460 <sup>a</sup>   | -                       | -                     | 1,3 - 136 <sup>c</sup>      |
|                                                                                                                                                                                        |                         | -                         | -                       | -                         | 392 - 5250 <sup>a</sup> | -                     | 34 - 4000 <sup>a</sup>      |
| Σ HCHs                                                                                                                                                                                 | 26 - 86 <sup>a</sup>    | <0,06 - 22,8 <sup>a</sup> | 8,8 - 43 <sup>a</sup>   | <0,06 - 16,9 <sup>a</sup> | -                       | -                     | 0,25 - 19 <sup>c</sup>      |
|                                                                                                                                                                                        |                         | -                         | -                       | -                         | 12 - 33 <sup>a</sup>    | -                     | 1 - 280 <sup>a</sup>        |
| Heptachlore                                                                                                                                                                            | -                       | <0,03 - 8,8 <sup>a</sup>  | -                       | <0,03 - 4,6 <sup>a</sup>  | -                       | -                     | <30000 <sup>b</sup>         |
| Lindane                                                                                                                                                                                | -                       | -                         | -                       | -                         | -                       | -                     | 0,08 - <100000 <sup>b</sup> |
| Σ pesticides                                                                                                                                                                           | -                       | -                         | -                       | -                         | -                       | 1,8 - 63 <sup>a</sup> | -                           |
| valeur minimale - maximale détectée en :                      ng/g de lipide <sup>a</sup> ,                      ng/g de muscle (poids secs) <sup>b</sup> , (poids frais) <sup>c</sup> |                         |                           |                         |                           |                         |                       |                             |

Après pénétration dans les organismes, les pesticides vont s’accumuler dans le foie et/ou dans les muscles (Tableau 10 ; Annexe 13) (Okoumassoun *et al.*, 2002, Bordajandi *et al.*, 2003, Mormede et Davies, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2003, Falandysz *et al.*, 2004, Verweij *et al.*, 2004, Voorspoels *et al.*, 2004). Les facteurs influençant le processus de bioaccumulation des pesticides, et plus précisément des pesticides organochlorés, sont identiques à ceux influençant la bioaccumulation des PCBs. D’ailleurs ces deux types de contaminants sont généralement étudiés en même temps (Okoumassoun *et al.*, 2002, Bordajandi *et al.*, 2003, Mormede et Davies, 2003, Muir *et al.*, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2003, Falandysz *et al.*, 2004, Verweij *et al.*, 2004, Voorspoels *et al.*, 2004). Ainsi, comme pour les PCBs, les anguilles bioaccumulent plus de DDTs, de dieldrine et de lindane que les truites communes, les gardons, les perches et les vandoises car les anguilles possèdent une masse grasseuse plus importante (Bordajandi *et al.*, 2003, Yamaguchi *et al.*, 2003).

D’autres part, selon le pesticide concerné, la bioaccumulation sera différente d’une espèce de poisson à l’autre, car chaque espèce possède une sensibilité différente vis-à-vis des

divers pesticides. Ainsi, les carpes bioaccumulent plus de DDTs, que d'Aldrine et de Dieldrine (Verweij *et al.*, 2004).

Certains pesticides ont été interdits dans certains pays du fait de leur dangerosité. Par exemple, l'utilisation de DDT est interdite aux USA depuis 1972. Par contre, il est encore utilisé au Mexique pour lutter contre la malaria. Ceci se répercute directement dans l'environnement puisque les poissons pêchés sur la cote atlantique mexicaine sont 40 % plus contaminés que les poissons pêchés sur la cote atlantique américaine (Sapozhnikova *et al.*, 2004).

Par conséquent, la contamination des poissons par les pesticides, même si elle est inférieure à celle des PCBs, pose quand même un problème important vis-à-vis des espèces piscicoles mais également vis-à-vis de l'Homme puisque ces animaux sont une source alimentaire (Smith et Gangolli, 2002).

*Aucun des œstrogènes mimétiques (EMs) cités précédemment, n'est éliminé à 100 % par les différents processus d'épuration de l'eau existant. De plus, malgré les phénomènes de dilution, de dégradation biotique et abiotique, des quantités encore très élevées pour certains de ces EMs, sont détectées dans les eaux de surface, ce qui conduit à la contamination des poissons et des eaux de boisson. Ces polluants vont alors pouvoir induire des effets néfastes d'une part sur les espèces piscicoles et éventuellement sur l'espèce humaine qui, du moins théoriquement, pourrait être contaminée via la consommation de poisson et d'eau de boisson contaminés.*

## ***I. B. Les Effets***

Les ŒMs appartiennent à la famille des perturbateurs endocriniens. Ces derniers altèrent la physiologie et le développement des organismes vivants et de leur progéniture en interagissant avec les fonctions endocrines (Schwaiger et Negele, 1998). Les ŒMs agissent plus exactement sur la fonction de reproduction en mimant les œstrogènes endogènes.

### ***I. B. - 1. Effets sur l'espèce humaine***

#### ***I. B. - 1. 1. Voie de contamination***

Les ŒMs peuvent, en théorie, contaminer l'espèce humaine :

✎ Via la consommation de médicaments et de végétaux : Ces voies concernent spécifiquement les œstrogènes de synthèse, les phyto- et les mycoœstrogènes. Les quantités absorbées peuvent être très élevées : 35 µg/jour à 100 mg/jour (Johnson *et al.*, 2000, Albertazzi et Purdie, 2002, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003). Elles sont bien supérieures aux concentrations en hormones stéroïdiennes produites de manière endogène chez les femmes (non enceintes : 1-8 µg/jour) (Johnson *et al.*, 2000), chez les hommes (1,5-3,9 µg/jour) (Johnson *et al.*, 2000) et produites par les garçons pré-pubères (6 µg/jour) (Webb *et al.*, 2003). De ce fait, ces voies de contamination ne peuvent être négligées.

✎ Via la consommation d'eaux de boisson contaminées : les concentrations retrouvées en œstrogènes naturels et en œstrogènes de synthèse dans les eaux de boisson indiquent que cette voie de contamination est peu probable pour l'espèce humaine (Webb *et al.*, 2003). Par contre, en ce qui concerne les alkylphénols, le bisphénol A et les phtalates, aucune étude n'a démontré que les concentrations présentes dans les eaux de boissons (40-50 ng/l, 80 ng/l, 1340-4260 ng/l, respectivement) étaient inoffensives pour l'Homme (Inoue *et al.*, 2002, Brossa *et al.*, 2003).

✎ Via la consommation de poissons contaminés : cette voie concerne tous les ŒMs, puisque tous possèdent la capacité de s'accumuler dans l'organisme des poissons (Bennetau-Pelissero *et al.*, 1998, Giam *et al.*, 1998, Lindholm *et al.*, 2000, Lai *et al.*, 2002, Villeneuve *et al.*,

2002, Falandysz *et al.*, 2004, Voorspoels *et al.*, 2004). Et d'ailleurs, pour les PCBs et les pesticides, des études ont montré que cette voie de contamination était la voie de contamination principale pour l'espèce humaine (Smith et Gangolli, 2002).

### ***I. B. - 1. 2. Effets sur la reproduction humaine***

De plus en plus d'études font état de l'augmentation des pathologies liées au système reproducteur humain telles que :

↳ les problèmes de fertilité masculine. Une étude réalisée sur plusieurs villes d'Europe montre, par exemple, que dans certaines villes comme Paris, la spermatogénèse a diminué de 2,1 % par an entre 1973 et 1992 (de  $86.10^6$  à  $60.10^6$  spermatozoïdes par ml de sperme, respectivement). Par contre, à Toulouse, il semble que la fertilité masculine n'ait pas changé pendant cette période. De même, aux Etats-Unis, selon l'état concerné, le rendement de production de spermatozoïdes peut également être très différent. Par exemple, le taux de spermatozoïdes par millilitre de sperme est de  $131,5.10^6$  dans l'état de New York, de  $100,8.10^6$  dans le Minnesota et de  $72,7.10^6$  en Californie (Safe, 2000).

↳ les pathologies organosexuelles comme les cryptorchidies (un ou les deux testicules ne sont pas descendus), les hypospadias (déplacement de l'ouverture urétrale) et les micropénis. Ainsi, une étude épidémiologique réalisée en Angleterre, entre 1952 et 1977, a montré que le nombre de cryptorchidie a doublé pendant ces 25 dernières années (1,2 % et 2,9 %, respectivement). Pendant cette même période, le nombre d'hypospadias a augmenté de manière significative en Europe (Angleterre, Hongrie et France) et aux Etats-Unis (Sultan *et al.*, 2001).

↳ les cancers hormonaux-dépendants comme les cancers des testicules ou de la prostate chez l'homme et les cancers du sein, des ovaires et de l'utérus chez la femme : le nombre de cancers des testicules est généralement en hausse dans plusieurs pays. Par exemple, le Danemark présente le nombre de cas le plus élevé des quatre pays scandinaves: environ  $14,5.10^5$  cas par an entre 1985-1989 au lieu de  $3,6.10^5$  cas par an en Finlande (Safe, 2000). En ce qui concerne les cancers du sein, leur nombre augmente également depuis ces 20 dernières années. Ainsi, dans l'Est de la Chine et dans le Nord des Etats-Unis, les taux annuels de cancers du sein sont, actuellement et respectivement, de 11,8 et 86,3 cas pour 100000 individus (Coyle, 2004). De

plus, aux USA, seulement 25 à 47 % des cancers des seins sont expliqués par les facteurs de risque physiologiques comme l'âge, le cycle reproducteur (âge de la ménstrualisation, de la première grossesse, de la lactation et de la ménopause, etc). Un pourcent des cas est attribué aux rayonnements subis lors des séances de radiographie. Le reste serait expliqué par l'apport exogène d'œstrogènes ou la consommation d'alcool (Coyle, 2004). En Suisse et au Danemark, plusieurs études indiquent aussi que plus de 60 % des cancers auraient une origine environnementale (Coyle, 2004).

### ***I. B. - 1. 3. Actions des œstrogènes mimétiques***

A l'heure actuelle, aucune affirmation ne peut être faite sur la relation entre la recrudescence des altérations du système reproducteur humain et la contamination de l'homme par des ŒMs. Toutefois plusieurs études montre que ce lien est envisageable.

Par exemple, dans le cas du diéthylstilbestrol (DES), ce lien de cause à effet a clairement été établi. Cet analogue pharmaceutique de l'œstradiol a été utilisé dans les années soixante pour prévenir les risques d'avortement. Or, il s'est révélé être très toxiques pour les fœtus. Chez les enfants de sexe féminin, il a induit une augmentation du nombre des malformations génitales et des cancers génitaux (Massaad *et al.*, 2002). Quant aux garçons, ils souffraient d'anomalies génitales de type cystes épидидymales (20,8 % au lieu de 4,9 % chez les garçons contrôles), hypospadias (4,4 % au lieu de 1,1 %), cryptorchidie et des testicules hypoplasiques (11,4 % au lieu de 2,1 %), ou bien de type micropénis (apparition de ce type d'anomalie dans 1,5 % des cas) (Sultan *et al.*, 2001).

D'autre part, dans certaines industries comme celles fabriquant des plastiques en PVC où tous les composants utilisés sont des ŒMs (56 % sont des organochlorides, et le reste est constitué essentiellement de phtalates tel que le DEHP, et d'additifs comme le bisphénol A et le nonylphénol), une augmentation anormale du nombre des cancers des testicules a été observée : 7 cas sur 9 individus étudiés (Ohlson et Hardell, 2000). De même, de nombreuses études ont démontré que la majorité des ŒMs possèdent la capacité de stimuler la multiplication des cellules MCF-7, lignée cellulaire humaine caractéristique des tumeurs du sein (Soto *et al.*, 1994, Soto *et al.*, 1995, Sonnenschein et Soto, 1998, Andersen *et al.*, 1999, Folmar *et al.*, 2002). De



plus, une étude réalisée à New York, en 1993, a montré une multiplication (entre 2 et 4 fois) du nombre de cancers du sein dans une population de femmes présentant des taux sériques élevés en DDE et en PCBs (Coyle, 2004).

*Toutes ces observations tendent à soutenir l'idée que l'omniprésence des ŒMs dans l'environnement humain pourrait être responsable de certaines anomalies apparaissant chez l'espèce humaine, touchant le système reproducteur ou les organes hormono-dépendant.*

Néanmoins, certains ŒMs comme les phytoestrogènes sont utilisées pour lutter contre les cancers du sein et de la prostate. En fait, avant la ménopause, quand les taux en œstrogènes sont élevés, les phytoestrogènes semblent avoir un effet protecteur contre les cancers du sein. Par contre, après la ménopause, quand les taux en œstrogènes sont faibles, les phytoestrogènes peuvent stimuler le développement d'un cancer du sein. Ceci s'explique par le fait que le potentiel œstrogénique des phytoestrogènes étant assez faible, ils ne peuvent exprimer leur activité œstrogénique que dans un environnement par ailleurs faible en œstrogènes (Ososki et Kennelly, 2003). En ce qui concerne leur effet bénéfique sur le cancer de la prostate, il a été démontré, *in vitro*, que les phytoestrogènes peuvent inhiber la croissance des cellules cancéreuses prostatiques (Ososki et Kennelly, 2003).

## ***I. B. - 2. Effets sur les espèces piscicoles***

Le choix des poissons comme espèce de référence pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques s'explique par le fait qu'ils sont largement représentés dans tous les milieux aquatiques : eau douce, eau de mer, en surface, en profondeur, sur les côtes ou au large. De plus, ils jouent un rôle majeur dans la chaîne alimentaire. Ils sont le lien entre les niveaux inférieurs et supérieurs de la pyramide trophique dont l'homme est le sommet (Van der Oost *et al.*, 2003). Ils représentent donc, de ce fait, une voie non négligeable de contamination pour l'Homme.

De plus, les espèces piscicoles font partie des espèces aquatiques les plus touchées par la pollution des écosystèmes aquatiques par les ŒMs. Selon le toxique impliqué, sa concentration et la durée d'exposition, mais avant tout selon le stade de développement du poisson au moment de

son exposition, différents niveaux d'impacts ont été observés chez les poissons mâles :

- féminisation totale de la population de poisson,
- ou féminisation partielle des mâles,
- ou bien simple déstructuration des gonades mâles.

Toutes ces perturbations peuvent aboutir à long terme à la disparition totale de l'espèce touchée.

### ***I. B. - 2. 1. Modification du sex-ratio***

La modification du sex-ratio en faveur des femelles a été observée dans différentes études de laboratoire impliquant plusieurs espèces de poissons et trois ŒMs: le 17 -œstradiol (E2), le 17 -éthinyloœstradiol (EE2), et le 4-nonylphénol (NP) (Annexe 14) (Blázquez *et al.*, 1998, Andersen *et al.*, 2003, Hill et Janz, 2003, Van der Belt *et al.*, 2003, Chikae *et al.*, 2004).

Ces études montrent qu'il existe une période particulière, incluant la phase de différenciation sexuelle, pendant laquelle les animaux exposés peuvent se féminiser complètement (Blázquez *et al.*, 1998, Andersen *et al.*, 2003, Hill et Janz, 2003, Van der Belt *et al.*, 2003, Chikae *et al.*, 2004). En dehors de cette période, l'exposition des animaux n'induit pas ou peu d'inversion du sexe. Ainsi, par exemple, quand des bars de mer (*Dicentrarchus labrax*) sont exposés avec 10 mg/kg d'EE2 entre le 60 et le 260<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, la période de différenciation sexuelle se situant entre 126 et le 226<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, 80 % de la population présente un phénotype femelle. Par contre, quand ils sont contaminés entre le 48 et le 88<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, seuls 62 % des animaux deviennent des femelles (Blázquez *et al.*, 1998). L'inversion de sexe est possible chez les poissons car, même si le sexe de l'animal est fixé génétiquement, c'est l'environnement hormonal qui va réellement induire l'expression des phénotypes mâles ou femelles (Gimeno *et al.*, 1998a, Gimeno *et al.*, 1998b). Par conséquent, si l'environnement hormonal est modifié pendant la période de différenciation sexuelle, le phénotype développé peut être différent du sexe génétique.

De plus, chez certaines espèces piscicoles comme les poissons zèbres (*Danio rerio*), l'inversion de sexe peut être réversible, à condition d'arrêter l'exposition au bon moment (Andersen *et al.*, 2003). Ainsi, 20 jours après l'arrêt de l'exposition, avec 15,4 ng/l d'EE2 pendant la période de différenciation des gonades, (entre le 20 et le 40<sup>ième</sup> jour après l'éclosion),

seulement 30 % des poissons sont devenus des femelles, contre 10 % de mâles et 60 % d'animaux intersexes. Ces derniers présentent des gonades dont la structure semble intermédiaire entre les phénotypes mâle et femelle. En fait, ceci résulte d'un début de retour à la normale dû à l'absence d'CEMs entre le 40 et le 60<sup>ième</sup> jour d'expérimentation. Par contre, si les animaux sont exposés, sans interruption, entre le 20 et 60<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, alors 100 % des animaux développent un phénotype femelle irréversible (Andersen *et al.*, 2003).

D'autre part, ces études montrent que le potentiel œstrogénique (capacité à mimer les effets des œstrogènes) de chaque toxique diffère. Ainsi une concentration de 1 ng/l d'EE2 est suffisante pour induire le même effet que 1 µg/l d'E2 (une inversion de sexe), alors que pour le 4-NP 100 µg/l sont nécessaires (Hill et Janz, 2003, Chikae *et al.*, 2004).

Lorsque ces concentrations sont comparées avec celles trouvées dans les milieux aquatiques de divers pays d'Europe, seuls le EE2 et les NPs semblent présenter un danger potentiel. En effet, les concentrations en EE2 et en NPs (tous isomères confondus) mesurées atteignent respectivement des valeurs de 4,3 ng/l (Tableau 4) (Belfroid *et al.*, 1999, Cargouët *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a) et de 180 µg/l (Tableau 6) (Blackburn et Waldock, 1995). Pour l'E2, les concentrations obtenues dans l'environnement, entre n.d. et 27 ng/l (Tableau 2) (Belfroid *et al.*, 1999, Fawell *et al.*, 2001, Kashiwada *et al.*, 2002, Cargouët *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a), sont inférieures à 1 µg/l, concentration nécessaire pour obtenir un effet.

Par conséquent, il est théoriquement possible d'obtenir des modifications du sex-ratio chez certaines espèces de poissons dans l'environnement. Ceci semble confirmé par une étude effectuée en 2001 sur douze sites répartis le long des côtes anglaises, puisqu'une légère féminisation des anguilles vivipares (*Zoarces viviparus*) (52-60 % de femelles) a été observée (Matthiessen *et al.*, 2002) dans une zone (Alde) proche de celle où un taux élevé de NPs, (180 µg/l) avait été mesuré en 1994 (Blackburn et Waldock, 1995).

## ***I. B. - 2. 2. Féminisation partielle***

La féminisation partielle des poissons mâles est, dans la majorité des cas, la conséquence d'une transformation incomplète des gonades. Cette féminisation partielle peut concerner l'architecture testiculaire et/ou les cellules germinales. Dans les deux cas, les animaux intersexes obtenus sont stériles.

### ***I. B. - 2. 2. 1. Architecture testiculaire***

La féminisation partielle de l'architecture testiculaire peut, par exemple, aboutir à la formation d'un oviducte à la place d'un canal déférent. Ce type d'altération a été observé chez des carpes exposées à de l'E2 ou à un alkylphénol, le 4-*tert*-pentylphénol (4-TPP), durant plusieurs semaines, soit 20, 30, 60 ou 90 jours à partir du 50<sup>ième</sup> jour après l'éclosion. Selon le toxique impliqué et sa concentration, le nombre d'animaux concernés est différent. Ainsi, 100 % des animaux exposés aux deux concentrations de E2 (9 et 23 µg/l), développent un oviducte et ceci quelque soit la durée d'exposition (Annexe 15). Quant aux animaux exposés à du 4-TPP, le nombre d'animaux présentant cette altération est, à la fois, dose-dépendante et durée-dépendante. Ainsi, pour les trois concentrations de 4-TPP (36, 90 et 256 µg/l), les premiers oviductes apparaissent quand les animaux sont exposés pendant 30 jours. Pour la plus faible concentration (36 µg/l) même après 90 jours d'exposition, seuls 50 % des mâles développent un oviducte. Par contre, pour les deux concentrations élevées (90 et 256 µg/l), 100 % d'animaux sont atteints après 60 jours d'exposition pour la concentration de 90 µg/l et après 30 jours pour la concentration de 256 µg/l (Gimeno *et al.*, 1998a). La différence entre ces deux toxiques résulte de leur potentiel œstrogénique avec E2 > 4-TPP.

Concernant les gobies (*Acanthogobius flavimanus*) contaminés pêchés à Forth, à Clyde, à Tees et à Mersey, les altérations observées n'impliquent pas les gonades mâles, mais la papille urogénitale. Cet appendice est un organe sexuel secondaire qui sert à déposer le sperme. Trente trois à 75 % des mâles contaminés présentent une féminisation partielle de cet organe (Annexe 15). Cette anomalie est très répandue chez les gobies. Elle est connue sous le nom du syndrome de MIPS (Morphologically Intermediate Papilla Syndrome). Des recherches en laboratoire ont montré que ce syndrome pouvait être induit par des concentrations d'E2 égales à 10, 100 et

1000 ng/l avec un nombre d'animaux atteints, dose-dépendant (14, 29 et 57 %, respectivement) (Matthiessen *et al.*, 2002).

Les concentrations en E2 retrouvées dans les milieux aquatiques (n.d.-27 ng/l, Tableau 2) confirment que le syndrome de MIPS puisse apparaître dans l'environnement. Quant à l'apparition d'oviducte, l'étude réalisée par Gimeno *et al.* (1998) ne permet pas d'affirmer que les concentrations présentes dans l'environnement pourraient induire ce type de perturbation puisque la concentration minimale induisant un effet n'a pas été déterminée (Gimeno *et al.*, 1998a).

### ***I. B. - 2. 2. 2. Cellules germinales***

La féminisation partielle des gonades mâles peut également impliquer les cellules germinales. Elle se traduit par l'apparition d'un ou plusieurs oocytes incrustés dans le tissu testiculaire. Le plus souvent, ces oocytes sont isolés les uns des autres (Blázquez *et al.*, 1998, Gimeno *et al.*, 1998a, Gronen *et al.*, 1999, Hashimoto *et al.*, 2000, Ackermann *et al.*, 2002, Kang *et al.*, 2002, Matthiessen *et al.*, 2002, Vethaak *et al.*, 2002, Andersen *et al.*, 2003, Hill et Janz, 2003, Solé *et al.*, 2003). Mais, dans certains cas, des petites zones ovariennes peuvent se former où plusieurs oocytes sont rassemblés (Simpson *et al.*, 2000). Cette féminisation des cellules germinales mâles est possible car ces cellules sont dites bipotentes. Elles peuvent se différencier aussi bien en oocytes qu'en spermatocytes, suivant la stimulation hormonale qu'elles reçoivent (Gimeno *et al.*, 1998a).

#### ***Poissons immatures***

Pour certaines espèces de poissons telles que les bars de mer et les poissons zèbres, les ovotestis (testicules contenant des oocytes) vont apparaître uniquement chez des animaux immatures, et pendant des périodes particulières de leur développement :

- entre le 60<sup>ième</sup> et le 260<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, pour les bars exposés à de l'E2 (10 mg/kg) (Blázquez *et al.*, 1998),
- entre le 1<sup>er</sup> et le 30<sup>ième</sup> jour après la fertilisation, pour les poissons zèbres exposés à de l'EE2 (15,4 ng/l) (Andersen *et al.*, 2003).

Une exposition au-delà de ces deux périodes, n'induit plus le développement d'ovotestis. Pour les bars, le fait que la phase de développement des testicules (126-226<sup>ième</sup> jour) soit incluse dans la période d'exposition, laisse supposer que les oocytes obtenus sont bien le résultat d'une féminisation partielle des gonades (Blázquez *et al.*, 1998). Par contre, dans le cas des poissons zèbres, la période d'exposition se situant avant la phase de développement des testicules (23-40<sup>ième</sup> jour), les oocytes observés seraient plutôt des reliquats de la phase hermaphrodite. En effet, entre le 10<sup>ième</sup> et le 23<sup>ième</sup> jour après l'éclosion, tous les poissons zèbres développent des ovaires. Puis au 23<sup>ième</sup> jour, les ovaires de la moitié de la population, entrent en dégénérescence et des testicules les remplaçant. Les oocytes obtenus auraient réussi à perdurer du fait de la présence de l'ŒM (Andersen *et al.*, 2003).

Chez les animaux atteints très jeunes, le développement d'ovotestis s'accompagne, dans la majorité des cas, d'une inhibition ou d'une altération du développement gonadique (Blázquez *et al.*, 1998, Gimeno *et al.*, 1998a). Cependant, chez certaines espèces, des oocytes peuvent apparaître alors que les testicules se sont développés normalement. C'est le cas, par exemple, des poissons zèbres exposés à :

- de l'EE2 (15,4 ng/l), entre la fertilisation de l'œuf et le 30<sup>ième</sup> jour après l'éclosion (Andersen *et al.*, 2003),
  - du 4-NP (30 et 100 µg/l), entre le 2<sup>ième</sup> jour et le 60<sup>ième</sup> après l'éclosion (Hill et Janz, 2003),
- et des carrelets matures pêchés dans la partie de la baie de Tokyo polluée par des effluents industriels et domestiques (Hashimoto *et al.*, 2000).

Dans le cas des poissons zèbres, le développement normal des testicules confirme le fait que les oocytes observés sont bien des cellules résiduelles provenant des ovaires développés au cours du stade hermaphrodite, et non pas le résultat d'une féminisation des cellules germinales mâles (Andersen *et al.*, 2003, Hill et Janz, 2003).

### ***Poissons matures***

Les ovotestis peuvent être aussi obtenus chez des animaux matures contaminés, pour certaines espèces de poissons telles que les carpes et les médakas (*Oryzias latipes*). En effet, lorsque des mâles matures de ces deux espèces sont exposés à de l'E2 (carpes : 1 µg/l pendant

60 ou 90 jours, médakas : 29-463 ng/l pendant 25 jours), 25 à 100 % des animaux présentent des ovotestis, ce ratio dépendant de la concentration ou de la durée d'exposition (Gimeno *et al.*, 1998b, Kang *et al.*, 2002).

De plus, l'apparition anormale d'oocytes chez ces animaux adultes est également souvent accompagnée d'une déstructuration du tissu testiculaire, voir d'une féminisation partielle de son architecture et/ou d'une inhibition de la spermatogenèse (Gimeno *et al.*, 1998b, Kang *et al.*, 2002). Ces observations ont conduit à l'hypothèse que le développement d'ovotestis, chez des poissons matures, impliquerait une démasculinisation préalable des testicules (Gimeno *et al.*, 1998b).

### ***Situation dans l'environnement***

D'après les études réalisées sur le terrain, les ovotestis sont le type d'altération féminisante le plus répandu dans l'environnement (Annexe 16) (Hashimoto *et al.*, 2000, Simpson *et al.*, 2000, Matthiessen *et al.*, 2002, Vethaak *et al.*, 2002, Solé *et al.*, 2003). Pourtant, les concentrations minimales nécessaires pour induire leur développement sont supérieures à celles retrouvées dans l'environnement, sauf dans le cas particulier des médakas qui semblent particulièrement sensibles à l'E2 (Tableau 4). En effet, 5 médakas mâles matures sur 8, exposés à 29 ng/l d'E2, présentent des ovotestis (Kang *et al.*, 2002). Quant aux carpes matures, la concentration minimale en E2 ayant un effet est de 0,1 µg/l (Gimeno *et al.*, 1998b). Par conséquent, pour ce type d'altération, la carpe semble être un poisson moins sensible. Toutefois, des carpes matures ayant développé des ovotestis ont été trouvées dans l'environnement (Solé *et al.*, 2003). Ces poissons ont été pêchés à 23 km en aval d'une STEP, traitant à la fois des effluents domestiques et 20-30 % d'effluents industriels, c'est-à-dire dans un milieu riche en plusieurs ŒMs. Ces polluants, pouvant agir de manière synergique, peuvent alors posséder un plus fort pouvoir œstrogénique, ce dernier étant suffisant pour induire le développement d'ovotestis.

Par conséquent, le mélange et la concentration des ŒMs dans les effluents de STEPp peuvent expliquer le fait que les ovotestis soient aussi répandus dans l'environnement. Cette hypothèse peut être étayée par des études de terrain où l'apparition d'ovotestis a pu être reliée à

la présence de STEPs polluant les eaux de surface (Hashimoto *et al.*, 2000, Simpson *et al.*, 2000, Matthiessen *et al.*, 2002, Vethaak *et al.*, 2002, Solé *et al.*, 2003).

**I. B. - 2. 3. Démasculinisation**

Quand les poissons sont exposés à des CEMs, soit leurs gonades sont totalement ou partiellement féminisées, comme cela a été vu précédemment, soit leur différenciation en testicule est inhibée. Ce phénomène de démasculinisation apparaît aussi bien chez les jeunes immatures que chez les poissons matures.

**I. B. - 2. 3. 1. Démasculinisation des jeunes immatures**

Ainsi, chez des carpes immatures exposées pendant leur phase de différenciation sexuelle (entre le 50-70<sup>ième</sup> jour après l’éclosion) à du 4-TPP (36, 90, 256 µg/l), 100 % des animaux n’ont pas différencié leurs gonades en testicules. Ce pourcentage tend à diminuer avec l’allongement de la période d’exposition et il diminue d’autant plus rapidement que la concentration en TPP est plus élevée (Tableau 11) (Gimeno *et al.*, 1998a). La diminution du nombre de mâles présentant des gonades indifférenciées se fait, dans ce cas, en faveur de la féminisation partielle des gonades avec la formation d’un oviducte dans le testicule (Gimeno *et al.*, 1998a).

Tableau 11 : Effet de la durée d’exposition et de la concentration en 4-TPP sur l’apparition d’anomalie du développement des gonades mâles chez les carpes immatures (Gimeno *et al.*, 1998a).

| Exposition    | 50-70 <sup>ième</sup> jaé |     |     | 50-90 <sup>ième</sup> jaé |    |     | 50-110 <sup>ième</sup> jaé |     |     | 50-140 <sup>ième</sup> jaé |     |     |
|---------------|---------------------------|-----|-----|---------------------------|----|-----|----------------------------|-----|-----|----------------------------|-----|-----|
| µg/l          | 36                        | 90  | 256 | 36                        | 90 | 256 | 36                         | 90  | 256 | 36                         | 90  | 256 |
| Indifférencié | 100                       | 100 | 100 | 70                        | 30 | 0   | 20                         | 0   | 0   | 0                          | 0   | 0   |
| + oviducte    | 0                         | 0   | 0   | 30                        | 70 | 100 | 30                         | 100 | 100 | 50                         | 100 | 100 |
| Normaux       | 0                         | 0   | 0   | 0                         | 0  | 0   | 50                         | 0   | 0   | 50                         | 0   | 0   |

jaé : jours après l’éclosion.

Dans le cas des poissons zèbres exposés à du 4-NP, toujours pendant la phase de différenciation sexuelle, l’apparition d’animaux possédant des gonades indifférenciées, se fait à une concentration plus élevée par rapport à celle nécessaire pour induire l’apparition d’ovotestis. En effet, une exposition à 30 µg/l induit, comme unique altération, l’apparition d’ovotestis (5 %)



alors qu'une exposition de 100 µg/l, induit, à la fois, l'obtention de 10 % de mâles indifférenciés et 10 % d'ovotestis (Hill et Janz, 2003). Dans ce cas, les oocytes obtenus sont des cellules résiduelles de la période femelle de ces animaux hermaphrodites. La concentration de 30 µg/l de NP, est donc suffisante pour maintenir des oocytes. Par contre, elle est insuffisante pour inhiber le développement des gonades (Hill et Janz, 2003).

### ***I. B. - 2. 3. 2. Démasculinisation des adultes matures***

Les testicules des poissons sont constitués d'un ensemble de lobules ou de tubules (selon leur forme). Ces ultrastructures sont agencées par l'association de cystes : petits sacs enfermant les cellules germinales. Ces cystes sont composés de tissu épithélial testiculaire constitué des cellules de Sertoli et des cellules germinales ainsi que de tissu interstitiel, composé des cellules de Leydig et de vaisseaux sanguins. Chez les poissons adultes, la démasculinisation peut toucher les trois niveaux d'organisation cellulaire (Annexe 17) :

↳ L'exposition à des ŒMs peut donc induire, dans les cas les plus sévères, la déstructuration des lobules/tubules, accompagnée, dans certains cas, d'une réduction de l'épaisseur de leur parois (Gimeno *et al.*, 1998b, Flammarion *et al.*, 2000) et/ou à la déstructuration des cystes qui peuvent disparaître (Gimeno *et al.*, 1998b, Kinnberg *et al.*, 2000, Zaroogian *et al.*, 2001, Islinger *et al.*, 2003, Moncaut *et al.*, 2003).

↳ L'altération de ces ultrastructures s'accompagne souvent d'une déstructuration du tissu interstitiel et/ou du tissu épithélial. Ainsi, une hypertrophisation du tissu interstitiel peut être observé chez des animaux exposés à de l'E2 (> 1 mg/kg), de l'OP (>100 mg/kg) et du o,p'-DDT (>30 mg/kg) (Folmar *et al.*, 2001, Zaroogian *et al.*, 2001, Gill *et al.*, 2002, Moncaut *et al.*, 2003). Quant au tissu épithélial, différents niveaux d'impact peuvent être observés :

- soit tout le tissu est touché avec apparition de parties atrophiées, et/ou fibrosées, emplies de vacuoles (Gimeno *et al.*, 1998b),
- soit seules les cellules de Sertoli sont touchées : leur nombre s'accroît (Flammarion *et al.*, 2000), des corps résiduels peuvent apparaître en grand nombre dans leur cytoplasme (Islinger *et al.*, 2003) ou alors elles s'hyperplasient et desquament (Christiansen *et al.*, 1998b, Kinnberg *et al.*, 2000).

✚ La spermatogenèse est également altérée chez les animaux atteints adultes. Inhibée, elle entraîne un blocage au stade de spermatogonie A et B (Gimeno *et al.*, 1998b, Gronen *et al.*, 1999, Kinnberg *et al.*, 2000, Folmar *et al.*, 2001, Le Gac *et al.*, 2001, Zaroogian *et al.*, 2001, Kang *et al.*, 2002, Moncaut *et al.*, 2003, Pawlowski *et al.*, 2004b). Par ailleurs des cellules spermatiques nécrotiques peuvent être observées (Christiansen *et al.*, 1998b, Flammarion *et al.*, 2000, Folmar *et al.*, 2001, Zaroogian *et al.*, 2001, Pawlowski *et al.*, 2004b). Celles-ci restent incrustées dans le tissu épithélial jusqu'à ce qu'elles soient phagocytées par les cellules de Sertoli (Christiansen *et al.*, 1998b). Des corps résiduels apparaissent alors dans ces cellules (Islinger *et al.*, 2003) et/ou augmentent en nombre (Flammarion *et al.*, 2000). Paradoxalement, la génistéine induit une accélération de la spermatogenèse (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001).

Toutes ces altérations sont dose-dépendantes et leur induction suppose souvent une concentration minimale qui va dépendre du toxique impliqué et surtout de l'espèce de poissons. Par exemple, avec l'E2, une dose minimale de 463 ng/l est suffisante pour induire des effets chez les médakas alors que pour les carpes, une concentration de 1 µg/l est nécessaire. Ce résultat confirme que les médakas sont plus sensibles que les carpes.

D'autre part, chez les poissons matures, les phénomènes de démasculinisation ne sont pas obligatoirement accompagnés de l'apparition d'ovotestis (Gimeno *et al.*, 1998b, Gronen *et al.*, 1999, Kang *et al.*, 2002) ou d'un oviducte (Christiansen *et al.*, 1998b, Flammarion *et al.*, 2000, Kinnberg *et al.*, 2000, Folmar *et al.*, 2001, Le Gac *et al.*, 2001, Zaroogian *et al.*, 2001, Gill *et al.*, 2002, Islinger *et al.*, 2003, Moncaut *et al.*, 2003, Pawlowski *et al.*, 2004b). Ceci peut s'expliquer par le fait que la concentration en toxique et/ou son potentiel œstrogénique sont insuffisants pour induire, en plus de la démasculinisation des testicules, leur féminisation partielle. Il semble d'ailleurs que, pour le *p,p'*-DDT, les concentrations étudiées (15, 30 et 60 mg/kg), n'induisent même pas de phénomène de démasculinisation des testicules (Zaroogian *et al.*, 2001).

De plus, les concentrations généralement trouvées dans l'environnement sont inférieures aux concentrations étudiées en E2, EE2, 4-NP, 4-OP et en pesticides capables d'induire ces perturbations (Tableaux 2, 4, 6 et 11). Par contre, si l'on considère la totalité des isomères de NPs, ces altérations pourraient éventuellement être induites dans l'environnement puisque des taux élevés ont déjà été détecté (Tableau 6).

## ***I. B. - 2. 4. Reproduction***

L'altération de la reproduction touche tout autant les mâles que les femelles, mais aussi leur capacité à s'accoupler. Ainsi, une diminution, voir l'inhibition totale de cette capacité a été observée chez des poissons tête de boule (*Pimephales promelas*) après des expositions à 10 et 100 ng/l d'EE2 (Pawlowski *et al.*, 2004b).

### ***I. B. - 2. 4. 1. Les mâles***

Chez les mâles, l'altération de la reproduction peut se traduire par la présence anormale de sperme résiduel dans le canal déférent (Folmar *et al.*, 2001, Zaroogian *et al.*, 2001), ou dans les cas les plus graves, par une absence totale de production de sperme (Moncaut *et al.*, 2003, Pedersen *et al.*, 2003). Dans d'autres cas, c'est la spermatocrite (nombre de cellules par volume de sperme) qui va être diminué (Gimeno *et al.*, 1998b, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001).

Le nombre de mâles matures au moment de la période de reproduction peut également être diminué lors d'une contamination par des ŒMs (Gimeno *et al.*, 1998b, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001). C'est, par exemple, le cas, pour des bars de mer mâles contaminés avec 5 à 10 mg/kg de E2 : le pourcentage de mâles matures passe alors de 84 % (lots de contrôles) à 57 % ou 54,5 % respectivement, pour les lots exposés (Blázquez *et al.*, 1998).

### ***I. B. - 2. 4. 2. Les femelles***

Pour les femelles, une altération du développement des ovaires a été observée par Bennetau-Pelissero *et al.* (2001) chez des truites arc-en-ciel femelles matures exposées à 500 ppm de génistéine par voie alimentaire. Trois animaux sur 19 présentaient des oocytes bloqués en phase de pré-vitellogenèse et 3 autres étaient entrés en vitellogenèse (phase pendant laquelle le vitellus ou "jaune d'œuf", réserve nutritionnelle de l'embryon, se constitue dans l'oocyte) plus tardivement que les animaux des lots de contrôles (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001).

Cependant, la majorité des altérations induites chez les femelles concernent plutôt leur capacité à frayer et à pondre avec les observations suivantes :

➡ Une diminution du nombre de femelles en frai lors d'une exposition de truites arc-en-ciel adultes à 500 ppm de génistéine (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001).

➡ Une diminution du nombre de femelles de poissons zèbres pouvant pondre diminue lorsque celles-ci sont exposées, pendant leur phase immature, à une concentration de 10 ng/l d'EE2 (Van der Belt *et al.*, 2003).

➡ Une diminution du nombre d'œufs pondus reste la perturbation la plus répandue chez les femelles (Gronen *et al.*, 1999, Werner *et al.*, 2002, Van der Belt *et al.*, 2003, Pawlowski *et al.*, 2004b). Dans les études réalisées par Van der Belt *et al.* (2003) et Pawlowski *et al.* (2004b), la concentration minimale d'exposition pour induire ce type d'altération, chez des poissons zèbres et des poissons tête de boule, a été évaluée à 10 ng/l, dans les deux cas. D'autres part, l'étude réalisée par Werner *et al.* (2003), montre que la diminution du nombre d'œufs pondus peut être proportionnelle à la concentration en toxique. Le pesticide, l'esfenvalerate, fait en effet chuter le nombre total d'œufs pondus de 103, à 71 et à 42 pendant la période d'exposition, pour des concentrations respectivement de 2, 21 et 140 mg/kg, (Werner *et al.*, 2002). Par contre, dans d'autres études, la diminution du nombre d'œufs pondus semble plutôt suivre une loi du tout ou rien. En effet, dans l'étude de Gronen *et al.* (1999), quelle que soit la concentration d'OP employée (20, 41, 74, 230 ppb) lors de l'exposition des médakas, le nombre d'œufs pondus passe de 61,6 œufs/jours chez les animaux contrôles à  $34,5 \pm 2,5$  œufs/jours chez les animaux exposés. Dans cette étude, les couples formés étaient composés de femelles saines et de mâles contaminés. Les résultats obtenus pourraient, par conséquent, être le résultat d'une diminution de la capacité, des mâles contaminés à stimuler le phénomène de ponte chez les femelles, capacité qui chuterait de manière identique chez tous les mâles contaminés (Gronen *et al.*, 1999).

#### ***I. B. - 2. 4. 3. Fertilisation des œufs***

Enfin, dans certains cas, la fertilisation des œufs peut aussi être altérée suite à la contamination des mâles (Gronen *et al.*, 1999, Kang *et al.*, 2002) ou des deux géniteurs (Pawlowski *et al.*, 2004b) par un ŒM. Ainsi, par exemple, chez les médakas mâles, le taux de

fertilisation des œufs chute quand ils sont exposés à la concentration élevée de 463 µg/l en E2 (Kang *et al.*, 2002). Cette fertilisation peut même être complètement inhibée. C'est le cas pour les poissons tête de boule matures exposés à 100 ng/l de EE2 (Pawlowski *et al.*, 2004b). Cette diminution de la fertilisation des œufs est sûrement la conséquence des altérations induites sur la capacité de reproduction des mâles (diminution de la production de sperme, etc) et/ou des femelles (diminution du nombre d'œufs pondus, etc).

### ***I. B. - 2. 5. Effets tératogènes***

Différents niveaux d'impacts sont observables chez la progéniture d'animaux contaminés. Ainsi, l'exposition des géniteurs à des ŒMs peut induire une augmentation :

- de la mortalité des œufs : avec 10 ng/l d'EE2, 500 ppm de génistéine ou avec 10 à 20 µg/l de phytœstérols de bois (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001, Hill et Janz, 2003, Nakari et Erkomaa, 2003),
- de la mortalité des larves : avec 10 µg/l de phytœstérols de soja, 20-230 ppb de 4-OP, ou 4-148 mg/kg d'esfenveralate (Gronen *et al.*, 1999, Werner *et al.*, 2002, Nakari et Erkomaa, 2003).

De plus, le processus d'éclosion des œufs peut aussi être altéré. C'est par exemple le cas chez les poissons zèbres quand la génération F0 est contaminée en présence d'une concentration supérieure à 1 ng/l d'EE2, à 10 µg/l de phytœstérols de bois, ou à 30 µg/l de 4-NP (Hill et Janz, 2003, Nakari et Erkomaa, 2003, Pawlowski *et al.*, 2004b). Une augmentation du nombre d'anomalies embryonnaires (microphthalmie bilatérale, analphtalmie unilatérale, petits jaunes d'œufs, etc) a également été observée chez la progéniture d'animaux contaminés avec 20 à 230 ppb de 4-OP (Gronen *et al.*, 1999).

Enfin, les animaux arrivés au stade de la différenciation sexuelle, peuvent subir une féminisation partielle des gonades conduisant au développement d'ovotestis (traitement subi par les géniteurs : 10 µg/l de 4-NP durant 10 j/mois pendant 4 mois, 12-776 µg/l/j de di-n-butylphtalate jusqu'à la différenciation sexuelle) (Patyna et Cooper, 2000, Schwaiger *et al.*, 2002). Paradoxalement, les phytœstostérols de bois, induisent une masculinisation de la génération F1, puis une féminisation de la génération F2 (Nakari et Erkomaa, 2003).

Dans d'autres cas, ce sont des étapes du développement comme l'acquisition de la nage qui sont perturbées (diminution suite à une exposition des géniteurs avec 1 et 10 ng/l EE2, ou 30 et 100 µg/l de 4-NP) (Hill et Janz, 2003).

A l'exception des effets induits par 0,1 et 1 ng/l de EE2 sur l'éclosion et l'acquisition de la nage, chez des poissons zèbres, les concentrations induisant des effets tératogènes sont supérieures à celles présentes dans l'environnement (Tableaux 2, 4-11).

## ***I. B. - 2. 6. Effets sur d'autres organes***

### ***I. B. - 2. 6. 1. Anomalies observées***

Des anomalies peuvent aussi apparaître dans d'autres organes, tels que les reins, la rate et le foie, suite à une exposition à certains ŒMs (Schwaiger *et al.*, 2000, Folmar *et al.*, 2001, Islinger *et al.*, 2003, Pawlowski *et al.*, 2004b) :

✚ Les lésions des reins consistent en hémorragies apparaissant entre les tubules, les espaces de Bowman et le tissu interstitiel. L'épithélium tubulaire est également souvent atteint : des hypertrophies ou des dégénérescences et des nécroses peuvent apparaître. De plus, l'accumulation d'une substance éosinophile peut être observable dans les tubules rénaux et dans les sinusoides au niveau de la tête du rein.

✚ Dans la rate, des hémorragies ainsi qu'une prolifération massive et une hypertrophie des cellules réticuloendothéliales peuvent apparaître. Par ailleurs, ces cellules présentent des phagocytes contenant aussi du matériel éosinophile.

✚ Les altérations du foie se caractérisent par une hypertrophie des hépatocytes avec une augmentation du volume des noyaux et de la surface du réticulum endoplasmique rugueux, accompagnée d'une réduction significative des dépôts de glycogène. Ces anomalies traduisent une augmentation de la synthèse protéique dans cet organe. De plus, du matériel éosinophile peut apparaître dans le cytoplasme de ces cellules.

### ***I. B. - 2. 6. 2. Cause de ces anomalies***

Ces altérations sont la conséquence de la production anormale de vitellogénine chez les mâles contaminés par des CEMs. Cette protéine est le précurseur des composants du vitellus ou “jaune d’œuf”, spécifique des femelles ovipares. Après sa synthèse hépatique, la VTG est transportée jusqu’aux ovaires où elle est incorporée par les oocytes.

Chez les mâles contaminés, faute d’oocytes, elle s’accumule dans les reins, la rate et le foie (matériel éosinophile visualisé dans ces organes). Ce sur-stockage imprévu va alors induire les dommages observés dans ces différents organes, voir dans les cas les plus grave, la mort de l’animal. Ainsi, dans l’étude de Folmar *et al.* (2001), les dommages provoqués dans les reins par deux injections de 10 mg/kg d’E2 expliquant la mort de 5 carrelets sur 12 (Folmar *et al.*, 2001).

## ***I. C. La vitellogénine : Biomarqueur d'exposition***

La détection d'une pollution peut se faire par des méthodes physico-chimiques et/ou par des méthodes biologiques.

Dans le cas des CEMs, les méthodes physico-chimiques employées pour détecter chaque substance sont différentes, complexes et coûteuses (traitement de l'échantillon, extraction, technique d'analyse...) (Font *et al.*, 1996, Ingelse *et al.*, 2001, Lambropoulou et Albanis, 2001, Dias *et al.*, 2002, Inoue *et al.*, 2002, Brossa *et al.*, 2003, Kawaguchi *et al.*, 2004, Laganà *et al.*, 2004, Verweij *et al.*, 2004). (SPE, Solid Phase Extraction ; SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction ; LC-MS-MS, Liquid Chromatography coupled with tandem Mass Spectrophotometry ; GC-MS, Gas Chromatography coupled with Mass Spectrophotometry ; HPLC, High Performance Liquid Chromatography ...). De plus, elles ne permettent pas, à elles seules, d'évaluer les risques. En effet, ces méthodes quantifient les polluants présents dans les différentes matrices telles que l'eau, les sédiments, les sols et les tissus mais ne donnent pas d'information sur les éventuels effets de ces polluants sur les organismes.

L'utilisation d'un biomarqueur va permettre d'appréhender les effets perturbateurs d'un ou d'une famille de polluants. En effet, un biomarqueur est un changement biologique (de type moléculaire, cellulaire et/ou physiologique) lié à l'exposition ou aux effets dus à ce polluant (Peakell, 1994). Par conséquent, les résultats obtenus vont intégrer tous les paramètres influençant l'action du toxique sur l'organisme touché (biodisponibilité du polluant, capacité de pénétration dans l'organisme, potentiel œstrogénique du toxique, sensibilité de l'animal, etc). Par ailleurs, l'existence d'un biomarqueur d'exposition commun à tous les CEMs rendrait son utilisation d'autant plus avantageuse. La production anormale de VTG par les poissons, mâle ou immature est un biomarqueur répondant à l'ensemble de ces caractéristiques (Arukwe et Goksoyr, 1998, Schwaiger et Negele, 1998, Kime *et al.*, 1999).



## ***I. C. - 1. La vitellogénine***

### ***I. C. - 1. 1. Vitellogenèse***

Les poissons téléostéens sont des animaux ovipares. Leurs embryons se développent dans des œufs qui sont libérés dans l'eau. Ils ne possèdent donc pas de lien avec la mère, entre autres nutritifs, et doivent alors vivre de leurs réserves. Cette réserve est dénommée vitellus ou “jaune d'œuf”. Elle est constituée pendant la phase de vitellogenèse. Six phases composent le développement des oocytes (Tyler et Sumpter, 1996) :

- L'oogenèse : Passage du stade oogonies à oocyte I après la première division méiotique.
- La croissance de l'oocyte primaire : Cette étape se caractérise par une intense synthèse d'ARNm, par l'apparition des corps de Balbiani ainsi que le développement, autour de l'oocyte, de deux enveloppes appelées enveloppe vitelline et zona radiata. A la fin de cette étape, les oocytes dans la phase folliculaire pendant laquelle les couches cellulaires dénommées granulosa et thèque se forment autour de la zona radiata.
- L'étape de cortical alvéoli : Cette étape se caractérise par la formation de cortical alvéoli. Ces structures sont composées de polysialoglycoprotéines. A la fin de cette phase, la totalité du cytoplasme de l'oocyte I est rempli de ces structures. Puis peu de temps avant le début de la vitellogenèse, ces structures migrent vers la périphérie de l'oocyte et au moment de la fertilisation, elles sont libérées dans l'espace péri-vitellin.
- La vitellogenèse : Au cours de cette étape, des protéines extra-ovariennes sont incorporées, modifiées et stockées dans des vésicules germinales qui constituent le vitellus. La vitellogénine (VTG) est la protéine précurseur de la majorité des protéines entrant dans la composition du vitellus (Yaron, 1995, Tyler et Sumpter, 1996).
- La maturation : les événements essentiels composant cette étape sont l'éclatement des vésicules germinales qui indiquent l'arrêt de l'accumulation de VTG et l'hydratation des œufs chez certaines espèces de poissons marins comme le bar de mer (*Dicentrarchus labrax*).
- L'ovulation.

### ***I. C. - 1. 2. Nature de la vitellogénine***

La VTG est une phospholipoglycoprotéine constituée, pour les poissons téléostéens, de 20 % de lipides (triglycérides et cholestérol) et de 0,6 % de phosphate, (Tao *et al.*, 1993, Yaron, 1995, Roubal *et al.*, 1997, Heppell et Sullivan, 1999). Elle contient, également un ou plusieurs atomes de calcium selon l'espèce considérée (Yeo et Mugiya, 1997). A l'état natif, la VTG est une protéine dimérique. Selon les espèces, la masse moléculaire du dimère varie entre 340 et 510 kDa, et la masse moléculaire du monomère dénaturé et dépourvu de lipides varie de 130 à 180 kDa (Tyler et Sumpter, 1990a, Tao *et al.*, 1993, Mañanós *et al.*, 1994b, Roubal *et al.*, 1997, Heppell et Sullivan, 1999, Johnsen *et al.*, 1999). Le dimère est stabilisé par des ponts dissulfures. Quant au monomère, il possède également des ponts dissulfures intra-chaîne (Brion *et al.*, 2000).

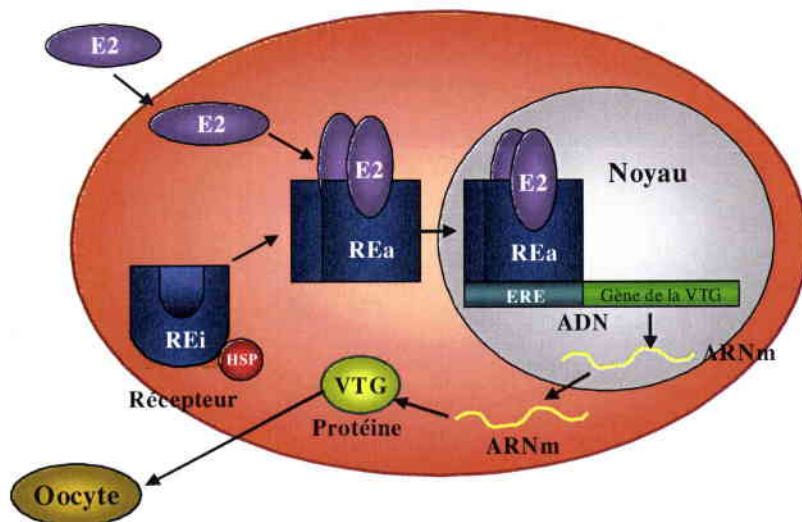
Selon les espèces, jusqu'à deux molécules de VTG différentes peuvent être produites. Ces deux molécules peuvent être synthétisées à partir du même gène ou de deux gènes différents (Bowman *et al.*, 2000). Dans la majorité des cas, le deuxième gène est issu d'une réplication du premier et résulterait d'une adaptation apparue au cours de l'évolution de l'espèce. Leur composition en acides aminés diffère donc peu même lorsque les deux molécules sont issues de deux gènes. Dans le cas des protéines issues d'un seul gène, la différence peut être due à une transcription du gène dissemblable ou à des transformations post-transcriptionnelles distinctes.

### ***I. C. - 1. 3. Synthèse de la vitellogénine***

La VTG est synthétisée dans le foie par les hépatocytes chez les femelles matures des vertébrés ovipares, y compris chez les poissons téléostéens (Schwaiger et Negele, 1998). Cette synthèse peut-être stimulée par différentes substances endogènes : les œstrogènes et plus précisément le 17 $\beta$ -œstradiol (E2), qui sont les inducteurs majoritaires, ainsi que la prolactine ou encore la GH (Growth Hormone pour hormone de croissance) (Fukada *et al.*, 2000).

Après sa synthèse dans les ovaires, l'E2 est sécrété dans la circulation sanguine, puis est transportée jusqu'au foie. Cette hormone étant lipophile, elle traverse par diffusion simple la membrane plasmique des hépatocytes. Dans le cytoplasme de ces cellules, l'E2 se lie à un récepteur cytoplasmique spécifique RE (Récepteur aux œstrogènes). Cette interaction induit, dans un premier temps, la libération des protéines de chocs thermiques, les HSP (Heat Shock

Protein), qui maintenaient le récepteur sous sa forme inactive (REi). Puis, elle provoque la dimérisation du récepteur (Rollerová et Urbanciková, 1999). Le complexe récepteur-hormone ainsi activé migre vers le noyau où il pénètre en passant par les nombreux pores nucléaires. Ce complexe interagit alors avec des séquences promotrices spécifiques de l'ADN : les ERE (Eléments de Réponses aux Œstrogènes). Cette liaison induit une modification de la structure conformationnelle de l'ADN et provoque l'activation de la transcription du gène de la VTG (Figure 3) (Pakdel *et al.*, 1991, Arukwe et Goksoyr, 1998).



**Figure 3 :** Stimulation de la synthèse de la vitellogénine (VTG) par le 17 $\beta$ -œstradiol (E2), dans un hépatocyte femelle. REa et REi : Récepteur aux œstrogènes actif et inactif ; ERE : Elément de réponse aux œstrogènes ; HSP : Protéine chaperon (ou Heat Shock Protein) (Pakdel *et al.*, 1991, Arukwe et Goksoyr, 1998).

#### ***I. C. - 1. 4. Le récepteur aux œstrogènes***

Deux formes de récepteurs spécifiques des œstrogènes ont été identifiées chez plusieurs vertébrés dénommés RE (Walter *et al.*, 1985) et RE (Kuiper *et al.*, 1996, Mosselman *et al.*, 1996, Tremblay *et al.*, 1997). Chez les poissons téléostéens, ces deux formes seraient également présentes (Tchoudakova *et al.*, 1999, Xia *et al.*, 1999, Bowman *et al.*, 2002), récemment une troisième forme a été découverte chez les craokers de l'atlantique : le RE (Hawkins *et al.*, 2000).

La structure des récepteurs REs semble être identique chez tous les vertébrés, elle comprend les domaines suivants :

- Domaine A/B : partie N-terminale variable,
- Domaine C, zone de liaison avec l'ADN : région centrale hautement conservée,
- Domaine E, zone de liaison avec le ligand : région moyennement conservée,
- Domaine F : petite partie C-terminale très peu conservée.

La différence entre les domaines E des récepteurs REs peut expliquer en partie le fait que l'affinité de chaque récepteur pour les œstrogènes ( $K_d$ ) diffère d'une espèce de poisson à l'autre (Tableau 12). Quant à la capacité de liaison spécifique ( $B_{max}$ ), qui traduit le nombre maximal de sites de liaison disponible, elle est également différente entre chaque espèce.

Tableau 12 : Constante de dissociation ( $K_d$ ) et capacité de liaison spécifique ( $B_{max}$ ) des récepteurs cytosoliques hépatiques femelles spécifiques des œstrogènes (Andreassen et Korsgaard, 2000) [1], (Kloas *et al.*, 2000) [2], (Latonnelle *et al.*, 2002a) [3] et (Tollesfen *et al.*, 2002) [4].

| Espèce                                          | $K_d$ (nM)                | $B_{max}$ (fmol/mg)       | Référence |
|-------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| Anguille ( <i>Zoarces viviparus</i> )           | : 1,1<br>(pmol/g de foie) | : 2,9<br>(pmol/g de foie) | [1]       |
| Carpe                                           | : 2,1                     | : 29,9                    | [2]       |
| Esturgeon de Sibérie ( <i>Acipenser baeri</i> ) | 7,9                       | 0,029 nM                  | [3]       |
| Saumon ( <i>Salmo salar</i> )                   | : 3,1                     | : 72,2                    | [4]       |
| Truite arc-en-ciel                              | : 4,4                     | : 96,6                    | [4]       |
|                                                 | 1,3                       | 0,11 nM                   | [3]       |

La synthèse des REs est autorégulée par les œstrogènes. L'induction de la synthèse des REs, est identique à celle de la VTG. Un niveau basal de REs dans le cytoplasme des hépatocytes de poissons femelles permet la fixation des premières molécules d'œstradiol (Pakdel *et al.*, 1991, Bowman *et al.*, 2002). La cascade de réaction aboutit à la production d'autres REs qui fixeront, à leur tour, d'autres molécules d'œstrogènes (Flouriot *et al.*, 1996).

Cette activation du gène des REs est antérieure à celle de la VTG. Selon les espèces, le décalage, entre le niveau maximum de transcription des deux gènes, peut varier entre 36 et 42 h pour les bars " largemouss " (*Micropterus salmoides*) (Bowman *et al.*, 2002) et 12 jours pour les truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Pakdel *et al.*, 1991). L'activation précoce de la transcription du gène des REs serait due à son affinité plus élevée vis-à-vis de l'œstradiol que

celle du gène de la VTG (Flouriot *et al.*, 1996, Bowman *et al.*, 2002). Ainsi, une étude réalisée sur des cultures d'hépatocytes de truite arc-en-ciel montre que la transcription du gène des REs requiert une concentration en E2 inférieure à 0,5 nM alors que la concentration minimale pour induire la transcription du gène de la VTG est de 1 nM (Flouriot *et al.*, 1996). En outre, le passage de la transcription du gène des REs à celui de la VTG est dû au fait que le gène des REs sature plus rapidement. Ainsi, après la saturation du gène du RE, c'est le gène de la VTG qui est activé (Flouriot *et al.*, 1996, Bowman *et al.*, 2002).

D'autres part, l'œstradiol agit sur la stabilité de l'ARNm des REs. Cet effet stabilisateur est également valable pour l'ARNm de la VTG : en présence de E2, les demi-vies des ARNm du RE et de la VTG sont de 14 et 29 h ; en absence de E2 (depuis 36 h), ces demi-vies sont réduites à 4 et 10 h, respectivement (Flouriot *et al.*, 1996).

### ***I. C. - 1. 5. Régulation hormonale de la synthèse de VTG***

La production des œstrogènes est également régulée hormonalement chez les poissons par une gonadotrophine, la GtH I (Gonadotrophin Hormone I). Cette hormone est l'analogue de la FSH (Follicule Stimulating Hormone) présente chez les autres vertébrés (Tyler et Sumpter, 1996). Comme la FSH, elle est produite au niveau de l'hypophyse en réponse à une stimulation hormonale hypothalamique *via* la GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) (Arukwe et Goksoyr, 1998, Schwaiger et Negele, 1998), elle a pour rôle de stimuler la croissance des oocytes. Après synthèse, la GtH I est sécrétée dans la circulation sanguine jusqu'aux ovaires. Chez la majorité des poissons téléostéens tels que la truite arc-en-ciel, cette hormone agit à la fois sur les cellules de la thèque et sur les cellules de la granulosa recouvrant les oocytes, *via* des récepteurs situés sur la membrane plasmique de ces cellules. En fait, la GtH I induit la production de testostérone par les cellules de la thèque. La testostérone diffuse dans les cellules de la granulosa où elle est transformée en œstradiol par l'aromatase, cette enzyme étant préalablement activée par la GtH I (Yaron, 1995, Galas *et al.*, 1999). Chez la carpe, cette cascade de réaction, aboutissant à la production de l'œstradiol, a lieu dans le même type de cellules : les cellules folliculaires. En effet, chez cette espèce de poisson, les cellules folliculaires ne se différencient pas en thèque et en granulosa comme dans le cas des truites ou des autres

vertébrés (Galas *et al.*, 1999). Par ailleurs, les cellules folliculaires possédant toutes l'aromatase, la testostérone est transformée *in situ* en œstradiol (Epler *et al.*, 1997).

La GtH I agit également sur la VTG induisant son incorporation dans les oocytes (Kime *et al.*, 1999), jusqu'à l'obtention d'une taille critique, spécifique de l'espèce (Reis-Henriques *et al.*, 2000). Ce processus est déclenché par la VTG, elle-même. En effet, à partir d'une concentration précise de VTG stockée dans les oocytes, l'aromatase impliquée dans la production de l'œstradiol est inhibée (Reis-Henriques *et al.*, 2000) induisant la décroissance du taux d'œstradiol au profit de la testostérone, et donc la diminution de la synthèse hépatique de VTG (Kime *et al.*, 1999).

### ***I. C. - 1. 6. Devenir de la VTG***

Après synthèse dans le foie, la VTG est sécrétée dans la circulation sanguine et transportée jusqu'aux ovaires. Dans ces organes, elle est captée, par les oocytes, par pinocytose après fixation sur des récepteurs membranaires spécifiques de la VTG (Mañanós *et al.*, 1997). La VTG y est alors clivée en deux types de protéines (Tyler et Sumpter, 1996) :

- des lipoprotéines : les lipovitellines I et II,
- des phosphoprotéines : la phosvitine et les phosvettes.

Ces différentes protéines entrent dans la composition du vitellus ou “ jaune d'œuf ”, celui-ci sert de réserve nutritionnelle au cours du développement de l'embryon (réserve d'acides aminés, de lipides, de calcium et source d'énergie) (Tyler et Sumpter, 1996).

### ***I. C. - 2. Biomarqueur des œstrogènes mimétiques***

La VTG peut être utilisée comme biomarqueur des ŒMs car la contamination de poissons mâles ou immatures par ces toxiques, va en induire une production anormale (Arukwe et Goksoyr, 1998, Schwaiger et Negele, 1998, Kime *et al.*, 1999). Les mâles et les jeunes immatures possèdent le gène de la VTG, mais ils ne produisent pas suffisamment d'œstrogènes pour stimuler sa transcription (Kime *et al.*, 1999).

Les ŒMs peuvent se lier aux récepteurs spécifiques de œstrogènes (REs), et ainsi induire les cascades de réactions contrôlées par les complexes E-RE comme celles qui aboutissent à la synthèse de la VTG.

La production anormale de VTG par les poissons mâles et les jeunes immatures des deux sexes implique donc que ces animaux possèdent des récepteurs REs. Plusieurs études ont démontré la présence d'un taux basal de REs dans le cytosol des hépatocytes de poissons mâles (Tableau 13) (Kloas *et al.*, 2000, Tollesfen *et al.*, 2002). Les valeurs des constantes de dissociation ( $K_d$ ) et des capacités de liaison spécifique ( $B_{max}$ ), des récepteurs REs de mâles, indiquent que l'affinité de ces récepteurs est deux fois inférieure à celle des REs de femelles. Cette différence est due au taux basal d'œstrogènes qui est plus élevé chez les femelles (Tollesfen *et al.*, 2002). En présence d'ŒMs, les valeurs de  $K_d$  et de  $B_{max}$  des REs de mâles augmentent pour atteindre des valeurs 3 fois supérieures à celles des femelles (Andreassen et Korsgaard, 2000) traduisant la stimulation de la synthèse des REs et l'augmentation de leur activité chez les mâles contaminés.

Tableau 13 : Constante de dissociation ( $K_d$ ) et capacité de liaison spécifique ( $B_{max}$ ) des récepteurs cytosoliques hépatiques mâles spécifiques des œstrogènes (Andreassen et Korsgaard, 2000) [1], (Kloas *et al.*, 2000) [2] et (Tollesfen *et al.*, 2002) [3].

| Espèce            | $K_d$ (nM)                    | $B_{max}$ (fmol/mg)          | Référence |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------|
| Anguille vivipare | : 0,6 (pmol/g de foie)        | : 1,7 (pmol/g de foie)       | [1]       |
|                   | traité : 3,1 (pmol/g de foie) | traité : 10 (pmol/g de foie) |           |
| Carpe             | : 1,4                         | : 18,9                       | [2]       |
| Saumon            | : 2,8                         | : 27,4                       | [3]       |
| Truite            | : 2,5                         | : 50,3                       | [3]       |

***I. C. - 2. 1. Affinité des récepteurs REs pour les ŒMs***

Malgré leurs structures chimiques très différentes, les ŒMs possèdent, pour la plupart, la capacité de se lier aux récepteurs REs. L'affinité de chaque ŒM peut être mesurée par l'aptitude du toxique à déplacer la liaison œstradiol-récepteur. Ainsi, par exemple, l'affinité de la génistéine pour le RE d'esturgeon ( $IC_{50}$ =220 nM) est deux fois supérieure à celle pour le RE de truite ( $IC_{50}$ =570 nM) (Latonnelle *et al.*, 2002a). Par ailleurs, chaque toxique possède une affinité

propre pour chacun des REs. D'après les résultats repris sur 4 études effectuées sur 5 espèces de poissons, dont 4 ovipares et une espèce vivipare (Annexe 18) (Andreassen et Korsgaard, 2000, Kloas *et al.*, 2000, Latonnelle *et al.*, 2002a, Tollesfen *et al.*, 2002), l'affinité des ŒMs peuvent être classés, pour chaque RE, de la manière suivante :

- RE de la carpe : E2 > E1 >> BPA > 4-OP > TCB > DEP > 4-NP >> *p,p'*-DDT (Kloas *et al.*, 2000),
- RE du saumon et de la truite : E2 > EE2 > E1 > Gen, Zon >> 4-OP, *o,p'*-DDT, 4-NP (Tollesfen *et al.*, 2002),
- RE de la truite : E2 > Form > Gen >> Equol > Diad > Bio A (Latonnelle *et al.*, 2002a),
- RE de l'esturgeon : E2 > Gen > Form >> Equol > Diad > Bio A (Latonnelle *et al.*, 2002a),
- RE de l'anguille vivipare : E2 > p-NP, 4-OP (Andreassen et Korsgaard, 2000).

De ces résultats se dégage, le fait, qu'il existe deux types d'ŒMs : à forte et à faible affinité. Les ŒMs à forte affinité regroupent des analogues stéroïdiens, naturels ou de synthèse : E1, EE2, quelques phytoestrogènes (génistéine, formonométine) et des mycoestrogènes (zéaralénone). Quant aux ŒMs à faible affinité, ils regroupent quelques phytoestrogènes (équol, diadzéine et biochanine A) et certaines substances anthropiques : les alkylphénols, le bisphénol A, certains phtalates (diéthylphtalate), certains PCBs (3, 3', 4, 4' trichlorobiphényle) et quelques pesticides (*p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT).

L'affinité des ŒMs pour un RE, donne donc une idée de leurs potentiels œstrogéniques. Mais elle ne reflétera pas, à elle seule, la situation dans l'organisme entier. En effet, des facteurs toxicocinétiques comme la bioaccumulation et le métabolisme peuvent également influencer sur le potentiel œstrogénique. Par exemple, la métabolisation d'une substance peut considérablement diminuer son potentiel œstrogénique. C'est le cas pour la formonométine qui, injectée à des esturgeons immatures, n'induit aucun effet (Latonnelle *et al.*, 2002b). Pourtant, elle présente une affinité élevée pour le RE d'esturgeon (Latonnelle *et al.*, 2002a) et est capable d'induire la synthèse de VTG *in vitro*. Inversement, dans le cas de la génistéine, son affinité pour le RE n'explique pas son potentiel œstrogénique élevé chez l'esturgeon. En effet, son affinité pour le RE d'esturgeon n'est que deux fois supérieure à son affinité pour le RE de truite arc-en-ciel. Pourtant, *in vivo*, le potentiel œstrogénique de la génistéine chez l'esturgeon est 50 fois supérieur à celui observé chez la truite arc-en-ciel (Latonnelle *et al.*, 2002a).



Par conséquent, tous les tests de screening, comme par exemple le yeast receptor assay (Folmar *et al.*, 2002, Cargouët *et al.*, 2004, Pawlowski *et al.*, 2004a) évaluant le potentiel œstrogénique d’une substance *via* son affinité pour un type de RE (humain ou d’une espèce de poisson spécifiquement), ne traduiront pas forcément la réalité du problème dans l’environnement (Kloas *et al.*, 2000, Folmar *et al.*, 2002).

I. C. - 2. 2. Transcription des gènes du RE et de la VTG

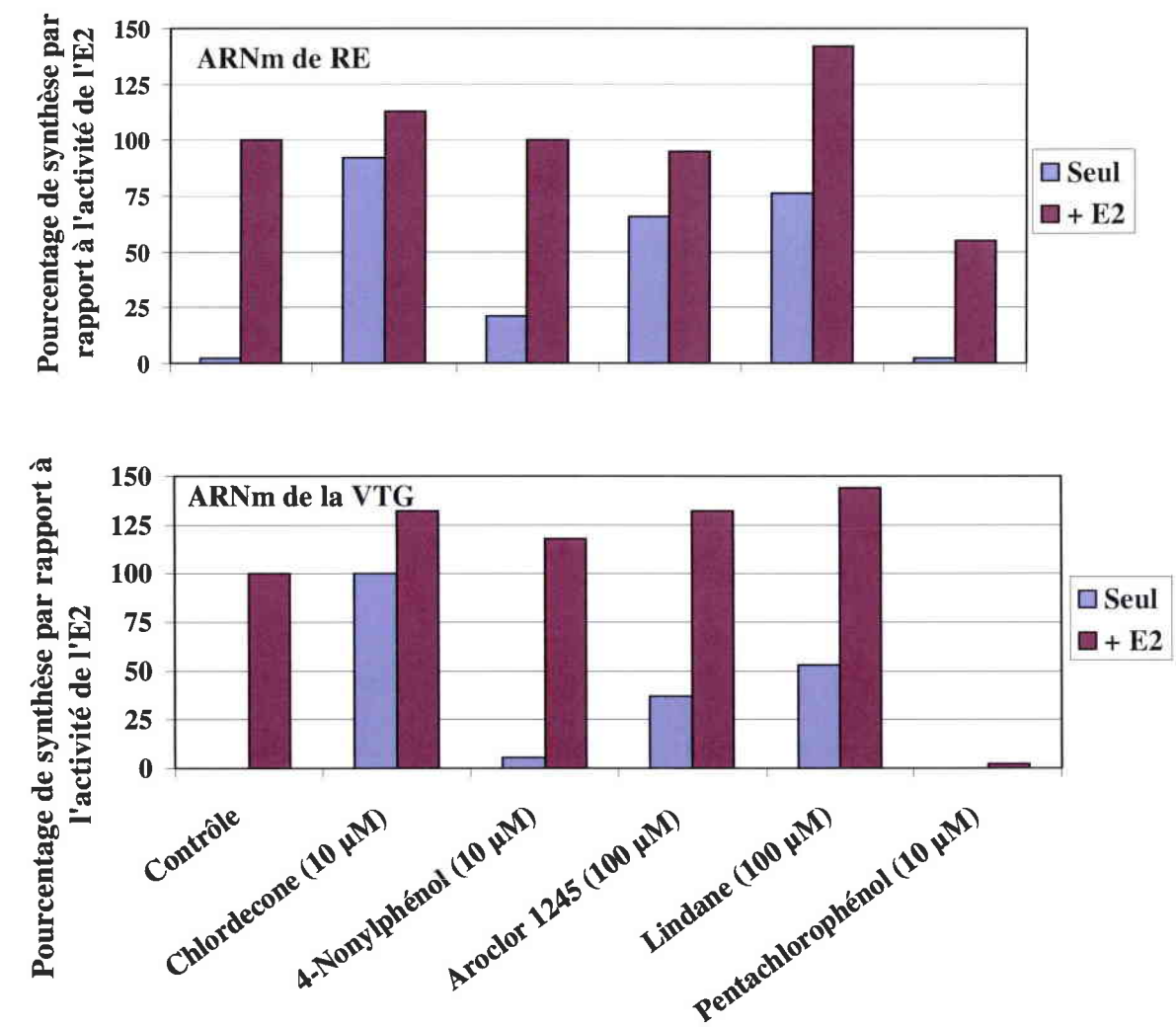


Figure 4 : Activation de la transcription des gènes du RE et de la VTG de truite arc-en-ciel. Les hépatocytes ont été traités pendant 24 h avec 1 µM de E2 en présence ou en absence d’œsMs (Flouriot *et al.*, 1995).

La liaison des ŒMs avec les récepteurs REs, induit leur activation de la même manière que les œstrogènes. Cette activation aboutit à la transcription du gène des REs puis, plus tard, à celui de la VTG.

Ainsi d'après l'étude de Flouriot *et al.* (1995), les pesticides comme le Chlordécone, le Lindane, mais aussi le 4-nonylphénol (4-NP) et le mélange de PCBs (Aroclor 1245) activent tous la transcription des gènes du RE et de la VTG chez des hépatocytes de truite arc-en-ciel, contrairement au pentachlorophénol (Figure 4) (Flouriot *et al.*, 1995). Ce composé est un antagoniste du récepteur RE.

D'autre part, cette étude montre que le Chlordecone est l'ŒM qui a le plus fort potentiel œstrogénique, celui-ci étant équivalent à celui de l'œstradiol. Au contraire, le 4-NP est l'ŒM qui a le plus faible potentiel œstrogénique : la concentration de 4-NP testée (10  $\mu$ M) induit une de synthèse d'ARNm de VTG correspondant à peine à 5 % de celle induite par 1  $\mu$ M de E2 (Figure 4) (Flouriot *et al.*, 1995).

Par ailleurs, le décalage entre la transcription des ARNm du RE et de la VTG diffère selon l'ŒM concerné. Pour l'E2 et le Chlordécone, les temps de latence sont de 1-2 h pour l'ARNm du RE et de 3-4 h pour la VTG. En ce qui concerne l'Aroclor et le Lindane, les temps de latence sont plus élevés : 5-6 h pour le RE et 10-14 h pour la VTG. De plus, ces deux substances ne sont pas capables de déplacer la liaison entre l'E2 et le RE. Ceci indique donc que ce ne sont pas ces molécules qui activent directement le RE mais plutôt leurs métabolites. Quant au nonylphénol, son action sur l'induction de la synthèse des ARNm, s'effectue sur une période plus courte. Le maximum de synthèse est atteint en 5 h contre 12 h pour l'E2 et le Chlordécone et 20-25 h pour l'Aroclor et le Lindane. De plus, son action diminue également très rapidement. Ceci serait dû à son élimination ou à sa métabolisation rapide (Flouriot *et al.*, 1995).

### ***I. C. - 2. 3. Induction de la synthèse de VTG***

Plusieurs études réalisées sur diverses espèces piscicoles ovipares confirment que la production anormale de VTG par les mâles et les jeunes immatures, est le biomarqueur commun à tous les ŒMs (Annexes 6). Les quantités de VTG produites sont proportionnelles à la concentration en toxique (Gimeno *et al.*, 1998a, Gimeno *et al.*, 1998b, Routledge *et al.*, 1998,

Arukwe *et al.*, 2000, Kinnberg *et al.*, 2000, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001, Le Gac *et al.*, 2001, Madsen *et al.*, 2002, Tilton *et al.*, 2002, Van der Belt *et al.*, 2003, Pawlowski *et al.*, 2004b) et à la durée d'exposition (Le Gac *et al.*, 2001, Madsen *et al.*, 2002, Pedersen *et al.*, 2003). Cette stimulation anormale de la production de VTG est réversible. En effet, les quantités de VTG produites diminuent après l'arrêt de la contamination : soit après métabolisation et/ou élimination du contaminant (Folmar *et al.*, 2001, Andersen *et al.*, 2003), soit après éloignement de la zone polluée (Okoumassoun *et al.*, 2002). Une action synergique des différents ŒMs se répercute aussi sur la production anormale de VTG (Routledge *et al.*, 1998, Arukwe *et al.*, 2000).

La détection de la VTG plasmatique chez les poissons pêchés après le rejet des STEP's dans les eaux de surface traduit donc le potentiel œstrogénique des effluents traités (Harries *et al.*, 1999, Larsson *et al.*, 1999, Tilton *et al.*, 2002, Todorov *et al.*, 2002, Hemming *et al.*, 2004). L'étude des poissons, en aval, permet aussi d'étudier la dispersion de la contamination dans les eaux de surface (Flammarion *et al.*, 2000, Hashimoto *et al.*, 2000, Fawell *et al.*, 2001, Okoumassoun *et al.*, 2002, Vethaak *et al.*, 2002, Hemming *et al.*, 2004). Cette détection permet également d'anticiper les problèmes pathologiques ŒMs dépendants. En effet, la production anormale de VTG apparaît pour des concentrations plus faibles d'ŒMs que celles induisant les pathologies (Christiansen *et al.*, 1998b, Gimeno *et al.*, 1998a, Gimeno *et al.*, 1998b, Hashimoto *et al.*, 2000, Kinnberg *et al.*, 2000, Bennetau-Pelissero *et al.*, 2001, Folmar *et al.*, 2001, Le Gac *et al.*, 2001, Ackermann *et al.*, 2002, Villeneuve *et al.*, 2002, Andersen *et al.*, 2003, Van der Belt *et al.*, 2003, Pawlowski *et al.*, 2004b). Par exemple, chez les poissons tête de boule contaminés avec de l'EE2, l'inhibition de la spermatogenèse apparaît au-delà de 10 ng/l alors que la production de VTG est stimulée dès 1 ng/l et devient significative à partir de 3 ng/l (Pawlowski *et al.*, 2004b).

## ***I. D. Détection de la production anormale de VTG***

Différentes méthodes de dosage de la VTG ont été développées ces dernières années pour détecter et quantifier la production anormale de VTG chez les mâles et les jeunes immatures pour diverses espèces piscicoles. Ces méthodes peuvent être classées en deux catégories : les méthodes indirectes et les méthodes directes (Schwaiger et Negele, 1998).

### ***I. D. - 1. Dosages indirects***

Le dosage de la VTG par les méthodes indirectes, repose sur le dosage d'éléments entrant dans sa composition comme le calcium (Tyler et Sumpter, 1990b) ou les groupements phosphates (Gagné et Blaise, 1998, Gagné *et al.*, 1999, Heppell et Sullivan, 1999, Gagné et Blaise, 2000).

L'inconvénient majeur de ces méthodes est qu'elles intègrent plusieurs facteurs autres que la production de VTG. De plus, pour certaines espèces de poissons, le seuil limite de détection est élevé. Par exemple, le dosage de calcium présente une corrélation avec la production de VTG seulement quand celle-ci est supérieure à 1 mg/ml. Or, dans le cas des carpes *Cyprinus carpio*, cette concentration de VTG est la concentration plasmatique maximale obtenue chez les femelles matures en pleine période de vitellogenèse (Tyler *et al.*, 1996). Cette méthode d'évaluation de la production de VTG ne peut donc pas être employée pour cette espèce.

### ***I. D. - 2. Dosages directs***

Les techniques utilisées dans les méthodes directes sont basées soit sur les caractéristiques propres de la VTG, comme son poids moléculaire, soit en révélant sa présence ou sa synthèse à l'aide de moyens immunologiques ou de biologie moléculaire.

## ***I. D. - 2. 1. Méthodes électrophorétiques***

Les molécules de VTG de chaque espèce de poissons sont caractérisées par leur poids moléculaire (monomères et dimères). Ces caractéristiques peuvent être utilisées pour les détecter dans des échantillons plasmatiques par des techniques électrophorétiques de type SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Le SDS est un agent dénaturant. Les concentrations protéiques des bandes de VTG, obtenues après la migration, sont alors estimées par densitométrie (Allner *et al.*, 1999).

Cette technique ne requiert que 1 µl de plasma. Ce qui permet l'étude des espèces de poisson de petites tailles ou des jeunes immatures. La limite de détection est de 1 ng de protéine. Cependant, le nombre d'échantillons pouvant être analysés est limité (Allner *et al.*, 1999).

Certaines études associent cette technique électrophorétique avec une technique de Western blot (Schmieder *et al.*, 2000). Après la migration des protéines dans le gel, celles-ci sont transférées sur une membrane de manière à les rendre accessibles aux Acs anti-VTG. La concentration protéique de la VTG est, également, estimée par densitométrie. Cette technique permet d'identifier sans équivoque la VTG, mais du fait de la perte de protéines inhérente au transfert des protéines, les concentrations estimées ne représenteront pas exactement la réalité.

## ***I. D. - 2. 2. Méthodes immunologiques***

### ***I. D. - 2. 2. 1. Principe général***

Les méthodes immunologiques utilisent la liaison spécifique qui existe entre un anticorps (Ac) et son antigène (Ag).

Les Ac sont des molécules produites par le système immunitaire en réponse à une agression extérieure : ils sont synthétisés lors de la réponse humorale par des lymphocytes B après que ces derniers aient été activés par l'Ag. Le premier rôle des Acs est de se lier aux Ags étrangers pour les neutraliser ou les présenter aux cellules phagocytaires qui les détruiront ensuite par opsonisation. Ils peuvent également activer le système du complément pour qu'il neutralise les Ags (Roitt *et al.*, 1997). Cinq classes d'Acs (ou immunoglobulines - Ig) existent :

Immunoglobulines de type A, D, E, G et M. Ils diffèrent à la fois par leur rôle physiologique et par leur structure.

Pour détecter la présence d'une protéine dans un liquide physiologique, un Ac spécifique est indispensable. Les Acs les plus utilisés sont les IgGs, les Acs de la réponse humorale secondaire hautement spécifique. Selon leur mode de production, deux types d'Acs sont disponibles : les anticorps polyclonaux (Acp) ou les anticorps monoclonaux (Acm).

### ***Anticorps polyclonaux***

Les premiers Acs anti-VTG produits ont été des Acs polyclonaux spécifiques de la VTG de carpe, de truite commune, de gag (*Myxeroperca microlepis*), de sole anglaise, de gobie, de poisson zèbre, de poisson tête de boule et d'omble de l'arctique (*Salvelinus alpinus*). Jusqu'à ce jour, tous ces Acps ont été obtenus en immunisant des lapins, avec des solutions plus ou moins purifiées de VTG, selon des protocoles spécifiques à chaque laboratoire (Tyler et Sumpter, 1990b, Mañanós *et al.*, 1994a, Lomax *et al.*, 1998, Heppell et Sullivan, 1999, Johnsen *et al.*, 1999, Fenske *et al.*, 2001). Après l'étape d'immunisation, le sang de l'animal est régulièrement prélevé. L'antisérum obtenu est alors utilisé soit tel quel (Lomax *et al.*, 1998, Heppell et Sullivan, 1999, Johnsen *et al.*, 1999, Sherry *et al.*, 1999, Fenske *et al.*, 2001), soit après purification des Acps (Tyler *et al.*, 1999, Mylchreest *et al.*, 2003, Ohkubo *et al.*, 2003).

L'avantage principal de ces Acps est dû à leur méthode de production peu onéreuse et très rapide. En effet, ils sont obtenus 2 à 3 mois après l'immunisation initiale. De plus, de grandes quantités d'Acps peuvent être produites à partir du sérum d'un animal immunisé (environ 10 mg/ml). Cependant, dans les échantillons d'Acps obtenus, seule une faible proportion d'immunoglobulines (0,1 à 10 %) sera spécifique de l'Ag avec lequel l'animal a été immunisé. En outre, l'obtention d'une production continue d'Acps implique plusieurs immunisations et le sacrifice d'un grand nombre d'animaux. Ainsi, le mélange d'Acps, dirigés contre les différents épitopes immunogènes de la protéine, obtenu à chaque immunisation est différent. Les résultats des différents tests immunologiques développés avec les Acps issus de diverses immunisations (inter-laboratoire et intra-laboratoire) ne sont donc théoriquement pas comparables (Roitt *et al.*, 1997).

### *Anticorps monoclonaux*

Récemment, différents anticorps monoclonaux (Acm) spécifiques de la VTG de la truite arc-en-ciel, du médaka, du saumon atlantique (*Salmo salar*) et du petote (*Cyprinodon variegatus*) ont été produits (Nilsen *et al.*, 1998, Bowman *et al.*, 2000, Folmar *et al.*, 2000, Marx *et al.*, 2001, Kordes *et al.*, 2002, Nishi *et al.*, 2002).

Les protocoles de production des Acms sont plus complexes que ceux des Acps. Ils diffèrent légèrement selon l'Ag bien que leur trame soit identique et que leur mode de production soit toujours basé sur le premier protocole développé par Köhler et Milstein, en 1975. Les animaux utilisés sont des souris femelles. Comme pour la production des Acps, les animaux sont immunisés à plusieurs reprises par injections intrapéritonéales espacées de 2 à 3 semaines, avant de recevoir un rappel intraveineux 4 jours avant le sacrifice. La rate des souris est alors rapidement prélevée et vidée de ces splénocytes (lymphocytes B de la rate produisant les Acs). Ces cellules sont alors fusionnées avec des myélomes (cellules immunitaires cancéreuses de souris) à l'aide d'un agent de fusion, le PEG (polyéthylène glycol). Une première sélection des cellules, basée sur la survie, est réalisée en ajoutant dans le milieu de culture un agent sélectif comme par exemple le HAT (composé d'Hypoxanthine, d'Aminoptérine et de Thymidine) (Galfré et Milstein, 1981) ou bien le HAZ (composé d'Hypoxanthine et d'Azaserine) (Marx *et al.*, 2001). Seules les cellules issues de la fusion d'un splénocyte et d'une cellule de myélome pourront se développer dans ce milieu. Enfin, chaque type d'hybridomes (lignée de cellules produisant un Ac spécifique d'un épitope de la VTG) est isolé par clonage (Galfré et Milstein, 1981, Marx *et al.*, 2001).

Les hybridomes ainsi obtenus, héritent à la fois de la capacité des splénocytes à produire des Acs spécifiques et de l'immortalité des myélomes (Köhler et Milstein, 1975, Galfré et Milstein, 1981, Roitt *et al.*, 1997, Melchior *et al.*, 2001). Ces qualités permettent donc que la production des Acms soit continue pendant un temps indéfini. En outre, ces cellules peuvent être congelées et remises en culture sans être altérées. Par conséquent, pour une lignée d'hybridome donnée, il existe une source constante, reproductible et renouvelable du même Acm en grande quantité. Enfin, un avantage supplémentaire des Acms est que les tests immunologiques utilisant le même Acm sont aisément comparables. Par contre, l'inconvénient de cette méthode est qu'elle

est longue et onéreuse. Ainsi, pour obtenir les hybridomes producteurs d'Acms spécifiques de la VTG, il faut compter plus d'un semestre.

#### ***I. D. - 2. 2. 2. RIA (Radioimmunoassay)***

La première méthode de dosage de la vitellogénine par la technique de RIA (Radioimmunoassay) a été développée par Tyler *et al.* en 1990. Cette méthode utilise des Acps anti-VTG de carpe. Une quantité connue de VTG marquée avec de l'iode <sup>125</sup> radioactif est mélangée avec une solution d'Acps anti-VTG et des solutions de VTG de concentrations variables connues (standards) ou un échantillon plasmatique dont la concentration en VTG est inconnue. Une compétition négative s'installe entre les molécules de VTG marquées et non marquées : plus la concentration de la solution de VTG non-marquée est importante, moins de molécules de VTG marquée se lient aux Acps. Une courbe d'étalonnage reflétant la proportionnalité entre la diminution du nombre de VTG marquée liée aux Acps et la concentration en VTG non-marquée présente dans les différentes solutions peut alors être tracée. A partir de cette courbe d'étalonnage, la concentration en VTG d'un échantillon plasmatique peut être estimée.

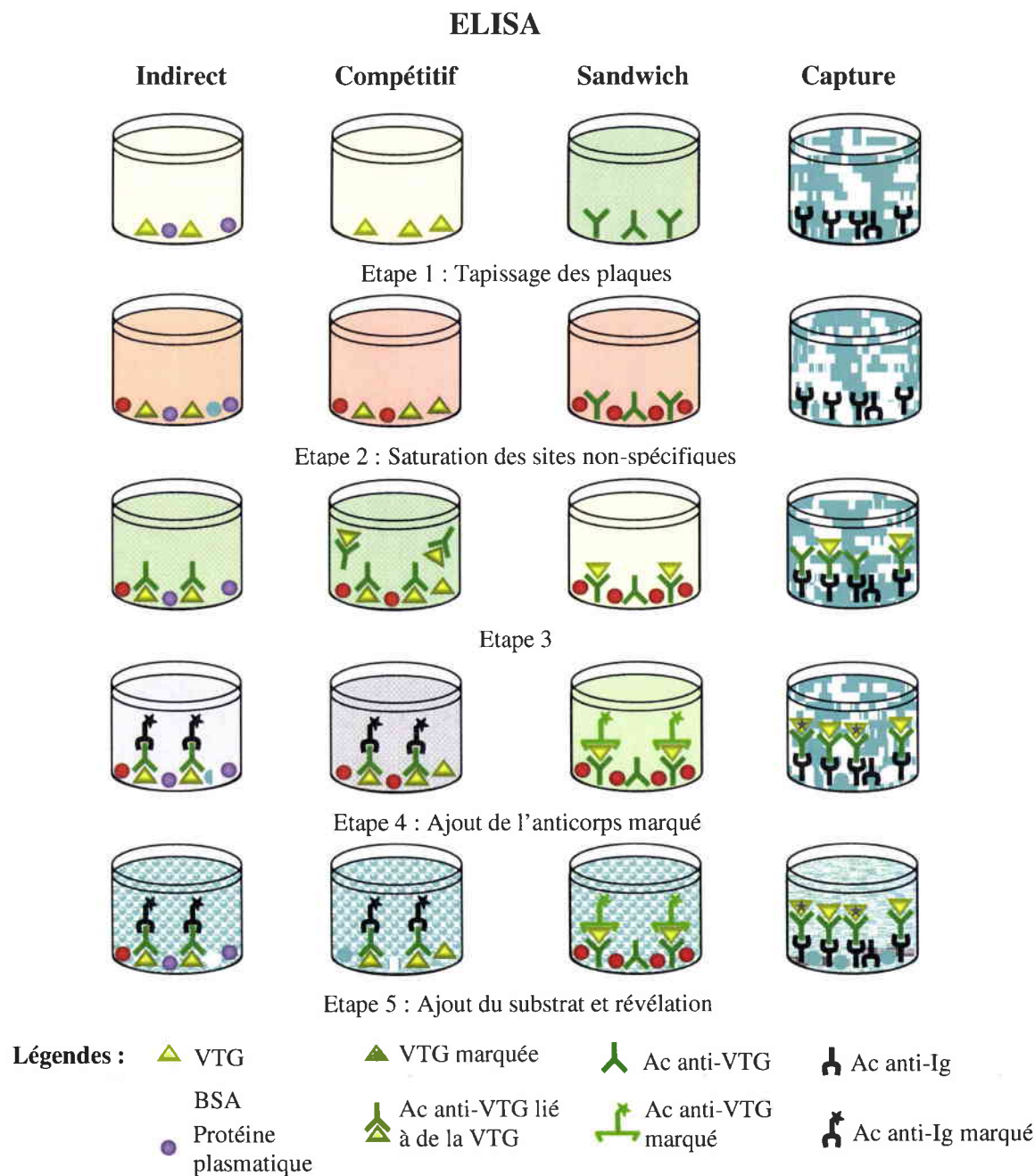
Cette technique est très spécifique et très précise. La gamme de concentration est comprise entre 2 ng/ml et 200 ng/ml (Tyler et Sumpter, 1990b). De plus, la microtitration permet d'analyser un grand nombre d'échantillons. Les inconvénients présentés par cette technique sont liés à l'utilisation d'éléments radioactifs et du matériel nécessaire à leur détection. Cette utilisation rend ces techniques coûteuses. De plus, leur mise en oeuvre implique la possession, en plus des appareils spécifiques, des locaux protégés, du personnel spécialisé et l'obtention d'autorisations pour la détention et l'utilisation du matériel radioactif.

#### ***I. D. - 2. 2. 3. ELISA (Enzyme Linked Immunoassay)***

Pour éviter de travailler avec des éléments radioactifs, une autre technique immunologique, dénommée ELISA (Enzyme Linked Immunoassay), peut être utilisée. Cette technique fonctionne avec des marqueurs dits froids : les Acps utilisés pour la révélation de la réponse sont marqués avec des enzymes telles que la peroxydase ou la phosphatase alcaline. Des



substrats spécifiques sont fournis à ces enzymes, leur transformation induisant la formation d'un produit coloré dont la concentration est mesurée par lecture spectrophotométrique. Comme pour les RIAs, cette technique a été adaptée pour l'analyse en microplaques multipuits. Quatre méthodes d'ELISA existent : indirecte, compétitive, sandwich et capture (Figure 5).



**Figure 5 :** Les différentes étapes constituant les quatre méthodes ELISA, indirect, compétitive, sandwich et capture.

### ***ELISA indirect***

Dans la méthode indirecte, les échantillons à analyser et les solutions standard de VTG sont directement déposés au fond des puits (Figure 5). Puis, après une étape de saturation des sites non-spécifiques avec de la BSA (Bovine Serum Albumin), des Acs anti-VTG sont déposés à leur tour. Ensuite, un deuxième Ac anti-immunoglobuline (Ac anti-Ig) de souris marqué avec une enzyme est à son tour déposé dans les différents puits. Enfin, le substrat de l'enzyme est ajouté et après un temps suffisant pour que les colorations soient significatives, la coloration est stoppée. La lecture spectrophotométrique est alors effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaque. Entre chaque étape, des lavages avec une solution tampon (PBS ou TRIS) enrichie en détergent comme le Tween 20, sont exécutés afin d'éliminer l'excédent de molécules non fixés (Denslow *et al.*, 1999).

Cette technique d'ELISA est la plus simple à réaliser et la moins coûteuse car elle utilise moins de produits (Folmar *et al.*, 2000). Elle est souvent utilisée pour tester la spécificité d'un Ac (Kordes *et al.*, 2002) ou pour déterminer les concentrations optimales de travail en Ag et en Ac (Sherry *et al.*, 1999) mais plus rarement comme test d'évaluation des risques (Folmar *et al.*, 2000). En effet, cette technique ELISA est la moins sensible de toutes (Denslow *et al.*, 1999) car une compétition entre les protéines constitutives du plasma et la VTG, se met en place au moment de l'étape de cotage faisant que plus la concentration en VTG est faible, plus sa probabilité d'adhérer au fond des puits diminue, au profit des autres protéines.

### ***ELISA compétitif***

Dans cette méthode dite compétitive, le fond des puits est tapissé avec de la VTG à une concentration connue. Quant aux Acs anti-VTG, ils sont préalablement mis en contact avec différentes solutions de VTG à des concentrations variables afin de réaliser la courbe d'étalonnage. Ces différentes solutions d'Acs sont alors déposées dans les puits de la microplaque. Seuls les Acs non préalablement liés, se fixent sur les molécules de VTG tapissant le fond des puits. Par conséquent, plus la concentration en VTG dans les solutions standards est élevée, moins d'Ac anti-VTG se fixeront au fond des puits et donc plus la réponse

colorimétrique sera faible. Les échantillons plasmatiques subissent les mêmes étapes que les solutions standard de VTG.

A ce jour, la majorité des tests développés pour détecter la production anormale de la VTG par les mâles et les jeunes immatures chez diverses espèces de poissons (le bar *Genus morone*, la carpe, l’omble de l’arctique, le poisson tête de boule, le poisson zèbre, la truite commune, le gag, la sole anglaise sont des tests ELISA compétitifs (Lomax *et al.*, 1998, Heppell *et al.*, 1999, Heppell et Sullivan, 1999, Johnsen *et al.*, 1999, Sherry *et al.*, 1999, Tyler *et al.*, 1999, Fenske *et al.*, 2001, Mylchreest *et al.*, 2003). Ils utilisent tous des Acps et sont d’une sensibilité très élevée (Tableau 14). Leur limite inférieure de détection peut descendre à 1 ng/ml (Tyler *et al.*, 1999). De plus, les coefficients de variations intra et inter-essai montrent que cette technique donne des résultats reproductibles si elle est utilisée dans des conditions identiques notamment avec le même mélange d’Acps.

Tableau 14 : Caractéristiques des ELISA compétitifs, sensibilité et précision (Lomax *et al.*, 1998) [1], (Heppell et Sullivan, 1999) [2], (Heppell *et al.*, 1999) [3], (Johnsen *et al.*, 1999) [4], (Sherry *et al.*, 1999) [5] (Tyler *et al.*, 1999) [6] et (Fenske *et al.*, 2001) [7].

| Poissons                    | Limite (ng/ml) |            | Coefficient de variation (%) |             | Référence |
|-----------------------------|----------------|------------|------------------------------|-------------|-----------|
|                             | inférieure     | supérieure | intra-essai                  | inter-essai |           |
| Bar ( <i>Genus morone</i> ) | 33             | 118        | 3,8                          | 5,9         | [3]       |
| Carpe                       | 1              | 50         | 8,9                          | 9,7         | [6]       |
| Gag                         | 19             | 1452       | 6,2                          | 8,2         | [2]       |
| Omble de l’arctique         | 2              | 125        | 8,6                          | 13,3        | [4]       |
| Sole                        | 10             | 450        | 6,8                          | 9,6         | [1]       |
| Truite marron               | 30             | 1000       | < 10 %                       | -           | [5]       |
| Poisson zèbre               | 3              | 500        | 4,9                          | 7,5         | [7]       |

***ELISA sandwich***

Concernant les ELISA sandwich, comme leur nom l’indique, l’Ag est pris en sandwich entre deux Acs spécifiques (Figure 5). Pour que cela soit possible, deux Acs différents, c'est-à-dire spécifiques de deux épitopes différents, doivent être utilisés de manière à ce qu’ils n’entrent pas en compétition (Denslow *et al.*, 1999). Dans la majorité des cas, le deuxième Acs spécifique de l’Ag est marqué avec des enzymes. En effet, les Acs qui se cotent au fond des puits, se fixent dans n’importe quel sens. Or, si ces Acs se fixent en laissant leur groupement Fc disponible, des Acs

anti-immunoglobuline pourraient s’y fixer, générant un bruit de fond élevé. Le marquage du deuxième Acs anti-VTG remédie à ce problème.

Quelques tests ELISA sandwich ont déjà été développés avec des Acps (Ohkubo *et al.*, 2003), mais également avec des Acms (Nishi *et al.*, 2002) spécifiques de la VTG de gobie et de médaka. Par ailleurs, dans d’autres études, les auteurs ont préféré utiliser des Ac (Acps ou Acms) spécifiques de la lipovitelline pour détecter la production anormale de VTG par les mâles et/ou les jeunes immatures chez les poissons zèbres, les médakas, les carpes et cinq espèces de salmonidés dont la truite arc-en-ciel (Fukada *et al.*, 2001, Holbech *et al.*, 2001, Kordes *et al.*, 2002, Fukada *et al.*, 2003) (Tableau 15).

Tableau 15 : Caractéristiques des ELISA sandwichs, sensibilité et précision (Fukada *et al.*, 2001) [1], (Holbech *et al.*, 2001) [2], (Kordes *et al.*, 2002) [3], (Nishi *et al.*, 2002) [4] (Fukada *et al.*, 2003) [5] et (Ohkubo *et al.*, 2003) [6].

| Poisson            | Acs                         | Limite (ng/ml) |            | Coefficient de variation (%) |             | Références |
|--------------------|-----------------------------|----------------|------------|------------------------------|-------------|------------|
|                    |                             | inférieure     | supérieure | intra-essai                  | inter-essai |            |
| Carpe              | Acp anti-LV                 | 2              | 1000       | 7,7                          | 8,5         | [5]        |
| Gobie              | Acp anti-VTG <sub>530</sub> | 1,25           | 160        | 5,7                          | 13,3        | [6]        |
|                    | Acp anti-VTG <sub>320</sub> | 0,26           | 66         | 3,5                          | 3,3         |            |
| Médaka             | Acm anti-LV                 | 9              | 600        | < 5                          | < 5         | [3]        |
|                    | Acm anti-VTG                | 1              | 100        | 7,7                          | 8,5         | [4]        |
| Truite arc-en-ciel | Acp anti-LV                 | 0,06           | 500        | 3-6,7                        | 3,2-5,9     | [1]        |
| Poisson zèbre      | Acp anti-LV                 | 0,2            | 20         | 5,8                          | 10,4        | [2]        |

La lipovitelline est issue de la métabolisation de la VTG dans les oocytes. Ces deux protéines possèdent donc une séquence d’acides aminés analogue. Dans ces quatre études, les Acs produits contre la lipovitelline ont été sélectionnés pour leur capacité à reconnaître également la VTG. Le choix de l’utilisation d’Ac anti-lipovitelline (Lv) se justifie car il est plus facile d’obtenir des quantités suffisantes de protéine pour produire des Acs et plus particulièrement des Acms. En effet, cette protéine est concentrée dans les oocytes alors que la VTG est diluée dans le plasma (Holbech *et al.*, 2001, Kordes *et al.*, 2002, Fukada *et al.*, 2003). De plus, certaines espèces de poissons, comme les médakas, sont si petites que le maximum de volume sanguin pouvant être prélevé est d’environ 7 µl (Kordes *et al.*, 2002). Par ailleurs, parmi les tests développés avec des Ac anti-Lv, deux tests utilisent des Acs marqués avec une molécule

chimiluminescente (ester d'acridium chimiluminescent) et non avec une enzyme (Fukada *et al.*, 2001, Fukada *et al.*, 2003). Ces tests ELISA sandwichs sont plus sensibles que les tests ELISA compétitifs car les limites inférieures de détection peuvent atteindre des valeurs inférieures à 1ng/ml (Tableau 15).

### ***ELISA “capture”***

Un autre type de test ELISA dit “capture” a été mis au point récemment par l'équipe Hennies *et al.* (2003) avec des Acps anti-VTG pour la carpe et la perche (Hennies *et al.*, 2003). Cette technique est basée sur la capture successive de différentes molécules (Figure 5). Tout d'abord des Acs anti-Ig sont déposés aux fonds des puits. Ensuite des solutions contenant des quantités connues d'Acps anti-VTG mélangés aux différents échantillons à analyser (standard et échantillon plasmatique) sont ajoutées : les Acs anti-Ig vont capturer les Acps liés ou libres. Enfin, une solution de VTG marquée (avec une sonde froide) de concentration connue est ajoutée. Les molécules de VTG marquée vont ainsi se lier avec les Acps libres. Par conséquent, plus la concentration en VTG sera élevée dans les échantillons à analyser moins de molécules de VTG marquée pourront être capturées et donc, plus la coloration sera faible.

Le test ELISA capture développé pour la carpe donne de meilleurs résultats par rapport à celui développé pour la perche. En effet, les coefficients de variation inter-essais varient entre 3 et 12,3 % pour la carpe et 11 et 23 % pour la perche. Par ailleurs, l'intervalle d'analyse est beaucoup plus restreint pour la perche avec, en plus, une limite inférieure plus élevée (entre 40-960 ng/ml pour la perche et entre 27-1730 ng/ml pour la carpe). Cette différence serait due à la fragilité plus importante de la VTG de perche. Les auteurs de cette étude préconisent donc l'utilisation de la carpe plutôt que celle de la perche comme espèce de référence, pour évaluer l'impact environnemental des CEMs, quand cela est possible (Hennies *et al.*, 2003).

## ***I. D. - 2. 3. Méthodes de biologie moléculaire***

La technique de biologie moléculaire consiste à doser la concentration en ARNm de VTG synthétisée, à l'aide de sondes nucléiques complémentaires marquées. Cette technique est

couplée avec une technique de RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction) dont l'objectif est :

- de produire les ADNc complémentaires des ARNm présents dans le cytoplasme des hépatocytes,
- et d'augmenter proportionnellement leur nombre de façon à amplifier la réponse (Canapa *et al.*, 2002).

Les transcrits obtenus peuvent alors être quantifiés soit directement, si le marquage des sondes le permet (marquage radioactif des sondes), (Bowman *et al.*, 2000) soit à l'aide d'Acs spécifiques du marqueur des sondes nucléiques (sondes marquées avec de la digoxigénine, utilisation d'Ac anti-digoxigénine). Ces Acs sont eux-mêmes marqués avec un marqueur enzymatique qui permet la révélation de la réponse (Gagné et Blaise, 1998).

Cette méthode très sensible permet de quantifier avec précision les quantités d'ARNm produites qui sont de l'ordre du nombre de mol/ng d'ARN total (Ackermann *et al.*, 2002) ou du ng/ $\mu$ g d'ARN total (Bowman *et al.*, 2000). Le potentiel transcriptionnel de différents ŒMs sur le gène de la VTG peut ainsi être évalué et comparé (Bowman *et al.*, 2000, Ota *et al.*, 2000, Denslow *et al.*, 2001). Pour autant, cette méthode ne traduit pas avec exactitude le potentiel œstrogénique des toxiques.

En effet, d'une part, les taux de VTG produits peuvent augmentés significativement alors que l'augmentation du nombre de transcrits d'ARNm ne l'est pas encore (Ackermann *et al.*, 2002). C'est le cas pour des truites arc-en-ciel traitées avec 1  $\mu$ g/l de NP (nonylphénol), pendant une année : la quantité de VTG est multipliée par deux alors que le nombre de transcrits ne diffère pas du taux basal des témoins. Ceci s'explique par le fait que, les ŒMs agissent, comme les œstrogènes endogènes, à la fois sur la transcription mais également sur la durée de vie de l'ARNm. Or, en allongeant sa durée de vie, ces substances augmentent le rendement de production de molécules de VTG par molécule d'ARNm (Ackermann *et al.*, 2002).

D'autre part, l'augmentation du nombre d'ARNm transcrits ne se traduit pas obligatoirement par une augmentation proportionnelle de la quantité en protéine. En effet, dans Bowman *et al.* (2000) ont observé une saturation du processus de traduction. Ainsi, malgré une augmentation du nombre d'ARNm (42 et 13 fois) entre les deux doses d'E2 et d'EE2 testées (200 et 2000 ng/l, et 100 et 1000 ng/l, respectivement), la quantité protéique n'a été multipliée

que par 3,5 et 3,7, respectivement (Bowman *et al.*, 2000). Enfin, l'action des ŒMs perdure encore pendant un certain temps après l'arrêt de la transcription du gène. Ainsi, par exemple, le nombre d'ARNm revient à son taux normal 2 jours après l'arrêt d'une exposition de 16 jours, avec 0,089 et 0,71 µg/l d'E2 ou 5,6 et 59,6 µg/l de NP tandis que le taux plasmatique de VTG ne commence à diminuer que 4 jours après l'arrêt de l'exposition. Enfin, il peut s'écouler presque 2 mois avant que celui-ci ne revienne à son taux basal (Hemmer *et al.*, 2002) .

Par conséquent, malgré la grande précision des méthodes de biologie moléculaire, elles présentent également des inconvénients. Elles sont très onéreuses et elles impliquent le sacrifice systématique des animaux puisque les ARNm sont prélevés dans le cytoplasme des hépatocytes. Ces techniques sont donc difficilement utilisables comme test de routine pour l'évaluation des risques induit par les ŒMs.

## ***I. E. Le test d'agglutination à billes de latex (ou LAT pour Latex Agglutination Test)***

L'évaluation des risques suppose, à la fois, de déterminer l'éventuel potentiel œstrogénique de toute nouvelle molécule avant sa mise sur le marché mais aussi d'analyser régulièrement l'état de ces molécules dans l'environnement. En effet, la métabolisation par des bactéries de l'environnement d'une molécule non-œstrogénique peut aboutir à la formation d'un produit œstrogénique et *vice versa* (Panter *et al.*, 1999).

Dans le cas de l'évaluation du potentiel œstrogénique d'une nouvelle molécule, les tests ELISA semblent les plus appropriés. En effet, ils sont très sensibles, très précis et permettent l'analyse simultanée de nombreux échantillons. Par contre, les tests ELISA utilisant du matériel spécialisé, et nécessitant un délai de 24 heures avant l'obtention des résultats, ne peuvent être réalisés directement sur le terrain. Ils ne sont donc pas appropriés pour établir un diagnostic rapide et régulier de la situation *in situ*. Par ailleurs, leur exécution nécessite du personnel qualifié. Par conséquent, pour réaliser ce type d'analyse, les organismes comme le Conseil Supérieure de la Pêche ou bien les Agences de l'eau, doivent faire appel à des laboratoires spécialisés.

Différents types de tests de diagnostic rapide sont, depuis longtemps, utilisés pour remplacer les tests ELISA comme les tests d'agglutination.

### ***I. E. - 1. Historique***

Depuis plus de 100 ans, les tests d'agglutination sont régulièrement utilisés dans le monde médical pour diagnostiquer rapidement et de manière peu coûteuse des maladies, telles que la fièvre typhoïde (Test Widal mis au point par F. Widal en 1896) (Olopoenia et King, 2000). Les premiers tests étaient des tests sérologiques qui utilisaient la capacité des globules rouges à s'agglutiner en présence :

- d'un Ag spécifiques d'un Ac présent à leur surface ;
- ou d'un Ac spécifique d'un Ag présent à leur surface.



Les globules rouges ont ensuite été remplacés par des billes de silice (Thomas *et al.*, 1999), de gélatine (Kim *et al.*, 1999, Castro *et al.*, 2001) ou de latex (Amuy *et al.*, 1997, Büscher *et al.*, 1999, Ramadass *et al.*, 1999, Attar *et al.*, 2001, Ishii *et al.*, 2001, Salama *et al.*, 2001, Bhaskar *et al.*, 2003, Chandrakesan et Parija, 2003). Ce type de test a alors pu être élargi à d'autres pathologies où les molécules à détecter (Ac ou Ag) ne se trouvaient pas à la surface d'un globule rouge mais libre dans un liquide physiologique (sang, urine, liquide céphalorachidien...).

Les tests d'agglutination sont, encore aujourd'hui, plus particulièrement mis au point pour diagnostiquer des maladies tropicales (comme par exemple la leishmania viscérale, la leptospirose et les infections trypanosomiales) (Büscher *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 1999, Ramadass *et al.*, 1999, Attar *et al.*, 2001, Chandrakesan et Parija, 2003) ou des empoisonnements (Amuy *et al.*, 1997) car ils sont facilement utilisables, notamment dans les contrées reculées (Amuy *et al.*, 1997). En effet, les tests d'agglutinations de base, réalisés en plaques ou en tubes, ne nécessitent aucun appareillage électrique. De plus, les résultats sont obtenus très rapidement (moins de cinq minutes) ce qui, dans le cas d'un empoisonnement, est primordial (Amuy *et al.*, 1997). D'autres maladies plus largement répandues dans le monde sont également diagnostiquées à l'aide de ce type de test, comme, par exemple, les hépatites B ou C (Ishida *et al.*, 2002), la tuberculose (Bhaskar *et al.*, 2003) ou la syphilis (Castro *et al.*, 2001). Les tests d'agglutination peuvent également permettre de caractériser le type précis de certains adénomes malins du col de l'utérus (mucinous type) (Ishii *et al.*, 2001), ou bien de révéler la présence d'Acs anti-IgA afin d'éviter le risque de réaction anaphylactique lors d'une transfusion sanguine (Salama *et al.*, 2001).

## ***I. E. - 2. Principe des tests d'agglutination à billes de latex***

### ***I. E. - 2. 1. Test immunologique***

Les tests d'agglutination sont des tests immunologiques semi-quantitatifs. Une échelle de gravité peut être établie selon le pourcentage d'agglutinats formés (Büscher *et al.*, 1999, Attar *et al.*, 2001) et/ou la vitesse d'agglutination (Ramadass *et al.*, 1999).

Depuis quelques années, des tests plus élaborés ont été développés : ils sont généralement associés à des techniques utilisant des ultrasons (Thomas *et al.*, 1999) ou bien la turbidimétrie

(Reber *et al.*, 2001), ce qui permet d'amplifier la réponse et/ou d'augmenter la sensibilité. Ces tests sont plutôt utilisés pour confirmer un diagnostic ou déterminer le sérotype d'un pathogène. Le test USELAT (ultrasound-enhanced latex immunoagglutination) permet ainsi de caractériser les différents sérogroupes A, B, C, Y et W135 de la bactérie *Neisseria meningitidis*, responsable de méningites. Cette information est importante, en particulier pour déterminer le type de traitement et/ou de vaccination à effectuer (Gray *et al.*, 1999).

Deux types de tests d'agglutination sont possibles : les tests indirects et directs (Figure 6) (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

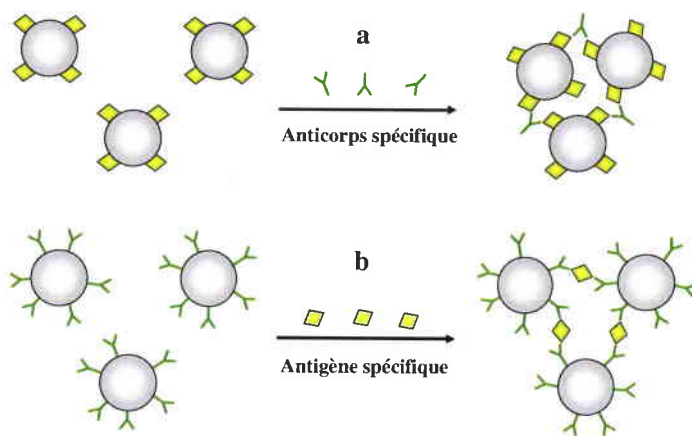


Figure 6 : Principe de fonctionnement des tests d'agglutination indirects (a) et directs (b).

### ***I. E. - 2. 2. Les tests d'agglutinations indirects***

Les tests d'agglutination indirects permettent de détecter la présence d'un Acs dans le liquide biologique étudié à l'aide d'Ags spécifiques préalablement fixés sur des billes de latex (Büscher *et al.*, 1999, Kim *et al.*, 1999, Ramadass *et al.*, 1999, Salama *et al.*, 2001, Bhaskar *et al.*, 2003).

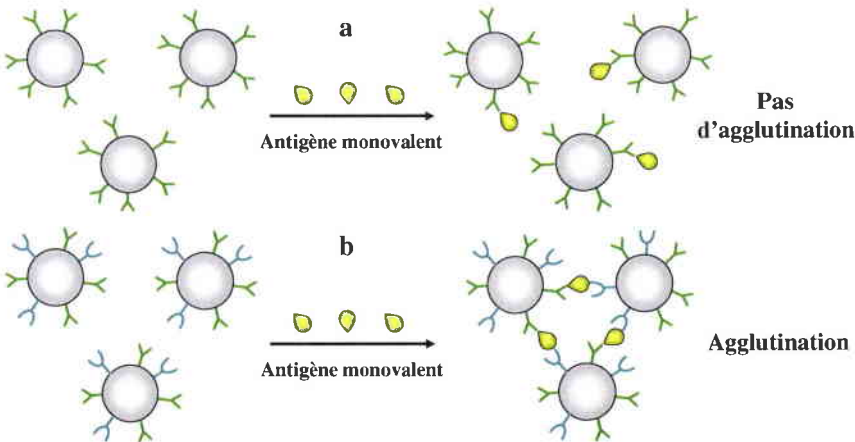
Un volume identique d'échantillon biologique et de suspension de billes est mélangé. Si des Acs sont présents dans l'échantillon, les liaisons qui s'établissent avec les Ags fixés sur les billes induisent l'assemblage des billes qui forment alors des agglutinats visible à l'œil nu (Figure 6 a). Au contraire, si aucun Ac n'est présent, la suspension de billes garde son apparence homogène.

Ce type de tests d'agglutination est applicable à des Ags mono et polyvalents, c'est-à-dire possédant un ou plusieurs épitopes (protéines, drogues et hormones stéroïdiennes) (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

***I. E. - 2. 3. Les tests d'agglutinations directs***

Quant aux tests d'agglutination directs, ils permettent de détecter la présence d'un antigène ou d'un haptène dans un liquide biologique. Dans ce cas, ce sont des Acs spécifiques qui sont fixés sur les billes de latex (Attar *et al.*, 2001, Castro *et al.*, 2001, Ishii *et al.*, 2001, Ishida *et al.*, 2002, Chandrakesan et Parija, 2003). Le mode de fonctionnement de ce type de tests reste identique à celui des tests indirects (Figure 6 b).

Cette méthode est applicable uniquement à la détection d'Ag polyvalent comme les protéines ou les microorganismes (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003). En effet si l'Ag ne possède qu'un seul épitope, les billes ne peuvent pas s'assembler et aucun agglutinat ne se forme (Figure 6 a) (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1998). Pour remédier à ce problème, il suffit d'adsorber sur les billes un mélange d'Acs reconnaissant plusieurs épitopes différents (Figure 7 b) (Amuy *et al.*, 1997).



**Figure 7 :** Immunoréactivité d'un LAT direct en présence d'un antigène monovalent : a, billes recouvertes avec un seul type d'anticorps ; b, avec un mélange d'anticorps.

Comme pour les tests ELISA, la classe d'Acs polyclonaux la plus utilisée dans la mise au point des LATs directs est la classe des immunoglobulines de type G (Attar *et al.*, 2001, Chandrakesan et Parija, 2003). Des Acs monoclonaux peuvent parfois être employés (Ishii *et al.*,

2001). Récemment, d'autres tests ont été développés avec des fragments d'IgG, les  $F(ab')_2$  (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a). Les IgGs possèdent une forme en "Y" avec trois extrémités : l'extrémité Fc et les deux extrémités Fabs. Les segments Fabs sont constitués chacun d'un paratope, les régions reconnaissant les épitopes des Ags. Les groupements  $F(ab')_2$  sont obtenus par digestion enzymatique avec la pepsine (Lamoyi et Nisonoff, 1983, Smith, 1993). Cette enzyme coupe la molécule d'Ac en aval du pont disulfure qui relie les deux segments Fabs (Figure 8).

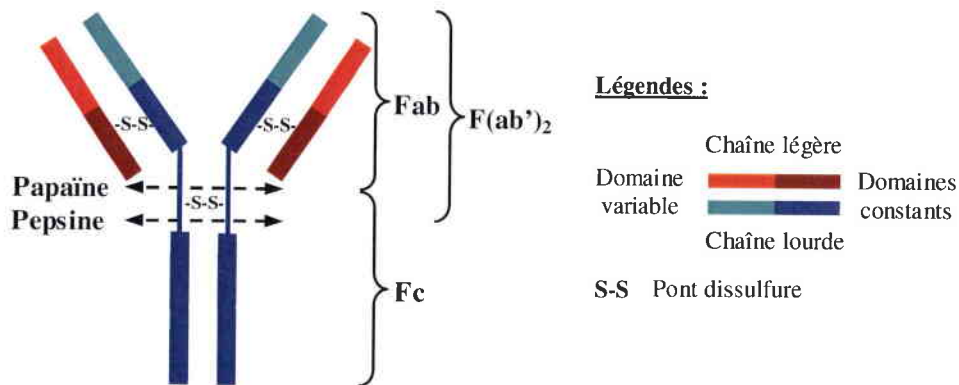


Figure 8 : Structure moléculaire d'une immunoglobuline de type G (Smith, 1993).

*Le développement d'un test d'agglutination direct avec des anticorps anti-VTG devrait permettre de détecter la présence anormale de VTG dans le plasma (ou le sérum) de poissons mâles ou immatures.*

### ***I. E. - 3. Facteurs influençant l'adsorption des anticorps***

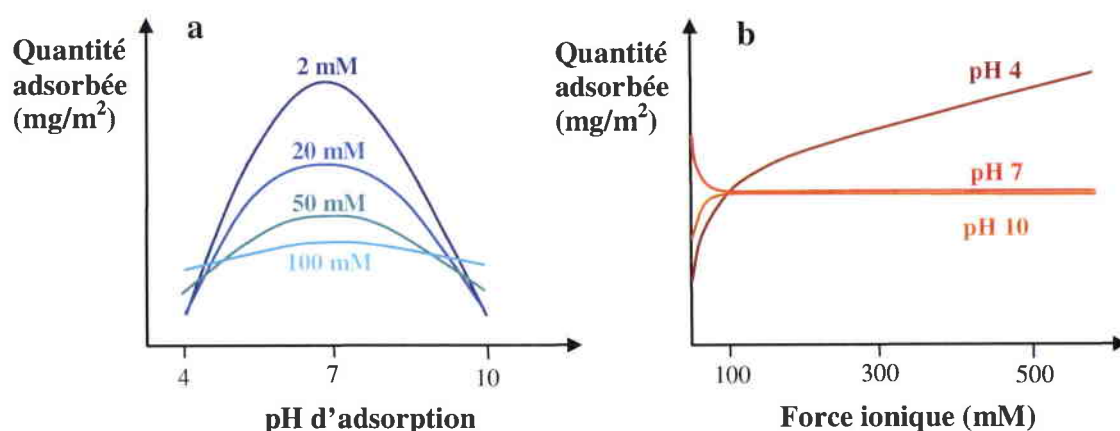
Bien que le concept soit simple, l'optimisation d'un test d'agglutination qui consiste à étudier l'adsorption des Acs sur la surface des billes de latex, nécessite la prise en compte de plusieurs facteurs : l'hydrophobicité de la protéine et du polymère, la répartition des charges, la stabilité structurale de la protéine, le pH et la force ionique de la solution (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003). Parmi ces facteurs le pH et la force ionique de la solution contenant la suspension de billes sont aisément modifiables (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

### *I. E. - 3. 1. Le pH*

Un léger changement de pH peut induire une modification importante de la capacité d'adsorption des Acs. Le maximum d'adsorption est obtenu lorsque le pH de la solution est égal au pHi de l'Ac. Plus le pH de la solution diffère du pHi de l'Ac, plus la stabilité de la molécule décroît et plus sa charge nette augmente. Le réarrangement moléculaire des Acs adsorbés induit alors une augmentation de la surface occupée par chacune des molécules d'Ac adsorbée ce qui diminue l'espace disponible pour l'adsorption d'autres Acs. De plus, l'augmentation de la charge nette des Acs adsorbés, aboutit à l'apparition de forces électrostatiques répulsives empêchant également l'adsorption d'autres Acs (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

### *I. E. - 3. 2. La force ionique*

Les effets de la force ionique dépendent du pH de la solution. Par exemple, dans le cas des IgGs de lapin, à pH 7, l'augmentation de la force ionique induit une décroissance de la valeur du maximum d'adsorption tandis qu'à pH 4 et 10, cette valeur s'accroît (Figure 9 a et b).



**Figure 9 :** Effets de la force ionique sur l'adsorption pH dépendante d'IgG polyclonaux de lapins ; a : effet de la variation de la force ionique sur la valeur adsorbée à différent pH ; b : effet de la variation de la force ionique sur le maximum d'adsorption obtenu à différents pHs (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

Ces observations indiquent, qu'à pH neutre, la stabilité structurale des IgG polyclonaux décroît parallèlement à l'augmentation de la force ionique. Par contre, quand la chaîne

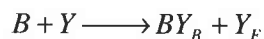
polypeptidique est hautement chargée (pH=4 et 10), une augmentation de la concentration en électrolytes provoque une neutralisation de ces charges et donc un accroissement de la stabilité des IgGs (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

#### ***I. E. - 4. Etude de l'adsorption des anticorps sur la surface des billes de latex à l'aide de modèles mathématiques***

L'adsorption de chaque Ac sur la surface des billes dépend du transport de la protéine jusqu'à la superficie du polymère, de leur interaction, de son affinité pour la surface, de l'adsorption de la nouvelle molécule qui interagit avec celles déjà adsorbées, des changements conformationnels pendant et après l'adsorption et, enfin, de la désorption et des mouvements autour de la particule (Molina-Bolívar, 1999). Pour caractériser la capacité d'adsorption et, plus précisément, l'affinité des Acs sur la surface des billes de latex, plusieurs modèles mathématiques empruntés à la microbiologie, peuvent être utilisés : les isothermes d'adsorption, de Langmuir, de Freundlich et le modèle de Scatchard.

##### ***I. E. - 4. 1. Isotherme d'adsorption***

Les immunoglobulines comme d'autres protéines globulaires telles que les enzymes, ont une forte tendance à s'adsorber sur des interfaces (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003). Le processus d'adsorption de ces protéines sur la surface des billes de latex peut se traduire par la réaction suivante (Serra *et al.*, 1992) :



où B = Concentration en billes

Y = Concentration initial d'Acs

$Y_B$  = Concentration en Acs adsorbés sur la surface des billes

$Y_E$  = Concentration en Acs non-adsorbés (en solution) à l'équilibre

et  $Y = Y_B + Y_E$

Un équilibre se met en place entre la concentration en Acs adsorbés et la concentration en Acs non-adsorbés restant en solution à l'équilibre. Les isothermes d'adsorption vont décrire la

mise en place de cet équilibre. Théoriquement, deux parties peuvent être mises en évidence dans ce type d'isotherme (Figure 10) :

- une première partie dont la pente positive très forte exprime l'affinité de l'Ac pour les billes de latex (plus la pente est forte, plus l'affinité de l'Ac est élevée),
- une seconde partie où la surface des billes est saturée ce qui se caractérise par une concentration d'adsorption maximale.

Ce phénomène de saturation se traduit dans l'isotherme d'adsorption par un plateau (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

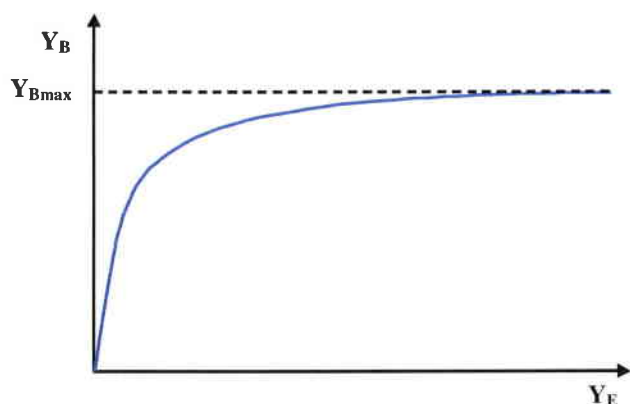


Figure 10 : Représentation théorique d'une isotherme d'adsorption d'anticorps sur des billes de latex.

La concentration maximale d'adsorption dépend à la fois des conditions expérimentales, de la conformation de la molécule d'Ac (de la surface qu'il occupe), et surtout de l'affinité de l'Ac pour la surface des billes et des forces d'interactions latérales déployées par les autres molécules déjà adsorbées (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

#### ***I. E. - 4. 2. Isotherme de Langmuir***

Le processus d'adsorption des Acs sur des billes de latex atteint, théoriquement, une saturation. L'isotherme de Langmuir est le modèle le plus approprié pour l'analyser (Falla, 1990, Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003, Öztürk *et al.*, 2004). L'équation exprimant cet isotherme s'écrit (Falla, 1990) :

$$\frac{1}{Y_B} = \frac{1}{K.b.Y_E} + \frac{1}{b}$$

où  $K$  : représente la constante d'équilibre d'adsorption

$b$  : représente la capacité ultime d'adsorption.

Ces constantes sont obtenues à partir de la représentation graphique (Figure 11).

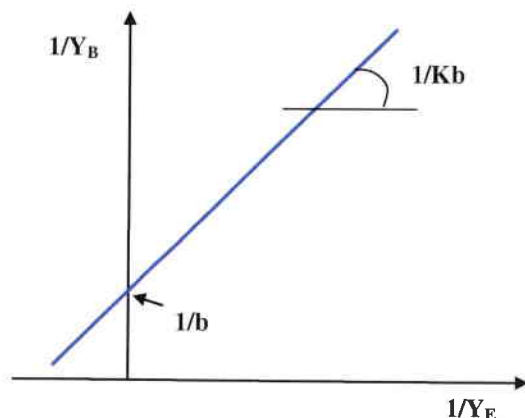


Figure 11 : Représentation théorique d'une isotherme de Langmuir.

### ***I. E. - 4. 3. Isotherme de Freundlich***

Cependant, il s'avère que l'interaction protéine-surface est plus complexe et inclue souvent plusieurs étapes dont deux sont déjà caractérisées (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a, Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003) :

- la première étape où l'adsorption de la protéine sur la surface se fait sans changement de conformation ou d'orientation de celle-ci,
- et la deuxième étape où la protéine change de conformation ou d'orientation avant de s'adsorber.

Ces deux conformations, ou orientations, possèdent deux affinités différentes pour la surface des billes. L'étude de ces différentes affinités peut alors être faite à l'aide de l'isotherme de Freundlich qui décrit la distribution des Acs entre la phase liquide et la phase solide (Brown et Lester, 1982, Falla, 1990, Öztürk *et al.*, 2004). L'équation modélisant ce type d'isotherme s'exprime de la manière suivante :

$$Y_B = K.Y_E^{\frac{1}{n}}$$

où  $K$  : représente la constante d'affinité

$1/n$  : représente la capacité d'adsorption de la surface



Cette équation peut être linéarisée en coordonnées ln-ln :

$$\ln Y_B = \ln K + \frac{1}{n} \ln Y_E$$

La représentation graphique de la Figure 12 peut alors être réalisée et la valeur de chaque constante calculée.

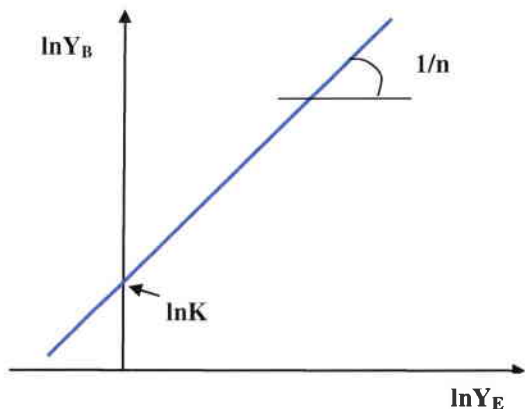
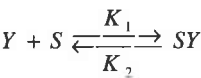


Figure 12 : Représentation théorique de la linéarisation d’une isotherme de Freundlich.

#### ***I. E. - 4. 4. Modèle de Scatchard***

Le modèle de Scatchard est un modèle mathématique souvent utilisé en microbiologie pour étudier l’adsorption des métaux par les bactéries (Falla et Block, 1993, Öztürk *et al.*, 2004). En l’appliquant à l’adsorption des Acs sur la surface des billes de latex, il doit permettre d’apprécier les quantités d’Ac fixé par unité de bille, les différents types de mode de fixation et leurs affinités, et surtout, la relation existant entre les différentes affinités et les types de fixation (coopération négative ou positive) (Falla et Block, 1993).

L’équation suivante montre la façon de représenter ce modèle (Falla, 1990) :



où S : représente les sites de fixation  
et  $K_1$  et  $K_2$  représentent les constantes cinétiques.

A l’équilibre, cette équation peut s’écrire de la manière suivante :

$$K_1.Y_E.S_L = K_2.Y_S \tag{1}$$

d'où on tire l'équation suivante :

$$\frac{S_L \cdot Y_E}{Y_S} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{1}{K_a} \quad (2)$$

où  $S_L$  représente les sites de fixation libres à l'équilibre  
et  $Y_S$  représente les Acs fixés

Le nombre total de sites de fixation ( $N_F$ ) est égal à :

$$N_F = nS = S_L + Y_S \quad (3)$$

$$\text{donc } S_L = nS - Y_S \quad (4)$$

En combinant les équations (4) et (2), on obtient :

$$\frac{1}{K_a} = \frac{(nS - Y_S) \cdot Y_E}{Y_S} \quad (5)$$

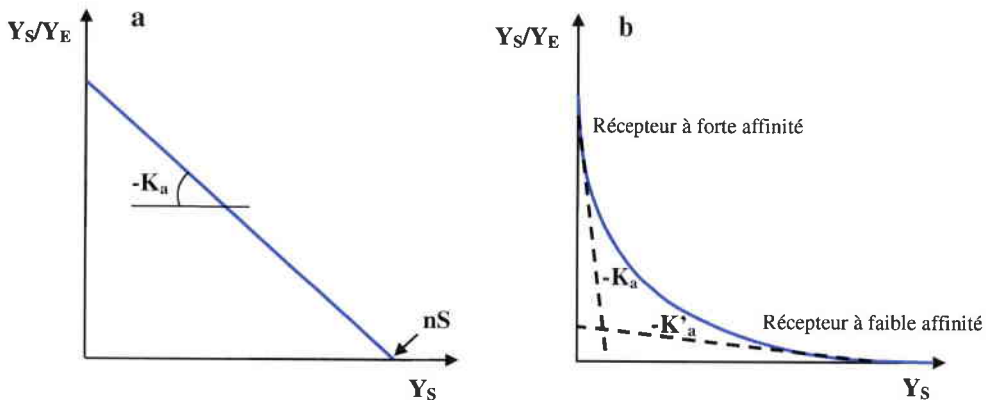
Enfin, après linéarisation, cette équation devient :

$$\frac{1}{Y_S} = \frac{1}{K_a \cdot nS \cdot Y_E} + \frac{1}{nS} \quad (6)$$

ou encore :

$$\frac{Y_S}{Y_E} = -K_a \cdot Y_S + K_a \cdot nS \quad (7)$$

L'expression graphique de cette équation montre que si les Acs ne présentent qu'un seul mode de fixation, cette équation décrit une droite de pente  $K_a$  (Figure 13 a).



**Figure 13 :** Expression graphique de l'équation de Scatchard ; a : un seul type de site récepteur ; b : deux types de site récepteur.

Au contraire, une courbe avec plusieurs points d'inflexion indique que les Acs possèdent plusieurs types de sites de fixation (Figure 13 b) (Falla et Block, 1993, Öztürk *et al.*, 2004). Par

exemple, dans le graphique représenté dans la figure 13 b, il est possible de définir grâce à la courbe au moins deux sites de fixation : un possédant une forte affinité et l'autre une faible (Falla, 1990).

## ***I. E. - 5. Immunoagglutination***

### ***I. E. - 5. 1. Stabilité du complexe anticorps-billes de latex***

Les complexes Acs-billes de latex doivent être stables en absence d'Ag pour qu'aucune agglutination non-spécifique ne se produise. Or, les complexes Acps - billes de latex sont souvent très instable aux valeurs de pH et de force ionique reproduisant les conditions physiologiques (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001). La stabilité des complexes Acs-billes de latex dépend essentiellement de l'équilibre entre les forces attractives de Van der Waals et les forces électrostatiques répulsives (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

Les Acps possèdent un pHi compris approximativement entre 6,5 et 8. Par conséquent, au pH physiologique (pH=7,4), la majorité des Acps sont faiblement chargés ou neutres. L'intensité des forces électrostatiques inhérentes étant faible ou nulle, un déséquilibre des forces se crée en faveur des forces attractives de Van der Waals ce qui induit une agglutination non-spécifique des billes de latex.

Pour améliorer la stabilité des complexes Acs-billes de latex, il est plutôt conseillé d'utiliser des fragments d'Acps, les F(ab')<sub>2</sub>, des Acps aviaires (IgY) ou des Acms. En effet, ces molécules possèdent un pHi compris entre 4,6-6, 5,7-7,6 et 5-7, respectivement. Par conséquent au pH physiologique (soit pH=7,4), tous ces Acs sont chargés, et, plus ils sont chargés, plus les complexes Acs-billes obtenus seront stables (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1998, Dávalos-Pantoja *et al.*, 2001, Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001, Perez-Amodio *et al.*, 2001).

Cependant, l'utilisation des fragments F(ab')<sub>2</sub> et des IgY aviaires présente des inconvénients :

- Plusieurs étapes sont nécessaires à la purification des fragments F(ab')<sub>2</sub>. De plus, leur affinité pour le latex est inférieure à celle des IgGs. Enfin, ils peuvent s'adsorber dans n'importe quel sens. Le groupement Fc étant hydrophobe, c'est plutôt par cette extrémité

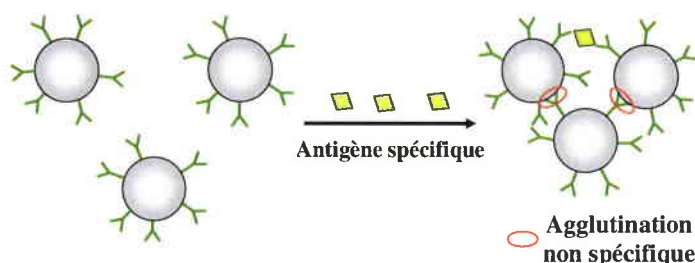
que les IgGs et les IgYs adhèrent au polymère des billes de latex. Les groupements F(ab')<sub>2</sub> étant dépourvus du fragment Fc, aucune orientation d'adsorption n'est favorisée (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a).

- Les lipides du jaune d'œuf sont difficilement éliminés lors de la purification des IgYs. De plus, les molécules d'IgYs sont plus fragiles que les IgGs et leur affinité est plus faible (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

Concernant les Acms, leur utilisation dans les LATs présente d'autres avantages. Par exemple, 100 % des molécules d'IgGs adsorbés sur les billes de latex sont spécifiques du même antigène. De ce fait, la sensibilité et la limite de détection des tests sont considérablement améliorées (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

### ***1. E. - 5. 2. Blocage des sites non-spécifiques***

L'origine de la formation d'agglutinations non-spécifiques peut être autre que l'instabilité colloïdale. En effet, des ponts non-spécifiques peuvent se former, entre les billes, du fait de l'interaction des Acs avec le polymère d'une autre bille et non avec l'Ag (Figure 14) (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).



**Figure 14 :** Agglutination non-spécifique due à la formation de ponts non-spécifiques.

Pour résoudre ce problème, la surface non recouverte par des Acs peut être saturée avec une autre protéine comme l'albumine (ou BSA : Bovine Serum Albumin), ce qui rend le polymère non accessible. De plus, à pH=7, cette protéine est hautement chargée négativement, ce qui augmente encore la stabilité des complexes Acs-billes (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a, Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

L'adsorption de la BSA et des Acs peut être réalisée simultanément. L'inconvénient de cette coadsorption est qu'une compétition s'installe entre les deux types de protéines. Il faut donc

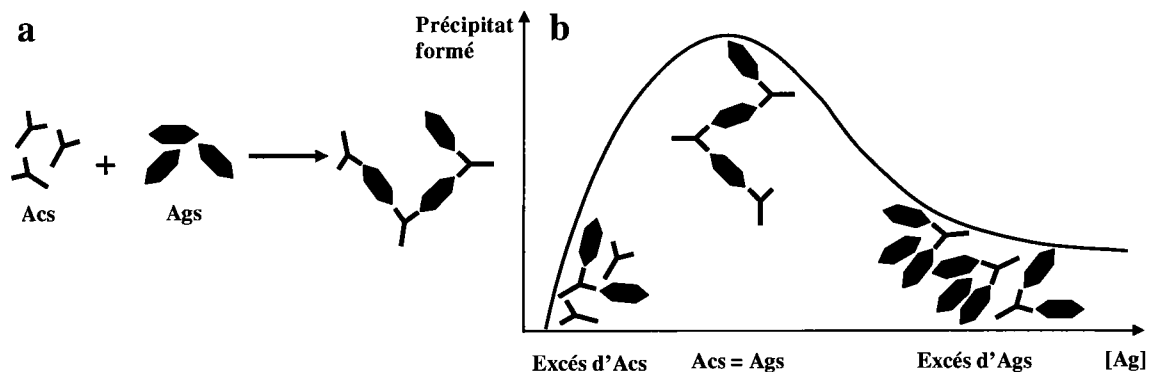
déterminer le meilleur ratio pour que le phénomène de compétition ne se fasse pas à la défaveur des Acs, tout en préservant une bonne stabilité au complexe (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

Concernant l'adsorption successive des deux types de molécules (Ac puis BSA), elle présente également un inconvénient. Les centrifugations intermédiaires (entre les deux phases d'adsorption) induisent la désorption d'une partie des Acs préalablement adsorbés (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001). Toutefois l'adsorption successive présente un avantage inéluctable, à savoir que les quantités d'Acs adsorbés sont simples à déterminer. Il suffit en effet de faire la différence entre la quantité d'Acs en solution avant l'adsorption et celle encore présente dans la solution après adsorption (Molina-Bolívar, 1999).

### ***I. E. - 5. 3. Optimisation de l'immunoréactivité***

L'affinité des Acs pour leur Ag est un facteur essentiel dans le processus d'immunoagglutination. Cette affinité doit être suffisamment élevée pour contre-balancer les forces électrostatiques répulsives et ainsi faire basculer l'équilibre des forces vers l'agglutination (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1998).

La quantité d'Acs adsorbés est également un facteur important. Théoriquement, plus cette quantité est élevée, plus la probabilité de lier un Ag est élevée et donc, plus le phénomène d'immunoagglutination est favorisé. Cependant, des observations expérimentales montrent qu'un excès d'Acs adsorbés induit un encombrement stérique qui restreint l'accessibilité des Ags et inhibe ainsi l'immunoagglutination (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1996, Molina-Bolívar *et al.*, 1998b, Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001). D'autre part, il semblerait que le processus d'immunoagglutination soit similaire au processus d'immunoprécipitation, en phase liquide, entre un Ag multivalent et son Ac, représenté graphiquement par la courbe de Heiderberger-Kendall (Figure 15) (Molina-Bolívar, 1999).



**Figure 15 :** Processus d’immunoprécipitation, en phase liquide, entre un Ag polyvalent et son Ac : a, réaction d’immunoréaction ; b, représentation de Heiderberger-Kendall (Molina-Bolívar, 1999).

Cette courbe indique qu’un excès d’Ags par rapport à la quantité d’Acs adsorbés sur les billes de latex, peut également inhiber l’immunoagglutination. Par conséquent, une des difficultés dans la mise au point d’un test LAT direct va consister à trouver la quantité optimale en Acs adsorbés qui n’encombre pas stériquement les particules tout en étant suffisante pour que les Ags présents dans les échantillons ne soient jamais en excès.

L’orientation des molécules d’Acs adsorbées affecte également l’immunoagglutination. En effet, les antigènes se lient avec les extrémités Fabs des IgGs et des IgYs ; ce sont par conséquent ces deux extrémités qui doivent être accessibles après l’adsorption des Acs, sans quoi l’immunoagglutination serait impossible. Pour modifier cette orientation, il suffit d’agir sur le pH ou sur la force ionique (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a, Dávalos-Pantoja *et al.*, 2001).

*L’objectif de ce travail a été de développer un test immunologique, précis, sensible, peu coûteux et simple d’utilisation (pour du personnel non laborantin), qui permettra de diagnostiquer, rapidement et régulièrement, une éventuelle contamination des espèces piscicoles par des œstrogènes mimétiques, et ceci directement sur le terrain. Le type de test qui a été retenu est un test d’agglutination direct utilisant des anticorps monoclonaux anti-VTG de type IgG. Plusieurs anticorps ont été produits et testés de manière à sélectionner le plus fonctionnel en terme d’affinité vis-à-vis du polymère et de la vitellogénine.*







## ***Partie II.***

### ***Matériels et Méthodes***



## ***II. A. Purification de la vitellogénine***

### ***II. A. - 1. Induction de la synthèse de VTG de carpe (*Cyprinus carpio*)***

#### ***II. A. - 1. 1. Origine des poissons***

Les carpes (*Cyprinus carpio*) sont des poissons téléostéens appartenant à l'ordre des Cypriniformes et à la famille Cyprinidés. Ces poissons sont originaires d'Asie. Ils ont été introduits en Europe où ils se sont répandus dans les eaux douces, calmes, profondes et assez chaudes (15 à 24°C) ainsi que dans les eaux stagnantes, tels que les lacs et les étangs (Louisy *et al.*, 1990).

#### ***II. A. - 1. 2. Traitement des poissons***

##### ***Elevage***

Dix carpes, provenant de la pisciculture “GAEC piscicole” du Saulnoy (France), d'environ 1 kg chacune, sont réparties dans deux aquariums de 500 litres. Elles sont élevées à environ 20°C avec une photopériode de 8 heures, sous bullage d'air constant, avec filtration de l'eau en continu. Elles sont maintenues dans ces conditions pendant une semaine, après leur arrivée dans le laboratoire afin de leur laisser le temps de s'adapter à leur nouvel environnement.

##### ***Traitement***

Pour obtenir une solution suffisamment concentrée en vitellogénine (VTG) pure afin de produire des anticorps monoclonaux (Acms), 5 carpes, de sexe non identifiable, sont traitées selon le protocole mis au point par Tyler et Sumpter (1990), avec du  $17\beta$ -œstradiol (Tyler et Sumpter, 1990a). Cette hormone est connue comme l'œstrogène possédant le plus fort potentiel œstrogénique, pour induire la synthèse de la VTG (Christiansen *et al.*, 1998b, Routledge *et al.*, 1998, Arukwe *et al.*, 2000, Latonnelle *et al.*, 2002b). Les animaux reçoivent deux injections, à

10 jours d'intervalle, de 10 µg d'E2/g de poisson, diluée dans 100 µl d'un mélange de méthanol-chloroforme (v/v).

Cinq autres carpes, de sexe non identifiables, non-traitées, servent de témoins négatifs et positifs, respectivement. Ces témoins reçoivent également deux injections intrapéritonéales, mais uniquement de mélange méthanol-chloroforme.

Sept jours après la dernière injection, le sang des poissons est prélevé au niveau de la veine caudale. Le sang est alors transféré dans des tubes héparinés contenant un mélange d'anti-protéases (1µl/ml, Sigma, Gen. Use). Les échantillons de sang sont centrifugés à 1500 x g, pendant 15 min, à 4°C, afin d'éliminer les cellules sanguines. Les plasmas sont stockés à -20°C.

## ***II. A. - 2. Première méthode de purification***

Une première méthode de purification utilisée pour purifier la VTG de différentes espèces de poissons (Tao *et al.*, 1993, Mananos *et al.*, 1994, Roubal *et al.*, 1997, Heppell et Sullivan, 1999, Johnsen *et al.*, 1999, Brion *et al.*, 2000) a été adaptée à la VTG de carpe. Ces méthodes utilisent deux chromatographies successives : une chromatographie échangeuse d'ions puis une chromatographie de filtration sur gel.

### ***II. A. - 2. 1. Chromatographie échangeuse d'anions faibles***

Une colonne d'échangeuse d'anions faibles (DEAE 301 VHP 575P, 0,75 cm x 5 cm) est équilibrée avec un tampon Tris-HCl 25 mM, pH=8, enrichi en anti-protéases (1 µl/ml, Sigma, Gen. Use) et en azide de sodium (NaN<sub>3</sub>, 0,05 %, w/v, LABOSI).

Les échantillons de plasma sont déposés sur la colonne, par fraction de 200 µl. L'élution des protéines est réalisée à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl de 0 à 0,5 M, préparé dans un tampon Tris-HCl 25 mM, pH=8, enrichi en anti-protéases (1µl/ml) et en NaN<sub>3</sub> (0,05 %). Le débit d'élution est de 1 ml/min, et le gradient dure 35 min. Les fractions sont collectées toutes les minutes.

## ***II. A. - 2. 2. Concentration des protéines***

Les fractions purifiées contenant la VTG sont alors regroupées puis concentrées par ultrafiltration à 6000 x g, pendant 10 min, à 4°C, dans des tubes Vivaspins d'un seuil de coupure à 50 kDa (Vivascience, France).

## ***II. A. - 2. 3. Chromatographie de filtration sur gel***

Les nouveaux échantillons de VTG obtenus précédemment subissent une nouvelle étape de purification par chromatographie de filtration sur gel (TSK G3000 SW<sub>XL</sub>, de 30 cm x 7,8 mm).

Le tampon employé ici, est une solution de phosphate de sodium (0,1 M, pH=9) enrichie en anti-protéases (1 µl/ml de tampon) et en NaN<sub>3</sub> (0,05 %). Le débit d'élution est de 0,8 ml/min et l'analyse dure 20 min. Les fractions sont également récoltées toutes les minutes.

Les nouvelles fractions contenant la VTG, sont également regroupées et concentrées par ultrafiltration. Les fractions témoins correspondantes subissent un traitement identique.

## ***II. A. - 3. Deuxième méthode de purification***

### ***II. A. - 3. 1. Chromatographie échangeuse d'anions faibles***

De manière à augmenter le rendement de purification de la VTG pour produire des Acms spécifiques, une nouvelle méthode qui repose sur une seule étape de purification par chromatographie échangeuse d'anions faibles, a été mise au point. La colonne utilisée dans ce cas, est identique à celle utilisée pour la première méthode : DEAE 301 VHP 575P, 0,75 cm x 5 cm.

Par contre, le mode d'élution des protéines est différent. Bien que toujours réalisée à l'aide d'un gradient de NaCl variant de 0 à 0,5 M, l'élution se fait ici en gradient discontinu avec des paliers de 12,5 mM/4min (Magalhães *et al.*, 2004b). Le tampon d'élution est un tampon Tris-HCl 25 mM, enrichi en anti-protéases (1µl/ml de tampon) et en NaN<sub>3</sub> (0,05 %), pH=8,5. Le débit d'élution, il est maintenu à 1ml/min. Le temps de l'analyse est de 56 min pour atteindre le palier de 0,5 M de NaCl. Les fractions sont collectées toutes les deux minutes.

### ***II. A. - 3. 2. Concentration des protéines***

Les fractions contenant la VTG purifiée sont regroupées et concentrées comme précédemment jusqu'à obtention d'un volume d'environ 1,2 ml.

La concentration protéique de cette solution de VTG pure est déterminée par le dosage BCA (Bicinchoninic Acid). Des aliquotes de 250 µl à 2 mg/ml sont alors préparées dans une solution de tampon Tris-HCl 25 mM, pH=7,4, enrichi en glycérol 50 %, pour être stockées à -20°C.

## ***II. A. - 4. Etudes électrophorétiques***

### ***II. A. - 4. 1. Electrophorèses SDS-PAGE et Native-PAGE***

La présence de VTG dans les fractions obtenues après chaque étape de chromatographie, ainsi que leur pureté, sont analysées à l'aide de deux techniques électrophorétiques discontinues sur gels de polyacrylamide (Bio-Rad) : SDS-PAGE et Native-PAGE (Laemmli, 1970). Ces techniques sont dites discontinues car elles utilisent deux gels de composition différente :

- Un gel de concentration contenant 4% d'acrylamide-bisacrylamide. La composition de ce gel est identique pour les techniques de SDS-PAGE et de Native-PAGE. Il est préparé dans un tampon Tris-HCl 1,5 M, pH=8,8.
- Un gel de séparation préparé dans un tampon Tris-HCl 0,5 M, pH=6,8 avec une concentration en acrylamide-bisacrylamide de :
  - 7,5 % pour les SDS-PAGE, qui permet de séparer des protéines de poids moléculaire inférieur à 200 kDa,
  - 6 % pour les Native-PAGE qui permet de séparer des protéines de poids moléculaire inférieur à 500 kDa.

L'électrophorèse SDS-PAGE, étant réalisée en présence de composés dénaturants comme le SDS (10 %, Bio-Rad) et le  $\beta$ -mercaptoéthanol (5 %, Bio-Rad), permet de visualiser la molécule de VTG sous sa forme monomérique délipidée. Quant à la technique Native-PAGE, elle permet d'obtenir le dimère de VTG intact.

La polymérisation des gels est induite par deux agents polymérisants : l'ammonium persulfate (0,05 %, w/v) et le TEMED (gel de concentration : 1 % ; gel de séparation : 0,5 % ; v/v). Après dépôt de 40 µg de protéines dans chaque puits, la migration est effectuée à 200 V pendant 45 min. Par la suite, les gels sont soit colorés puis séchés (Bio Rad Gel Air Dryer), soit utilisés pour réaliser des analyses en Western blot.

## ***II. A. - 4. 2. Colorations des gels***

Trois types de colorations sont utilisés pour identifier la VTG, chaque colorant permettant de mettre en évidence une des caractéristiques biochimiques de la protéine.

### ***Bleu de Coomassie***

Le Bleu de Coomassie (Bio-Rad) colore indifféremment toutes les protéines. Il sera utilisé, à la fois en SDS-PAGE et en Native-PAGE (Laemmli, 1970).

Tout d'abord, les gels sont fixés dans un mélange contenant de l'acide acétique, de l'éthanol et de l'eau ultrapure (1/4/4, v/v/v), pendant 20 min, sous agitation. Ensuite, les gels sont transférés dans une solution de bleu de Coomassie 0,15 % (w/v), pendant une nuit, toujours sous agitation. Enfin, après deux lavages des gels avec de l'eau ultrapure, les gels sont décolorés dans le mélange composé d'acide acétique, éthanol et d'eau ultrapure (1/4/4, v/v/v).

### ***Noir Soudan***

Le noir Soudan (Réactifs Ral) colore spécifiquement la partie lipidique des protéines (Prat *et al.*, 1969). Cette coloration est utilisée uniquement avec les gels obtenus en Native-PAGE.

Les gels sont colorés dans une solution composée de noir soudan (500 mg) dissout dans un mélange d'acétone (20 %), d'acide acétique (15 %) et d'eau ultrapure (65 %). Ceci pendant une nuit, à température ambiante, sous une agitation constante. Ensuite, les gels sont décolorés dans une solution contenant de l'acétone, de l'acide acétique et de l'eau ultrapure (20/15/65, v/v/v).

### ***Vert de méthyle***

Le vert de méthyle (Réactifs Ral) colore spécifiquement les groupements phosphates des protéines (Cutting et Roth, 1973). Cette coloration n'est utilisée que pour colorer les gels obtenus en Native-PAGE.

Cette coloration demande plusieurs étapes préliminaires de manière à éliminer le calcium qui pourrait interagir avec le colorant. Les gels sont, dans un premier temps, fixés dans une solution composée de 10 % d'acide sulfosalicylique (SSA, Merck), pendant 12 h. Puis, ils sont transférés dans une solution contenant 10 % de SSA et 0,5 M de  $\text{CaCl}_2$ , pendant 1 h. Les gels sont alors rincés rapidement à l'eau ultrapure et placés dans une solution de NaOH 0,5 N, pendant 30 min, à 60°C. Après deux nouvelles étapes de rinçage, de 10 min pour chacune, dans une solution aqueuse de molybdate d'ammonium 1% (w/v, LABOSI), les gels sont placés pendant 30 min, dans une solution de molybdate d'ammonium 1 % diluée dans une solution d'acide nitrique  $\text{HNO}_3$  1 N. Enfin, les gels sont transférés, pendant 30 min, dans la solution de coloration, composée de 0,5 % de vert de méthyle (w/v) dilué dans de l'acide acétique 7 %. Après cette phase de coloration, les gels sont décolorés dans une solution de SSA 10 %. L'arrêt de la décoloration s'effectue en transférant les gels dans une solution d'acide acétique 7 %. Enfin, les gels sont rincés, une dernière fois, à l'eau ultrapure avant d'être séchés.

## ***II. A. - 4. 3. Western blot et Séquençage protéique***

Quarante microgrammes de protéines plasmatiques sont déposés dans chaque puits d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 7,5 %. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) préalablement activée dans une solution de méthanol pure, puis lavée dans de l'eau ultrapure et dans le tampon de transfert (Tris-Base 25 mM, glycine 192 mM, 20 % de méthanol v/v, pH=8,3). Un " sandwich renfermant " le gel et la membrane entre deux papiers wattman et deux pads, est alors réalisé. L'ensemble est placé dans un appareil Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad), immergé dans du tampon de transfert. Le transfert s'effectue sous une tension de 100 volts, pendant 1 heure, à 4°C (Figure 16).



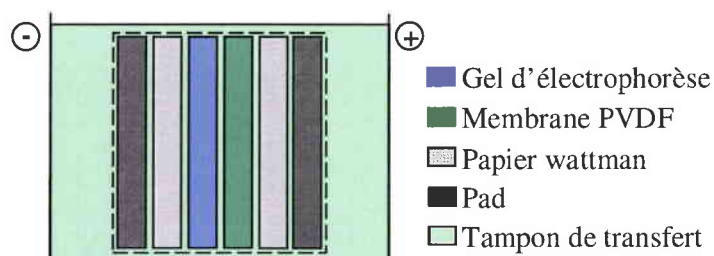


Figure 16 : Schéma de préparation du blot pour le transfert

Après le transfert, la membrane est colorée dans une solution de bleu de Coomassie 0,15 %, pendant 5 min environ. Puis, la membrane est décolorée dans une solution composée d'acide acétique, de méthanol et d'eau ultrapure (1/4/4). Les bandes de VTG visibles (environ 130 kDa) sont alors découpées et stockées dans un tube stérile contenant du tampon PBS, pH=7,4, enrichi en anti-protéases (5 µl/ml).

Les bandes sont ensuite placées dans un système d'extraction protéique de type 476A Applied Biosystem. La partie N-terminale de la séquence en acide aminé de la protéine de 130-140 kDa a ensuite été déterminée à l'aide d'un séquenceur Edman (Edman et Cooper, 1968) et les séquences obtenues ont été comparées avec celles répertoriées dans la base de donnée "BLAST protein database" (Altschul *et al.*, 1997). Cette partie de l'étude a été réalisée par le Service Commun de Séquençage des Protéines (SCSP) de l'Université Poincaré, Nancy I, par Mr Frank Saulnier.

## ***II. B. Production des anticorps monoclonaux spécifiques de la vitellogénine***

### ***II. B. - 1. Immunisation des souris***

Les souris utilisées pour obtenir les hybridomes producteurs d'anticorps monoclonaux spécifiques de la VTG, sont des souris BALB/c femelles (élevage Janvier, France), âgées de trois semaines, n'ayant jamais été gestantes.

Les souris sont immunisées par 3 injections intrapéritonéales effectuées tous les 15 jours, contenant, chacune, 200 µg de VTG pure dilués dans de l'adjuvant incomplet de Freund (v/v ; Sigma). Quatre jours avant leur sacrifice, les souris reçoivent un rappel intraveineux de 20 µg de VTG dilués dans 50 µl de sérum physiologique (NaCl 9 %, w/v) (Melchior *et al.*, 2001).

Afin de réduire les risques de contaminations par d'autres antigènes, les animaux sont maintenus dans une atmosphère aseptisée tout le long de l'expérience. Leur nourriture est, par exemple, systématiquement autoclavée (120°C ; 20 min) et l'eau est toujours filtrée (0,22 µm).

### ***II. B. - 2. Culture cellulaire***

Les hybridomes producteurs d'Acms sont obtenus et isolés après :

- la fusion entre des cellules myélomateuses SP2/O et les splénocytes prélevés dans la rate des souris immunisées,
- et le clonage des différents hybrides.

Pour la réalisation du clonage, un troisième type cellulaire est utilisé : les macrophages péritonéaux.

Au cours de ces différentes étapes, deux milieux de culture différents interviennent :

- un milieu complet : pour la culture quotidienne des SP2/O et des hybridomes après le clonage,
- un milieu enrichi : pour la culture des hybrides après la fusion et pendant le clonage.

## ***II. B. - 2. 1. Les cellules***

### ***Culture des SP2/O***

Les SP2/O sont une lignée de cellules issues de myélomes de souris. Elles sont immortelles et peuvent être cultivées dans du milieu complet. Les cultures sont effectuées dans des flacons de 80 cm<sup>2</sup> contenant 35 ml de milieu complet. Tous les 4 jours, les cellules sont décollées du fond des flacons, par aspiration-refoulement, et remises en culture par dilution au 1/40<sup>ème</sup> dans du milieu complet neuf (Melchior, 1998).

### ***Culture des macrophages péritonéaux***

Les macrophages utilisés pour la culture des hybridomes, pour le clonage ou pour produire le milieu conditionné, sont des macrophages péritonéaux issus de souris BALB/c femelles âgées de 19 semaines ayant été plusieurs fois gestantes. Ces cellules nourricières aident à la culture des hybridomes car elles possèdent, entre autres, la capacité de phagocyter des débris cellulaires toxiques pour les hybridomes.

Après le sacrifice des souris par dislocation cervicale, les macrophages sont décollés du péritoine par aspiration-refoulement de 10 à 15 ml de RPMI 1640 (sans L-glutamine), à l'aide d'une seringue. La concentration des macrophages dans la suspension cellulaire récupérée est alors évaluée par comptage sur cellule de Malassez, après coloration d'exclusion au Bleu de Trypan. Une partie des macrophages est, ensuite, congelée dans des cryotubes, à -80 °C, à raison de 2.10<sup>6</sup> cellules/ml par tube dans un milieu complet contenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO ; Sigma) (Melchior, 1998).

Une autre partie des macrophages est également utilisée pour produire du milieu conditionné. Dans des flacons de culture de 80 cm<sup>2</sup>, 4.10<sup>5</sup> macrophages/ml sont déposés dans 40 ml de milieu complet. Ces flacons sont ensuite placés dans l'incubateur à CO<sub>2</sub> pendant 24 heures. Leur contenu est, alors, centrifugé à 1500 x g, pendant 10 min. Puis, les surnageants sont récupérés et filtrés à 0,1 µm pour être enfin congelés à - 80 °C en aliquotes de 40 ml. Ce milieu, contenant des facteurs de croissance et des éléments nutritifs libérés par les macrophages, est utilisée au cours du clonage.

## ***II. B. - 2. 2. Milieux de culture***

### ***Milieu complet***

Les différents types cellulaires utilisés pour la production des hybridomes, les SP2/O, les splénocytes et les macrophages mais également les hybridomes après sélection, sont cultivés dans un milieu complet spécifique composé de :

- RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute 1640, sans glutamine, Sigma)
- de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma) : 10 % (v/v)
- de L-glutamine (L-glu, Gibco) :  $2.10^{-3}$  mol/l,
- de pyruvate de sodium (Sigma) :  $2.10^{-3}$  mol/l,
- d'un mélange d'antibiotiques, la pénicilline et la streptomycine (Sigma) : 0,2 g/l et 0,2 U/l, respectivement,
- et de  $\beta$ -mercapthoéthanol (Sigma) :  $5.10^{-5}$  mol/l (Melchior, 1998).

### ***Milieu complet enrichi***

Le milieu complet enrichi nécessaire au clonage et pour les premières semaines de culture des hybrides. Il s'agit d'un milieu complet enrichi en SVF (15 %), en Interleukine 6 (0,2 ng/ml ; IL-6), et en hybridokine (2,5 %) (Melchior, 1998).

## ***II. B. - 3. Fusion***

### ***II. B. - 3. 1. Préparation de la culture des SP2/O***

Quinze jours avant la fusion, plusieurs flacons de SP2/O sont mis en culture. Les cellules sont dissociées et centrifugées à 1500 x g, pendant 10 min. Après avoir éliminé les surnageants, les cellules sont remises en suspension dans un volume de 10 ml environ de RPMI 1640 (sans L-glu), et la concentration cellulaire en SP2/O est évaluée par comptage.

### ***II. B. - 3. 2. Obtention des splénocytes***

Les souris immunisées sont sacrifiées par dislocation cervicale, désinfectées par trempage dans un bain d'alcool (70°) et placées sous hotte à flux laminaire. La rate est prélevée, après dissection avec du matériel stérile (autoclavage : 120°C ; 20 min) et placée dans une boîte de Pétrie. La rate est ensuite lavée dans du RPMI 1640 (sans L-glu) avant d'être vidée de ses splénocytes. Ces derniers sont alors repris dans 30 ml de RPMI 1640 (sans L-glu) et les amas cellulaires disloqués. La suspension cellulaire est ensuite transférée dans un flacon stérile et placé dans une étuve à 37°C, pendant 10 min pour décantation. Le surnageant est récupéré dans un nouveau flacon stérile et centrifugé à 1500 x g pendant 5 min. Le culot obtenu est alors remis en suspension dans 50 ml de RPMI 1640 (sans L-glu) et la concentration cellulaire est déterminée (Melchior, 1998).

### ***II. B. - 3. 3. Protocole de fusion***

Le protocole de fusion utilisé pour produire les hybridomes producteurs d'Acms anti-VTG, est basé sur le protocole développé par Galfré et Milstein (1981), modifié par Melchior *et al.* (2001).

Les SP2/O et les splénocytes sont mélangés selon le ratio de 1 SP2/O pour 2 splénocytes. Après avoir homogénéisé la suspension cellulaire obtenue, par agitation douce au vortex, pendant 30 s, elle est centrifugée à 1500 x g, pendant 5 min. Le surnageant est alors éliminé et l'agent de fusion, le PEG<sub>1500</sub> (Polyéthylène glycol, Sigma) est ajouté, à raison de 1 ml pour 10<sup>8</sup> cellules à fusionner (= 1 volume de PEG). Cette opération est réalisée sur 1 minute, en prenant la précaution de remettre le culot, délicatement, en suspension. L'ensemble est, ensuite, placé au bain-marie, à 37°C, pendant 90 s, sous une agitation faible. Puis, le PEG est dilué, en ajoutant successivement des volumes de RPMI 1640 (sans L-glu), équivalents à 1 volume de PEG (1 V<sub>PEG</sub>), à 5 fois le volume de PEG (5 V<sub>PEG</sub>) et 15 V<sub>PEG</sub>, toujours en 1 min à chaque fois.

### ***II. B. - 3. 4. Mise en culture des hybrides***

Après un repos de 10 min, la suspension des cellules fusionnées est centrifugée à 1500 x g, pendant 5 min. Le culot est repris dans du milieu complet enrichi (Voir *II.B-2.2.*), pour obtenir une concentration cellulaire finale de 5,7 millions de cellules/ml. Enfin, 50 µl de cette suspension cellulaire sont distribués dans chaque puits de plusieurs plaques de culture 96 puits (P96), dans lesquelles auront été déposés, la veille, 100 µl de macrophages à la concentration de 10500 cellules/100µl/puits suspendus dans du milieu complet enrichi. Puis, les P96 sont placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>, pendant 4 heures (Melchior *et al.*, 2001).

### ***II. B. - 4. Sélection des hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques de la vitellogénine***

#### ***II. B. - 4. 1. Sélection des hybridomes issus de la fusion entre 1 SP2/O et 1 splénocytes***

Pour sélectionner les hybrides issus de la fusion d'1 SP2/O et d'1 splénocyte, 100 µl de milieu complet enrichi contenant l'agent sélectif, le HAT 2,5 fois concentré (Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine ; Sigma), sont ajoutés dans chaque puits. En effet, seuls ces hybrides seront capables de se développer dans ce milieu. L'ensemble sera incubé pendant 10 à 15 jours. Tous les 4 jours, la moitié du volume de surnageant de culture de chaque puits sera remplacé par du milieu complet enrichi, contenant du HAT (Melchior *et al.*, 2001).

#### ***II. B. - 4. 2. Sélection des hybridomes producteurs d'Anticorps monoclonaux anti-VTG***

Le suivi du développement des hybridomes se fait par observation au microscope. Quand, les clones développés, recouvrent 50 % de la surface du fond des puits, un test ELISA indirect est réalisé. Il a pour but de sélectionner, parmi les clones se développant, ceux qui produisent des anticorps (Acs) anti-VTG.

Le protocole du test ELISA est le suivant :

- Les puits des plaques ELISA sensibilisés avec 50 µl d'une solution à 200 ng/ml de VTG purifiée sont ainsi incubés une nuit à 4°C.
- Puis, les plaques sont lavées de trois fois, avec du PBS, pH=7,4, contenant 0,05 % de Tween 20 (v/v, PBST ; Sigma).
- Les sites non spécifiques sont alors saturés avec une solution à 1% de BSA (Bovine Serum Albumin ; Sigma) dans du PBS (250 µl/puits) et l'ensemble est incubé, pendant 90 min, à 37 °C.
- Après lavage des plaques, comme décrit précédemment, 50 µl de surnageant de culture à tester sont ajoutés dans chaque puits, suivi d'une incubation d'une heure.
- Puis, après une nouvelle étape de lavage, 50 µl/puits de la solution d'Acs secondaire couplé à la peroxydase sont ajoutés, à une dilution de 1/5000<sup>ième</sup>, dans les plaques ELISA qui sont remises à l'étuve, à 37°C, pendant 60 min.
- Enfin après une nouvelle étape de lavage, 50 µl/puits du substrat de la peroxydase, le O-phénylènediamine dihydrochloride (OPD ; Sigma), sont ajoutés. Les plaques sont alors, gardées à l'abri de la lumière et à température ambiante, pendant 30 min.
- La réaction est arrêtée, par ajout de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M dans chaque puits.
- Après 5 minutes, l'absorbance est lue à 492 nm.

## ***II. B. - 5. Clonage***

Le clonage a pour but d'obtenir des cellules issues d'une seule cellule mère afin que chaque clone soit producteur d'un type d'Acs dirigé contre un épitope particulier de la VTG. Deux techniques sont utilisées : le premier clonage est fait en milieu liquide par dilution limite et le suivant en milieu semi-solide constitué d'agar noble 3% (Galfré et Milstein, 1981, Melchior, 1998, Melchior *et al.*, 2001).

### II. B. - 5. 1. Par dilution limite

Des dilutions successives au  $\frac{1}{2}$  sont réalisées dans des plaques de culture P96 (Melchior, 1998). Dans tous les puits, sont distribués 100  $\mu$ l de milieu complet enrichi. Dans chaque puits de la première colonne, 100  $\mu$ l de suspension cellulaire sont ajoutés. Puis, 100  $\mu$ l de ces mélanges sont transférés dans les puits de la colonne suivante, et ainsi de suite (Figure 17).

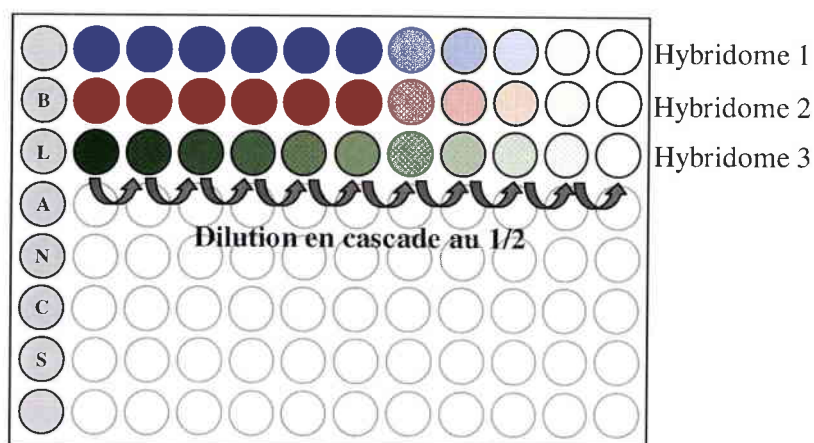


Figure 17 : Préparation d'une plaque de culture pour le clonage par dilution limite.

Les P96 sont incubées pendant 7 à 10 jours et la multiplication des cellules est suivie journalièrement, par observation au microscope. Les clones issus des puits contenant 1 à 3 cellules après la dilution limite sont sélectionnés et remis en culture dans des plaques de culture 24 puits (P24), pour subir une deuxième étape de clonage en agar noble 3 %.

### II. B. - 5. 2. En agar noble 3 %

La solution d'Agar noble 3 % (w/v, DIFCO), utilisée dans cette méthode de clonage, est préparée dans de l'eau distillée. L'ensemble non mélangé est, directement, autoclavé, pendant 30 min, sous une pression d'une  $\frac{1}{2}$  atmosphère, puis stocké à 4°C.

Ce type de clonage est réalisé dans des plaques de culture 6 puits (P6). Elle nécessite la préparation de deux couches superposées : la couche nourricière et la couche de clonage (Melchior *et al.*, 2001).



### ***La couche nourricière***

La couche nourricière contient des macrophages péritonéaux, de l'interleukine 6 (IL-6) et de l'hybridokine qui est un facteur de croissance pour les hybridomes (Interchim) qui vont aider au développement des clones. Cette couche est préparée, au minimum, 24 heures avant le clonage.

La solution composant cette couche nourricière est constituée de :

- 50 ml d'une solution d'Agar noble 3 %, préalablement solubilisée à 200-250°C et placée au bain-marie à 44°C,
- 200 ml d'une solution de milieu complet enrichi en IL-6 (0,2 ng/ml, Sigma) et en hybridokine (2,5 %, Interchim), placée également à 44°C,
- et 8 millions de macrophages décongelés, extemporanément.

Quatre millilitres de ce mélange sont ensuite distribués dans chaque puits des P6. Après solidification de la couche nourricière, les P6 sont placées dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>.

### ***Couche de clonage***

Cette couche est constituée du mélange de 6,5 ml d'une solution d'Agar noble 3 %, préalablement solubilisée à 200-250°C et placé au bain-marie à 44°C, et de 24 ml de milieu complet enrichi en IL-6 (0,2 ng/ml, Sigma) et en hybridokine (2,5 %, Interchim) également à 44 C.

Parallèlement, à partir des suspensions cellulaires issues des puits sélectionnés après le test ELISA, trois solutions diluées au 1/10<sup>ième</sup>, 1/100<sup>ième</sup> et 1/1000<sup>ième</sup> sont préparées dans 500 µl. Puis, 500 µl de la solution de la couche de clonage préparée précédemment sont ajoutés à chaque suspension et le mélange est déposé dans un puits de P6 sur la couche nourricière préalablement préparée (Voir II.B.-5.2./*Couche nourricière*). Après solidification de cette deuxième couches, les P6 sont placées pendant 10 jours dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>, à 37°C.

La suspension cellulaire restante dans chaque puits sélectionné en ELISA, est alors mise en culture dans des P24 avec 500 µl de milieu conditionné. Après une semaine de culture, 1 ml de milieu conditionné est ajouté. Ces cultures seront entretenues jusqu'à la sélection définitive des clones.

### ***II. B. - 5. 3. Repiquage des clones***

Au bout de 15 jours de culture, les colonies cellulaires les plus isolées, sont prélevées individuellement à l'aide d'une pipette pasteur. Elles sont transférées dans un puits de P24 contenant 500 µl de milieu conditionné puis laissées au repos pendant 24 h dans l'incubateur à CO<sub>2</sub>. Tous les puits reçoivent alors 1 ml de milieu complet enrichi. Enfin, les clones sont dissociés par aspiration-refoulement.

## ***II. B. - 6. Production des anticorps monoclonaux***

### ***II. B. - 6. 1. Culture des hybridomes***

La culture des clones sélectionnés est étendue en flacon de culture de 80 cm<sup>2</sup> : 500 µl de suspension cellulaire sont remis en culture dans 35 ml de milieu, tout d'abord de type complet enrichi (Voir *II.B.-2.2*). Puis, le pourcentage de SVF et la concentration d'IL-6 sont diminués jusqu'à obtenir un milieu complet (Voir *II.B.-2.2*). Le repiquage des hybridomes se fait ensuite tous les 4 jours.

Les surnageants de culture, restant après le repiquage, sont récupérés après centrifugation à 1500 x g pendant 10 min, pour éliminer les cellules en suspension. Ils sont stockés à -20°C avec 10 % de glycérol jusqu'à la purification des Acms.

### ***II. B. - 6. 2. Purification des anticorps monoclonaux***

#### ***Par chromatographie d'affinité***

Les Acms sécrétés par les hybridomes, sont isolés des autres constituants du milieu de culture par chromatographie d'affinité à base de protéine G (Ultralink<sup>TM</sup> Immobilized Protein G, Pierce). La colonne est préalablement lavée avec 30 ml de tampon de fixation (Pierce), puis équilibrée avec 50 ml de ce même tampon. L'échantillon de surnageant de culture est dilué au 1/2 dans du tampon de fixation, puis l'ensemble est déposé sur la colonne. Après le passage de l'échantillon, la colonne est lavée avec 100 ml de tampon de fixation. Les Acms se lient par leur

groupement Fc, à la protéine G. L'élution des Acms se fait par ajout de 30 ml de tampon d'élution (Pierce) qui va abaisser le pH aux alentours de 3, ce qui favorise leur décrochement de la colonne. Des fractions de 1 ml sont récoltées et le pH est immédiatement neutralisé par ajout de 100  $\mu$ l de Tris 1M (pH=7,5). L'élution est suivie en spectrophotométrie à 280 nm.

### ***Par précipitation au sulfate d'ammonium***

La purification des Acms par la méthode de précipitation au sulfate d'ammonium consiste à mélanger un volume donné de surnageants de culture avec une solution de sulfate d'ammonium saturée, préparée au moins 24 heures avant la purification. Selon le degré de purification et la concentration en Acms souhaitée, le pourcentage final de sulfate d'ammonium est différent :

- Avec une concentration finale en sulfate d'ammonium de 35 %, les Acms précipités sont purs, mais seulement 25 % des Acms présents dans le surnageant de culture auront été précipités ;
- Avec une concentration finale de 45 %, tous les Acms contenus dans le surnageant de culture sont précipités, mais l'albumine provenant du SVF présent dans le milieu complet sera également précipitée.

Pour un volume de 25 ml de surnageant de culture, il faut donc ajouter 13,5 ou 20,5 ml de la solution froide de sulfate d'ammonium saturée pour obtenir les concentrations finales de 35 ou 45 %, respectivement. Cet ajout se fait au goutte-à-goutte, dans la glace fondante. L'ensemble est alors placé à 4°C, pendant une nuit, sous agitation faible. Les précipités obtenus sont alors séparés après centrifugation à 6000 x g pendant 20 min, à 4°C. Ils sont ensuite égouttés et dissous dans 2,5 ml d'une solution froide de PBS, pH=7,4 supplémentée en anti-protéases (1 $\mu$ l/ml, Sigma) et en NaN<sub>3</sub> (0,05 %). Le mélange est alors complété par 2,5 ml de ce même tampon.

### ***Dialyse et concentration des Acms***

Les solutions d'Acms purifiés sont dialysées contre un tampon PBS, pH=7,4, supplémenté en anti-protéases (1 $\mu$ l/ml) et en NaN<sub>3</sub> (0,05 %) (= tampon de dialyse) pour éliminer

les sels apportés par les méthodes de purifications (Tris 1M, sulfate d'ammonium). Pour cela, les solutions d'Acms sont distribuées dans des boudins de dialyse Spectra/Por ® dont le seuil de coupure est de 3 kDa (Spectrum laboratories Inc.), pour ne laisser passer que les sels. Chaque boudin est alors placé dans un erlenmeyer de 250 ml, rempli de tampon de dialyse. L'ensemble est mis au réfrigérateur, à 4°C, pendant 17 heures, sous une agitation orbitale faible. Trois changements de tampons seront effectués pendant cette période.

Les solutions d'Acms dialysées sont ensuite récupérées pour être concentrées par ultrafiltration à l'aide de tubes Vivaspın 6ml (Vivascience) dont le seuil de coupure est de 50 kDa. Cette solution est centrifugée à 3000 x g, à 4°C, pendant 20 à 30 min de manière à obtenir un volume final d'environ 1,2 ml.

La concentration protéique de cette solution est alors déterminée (Voir II.D.-3.2.1.), et plusieurs aliquotes de 4, 2, 1 mg/ml sont préparés dans un tampon identique à celui utilisé pour la dialyse. Certains de ces aliquotes reçoivent 50 % de glycérol pour la cryopréservation. Ces aliquotes sont stockés à -20°C jusqu'à analyse par western blotting (aliquotes avec glycérol) ou utilisation pour le test d'agglutination (aliquotes sans glycérol).

### ***Analyse des solutions d'anticorps purifiés par SDS-PAGE et Western blot***

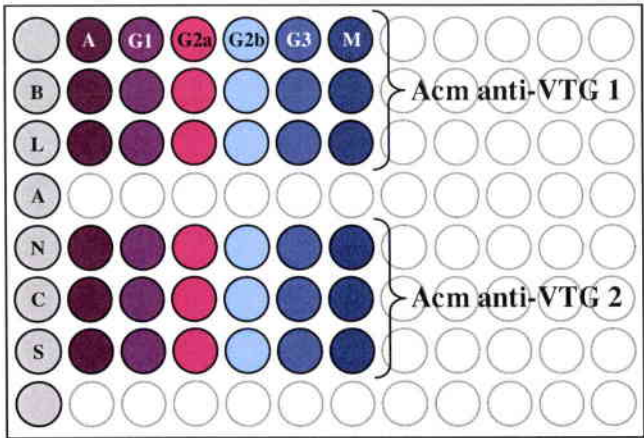
Les différentes solutions d'Acms obtenues après la culture, la purification, la dialyse et la concentration, sont analysées par SDS-PAGE et Western blotting pour vérifier l'intégrité des Acms.

Les gels d'électrophorèse sont préparés selon le protocole utilisé pour l'analyse en SDS-PAGE (7,5%) des solutions purifiées de VTG (Voir II.A.-4.1.). Quarante microgrammes de protéines sont déposés dans un puits de chacun des deux gels. La migration des protéines se déroule sous 100 V pendant 1 heure. Un des deux gels est coloré au bleu de Coomassie 0,15 %. Quant à l'autre, il est utilisé pour effectuer le Western blot. Le protocole suivi est identique à celui utilisé pour l'étude de la VTG (Voir II.A.-4.3.). Après transfert, la membrane est lavée dans du tampon TBS (Tris Buffer Saline) pendant 10 min. Les sites non-spécifiques sont bloqués par incubation de la membrane pendant une nuit à 4°C, dans une solution de TBS contenant 1% de BSA. Après trois rinçages dans du TTBS (TBS-0,05 % de Tween 20) de 10 min chacun, la

membrane est incubée 1 heure à 37°C en présence de l’anti-IgG couplé à la phosphatase alcaline (1/5000). La membrane est ensuite rincée trois fois à nouveau avec du TTBS et deux fois avec du TBS afin d’éliminer le Tween 20. Pour la révélation de l’immunoblot, la membrane est incubée, à température ambiante, dans du tampon substrat (Tris 100 mM, pH=9,5, contenant, 100 mM de NaCl et 5 mM de MgCl<sub>2</sub>) dans lequel sont ajoutés 1 ml d’une solution de nitrobluetetrazolium (30 mg de NBT/ml de diméthylformamide 70 %, BioRad) et 1 ml d’une solution de 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (15 mg de BCIP/ml de DMF 100 %, BioRad).

**II. B. - 6. 3. Isotypage des anticorps monoclonaux**

L’isotype des différents Acms anti-VTG sélectionnés est déterminé à l’aide d’un kit d’isotypage (Sigma). Ce dernier est constitué de 6 solutions d’Acs de chèvre spécifiques des différents isotypes d’immunoglobulines de souris : Ig A, G1, G2a, G2b, G3 et Ig M (solutions d’isotypage), et d’une solution d’Acs de chèvre marqués à la peroxydase, spécifiques des groupements Fabs des Igs de souris (Acs secondaire). Ces différentes solutions servent à réaliser un test ELISA capture. Tout d’abord, les plaques ELISA ont été tapissées avec les solutions d’isotypage (100 µl/puits au 1/1000<sup>ième</sup>), conformément à la disposition présentée dans la figure 18.



**Figure 18 :** Exemple de préparation d’une plaque ELISA pour l’isotypage de 2 Acms anti-VTG.

L’ensemble est incubé 1 heure, à 37°C. Après trois lavages avec du TPBS (PBS + 0,05 % de Tween 20), les solutions d’Acms sont déposées à leur tour (100 µl/puits d’une solution

d'Acms dont la concentration est comprise entre 2 et 5  $\mu\text{g/ml}$ ) (Figure 18). La plaque est remise à incuber à nouveau 1 heure à 37°C. Une nouvelle étape de lavage est alors réalisée et 100  $\mu\text{l}$  de la solution d'Acs secondaire (1/600) sont distribués dans chaque puits de la plaque. Après, une nouvelle incubation de 30 min, à température ambiante, la plaque est lavée et 50  $\mu\text{l}$ /puits d'OPD sont déposés. La coloration est arrêtée au bout de 30 min d'incubation, à température ambiante et à l'abri de la lumière, par ajout de 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3M. Puis l'absorbance est mesurée, après 5 min, par lecture spectrophotométrique à 492 nm.

## ***II. C. Sélection des anticorps monoclonaux multi-espèces***

### ***II. C. - 1. Les poissons***

#### ***II. C. - 1. 1. Prélèvement in situ***

Plusieurs poissons (2 à 3 poissons par espèce) issus de différentes espèces de cyprinidés ont été capturés, par pêche électrique, dans la Moselle (à Châtel-sur-Moselle) : chevesne (*Leusiscus cephalus*), vandoise (*Leusiscus leusiscus*), hotu (*Chondrostoma nasus*), barbeau (*Barbus barbus*), gardon (*Rutilus rutilus*) et rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*). De plus, des perches (*Perca fluviatilis*) de la famille des percidés ont également été pêchées sur ce site. Ces différents poissons sont utilisés pour sélectionner l'Acm capable de reconnaître les molécules de VTGs de ces différentes espèces.

#### ***II. C. - 1. 2. Traitement des perches***

Huit perches (*Perca fluviatilis*), de 200 à 250 g, acquises auprès de l'Aquarium de Nancy (France) ont été utilisées pour produire de la VTG selon le même protocole que celui utilisé pour les carpes (Voir II.A-1.2.).

### ***II. C. - 2. Etudes histologiques***

#### ***II. C. - 2. 1. Réalisation des coupes***

Les poissons sont sacrifiés par choc thermique et disséqués. Le foie et les gonades sont alors prélevés et deux morceaux de chaque organe sont découpés et placés dans des filets de tulle numérotés. Ces filets sont alors immergés dans un liquide de fixation (liquide de Bouin) pendant 24 à 48 heures maximum. Après plusieurs lavages à l'eau, les prélèvements sont stockés dans une solution d'alcool à 70 %.

Avant le paraffinage, les prélèvements sont déshydratés par passages successifs dans deux bains d'alcool (95 %), un bain à 100 % et un dernier de toluène. Ils sont ensuite transférés dans un bain de paraffine liquide, pendant une nuit, à 60°C. Ils sont alors placés dans des moules, formés

de deux barres de Leuckart, pour être inclus dans un bloc de paraffine. Il faut attendre au minimum 24 heures, à température ambiante pour que les blocs soient suffisamment durcis pour être démoulés et coupés (Martoja et Martoja-Pierson, 1967).

Des coupes de 5  $\mu$ m sont réalisées à l'aide d'un microtome de Minot.

## ***II. C. - 2. 2. Coloration des coupes***

Avant la coloration, proprement dite, les coupes doivent être réhydratées. Pour cela, les lames sont passées dans deux bains successifs de Toluène, trois d'alcool (100°, 95°, 70°) et un d'eau déminéralisée.

La coloration se fait en deux étapes. Premièrement, les coupes sont colorées avec de l'hématoxyline de Harris pendant 5 min. Les lames sont alors lavées 2 fois pendant 2 min avec de l'eau. Puis, après un bain rapide dans de l'alcool à 70 %, les coupes sont colorées avec de l'éosine Y pendant 1 min (solution mère : 2 g d'éosine Y dissout à chaud dans 40 ml d'eau bidistillée ; solution de coloration : 20 ml de la solution mère mélangé avec 60 ml d'alcool 80 % et 0,4 ml d'acide acétique glacial).

Ensuite, les coupes sont à nouveau déshydratées par passages successifs dans trois bains d'alcool (70, 90 et 100 %) et un de toluène. Les lamelles sont alors rapidement positionnées et collées sur les lames avec un liquide de montage Eukitt, avant le séchage du toluène.

## ***II. C. - 3. Etude de l'affinité des anticorps monoclonaux***

### ***II. C. - 3. 1. Western blotting***

Des échantillons plasmatiques issus des poissons préalablement cités sont dilués dans du tampon Native (40 % glycérol, 0.02 % bleu de bromophénol, 0.5 M Tris-HCl pH=6,8). Les protéines de ces différents échantillons sont alors séparées par électrophorèse Native-PAGE 5,5 % (Laemmli, 1970), pendant 45 min à 200 V (Voir II.A.-4.1.).

Après la migration, les protéines sont transférées sur des membranes PVDF pendant 1 heure à 100 V à l'aide d'un appareil Mini Transblot (Bio-Rad), selon le même protocole que celui mentionné préalablement (Voir II.A.-4.3.).



Après le transfert, les membranes sont lavées deux fois dans du TTBS, puis les sites non-spécifiques sont bloqués avec une solution de BSA 1 %, pendant une nuit, à 4°C. Les membranes sont, ensuite à nouveau, lavées 3 fois avec du TTBS et chacune d'elles est incubée 1 heure, à 37°C avec un surnageant de culture issu de chaque hybridome diluée au 1/100<sup>ième</sup> dans du TBS. Après une nouvelle étape de lavage, toutes les membranes sont incubées avec une solution d'Acs anti-IgG de souris marqués à la phosphatase alcaline (Interchim) diluée au 1/5000 dans du TBS, pendant 1 heure, à 37°C. Trois nouveaux lavages au TTBS et deux supplémentaires au TBS sont alors effectués. La révélation de l'immunoblot est réalisée par immersion dans une solution contenant les substrats de la phosphatase alcaline : le NBT et le BCIP préparés selon le protocole mentionné précédemment.

### ***II. C. - 3. 2. ELISA***

Des dilutions plasmatiques de 1/100<sup>ième</sup> à 1/1000000<sup>ième</sup>, sont préparées à partir du plasma de chaque poisson, dans du tampon carbonate-bicarbonate (pH=9,6) directement dans des plaques ELISA (96 puits, Nunc) de manière à obtenir un volume final de 100µl/puits. Parallèlement, une gamme d'étalonnage de 15 à 1000 ng/ml est préparée à partir d'une solution standard de VTG pure de carpe. L'ensemble est incubé une nuit à 4°C. Les plaques cotées sont alors lavées, à trois reprises avec du tampon PBS-Tween 20 (0,05 %, v/v) et les sites non-spécifiques sont bloqués avec une solution de BSA 1%, pendant 90 min, à 37°C. Après trois nouveaux lavages, les plaques sont incubées avec les Acms anti-VTG de carpe (4 ng/ml, 100 µl/puits) pendant 1 heure à 37°C. Après une nouvelle étape de lavage, 50 µl de la solution d'Acs secondaire couplée à la peroxydase (1/5000<sup>ième</sup>) sont distribués dans chaque puits suivi d'une incubation à 37°C, pendant 60 min. Après une dernière étape de lavage, 50 µl du substrat de la peroxydase, l'OPD, sont dispensés dans chaque puits. Les plaques sont alors, gardées à l'abri de la lumière et à température ambiante, pendant 30 min. Puis, la réaction est arrêtée, par ajout de 50 µl/puits de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3M et enfin, après 5 min, l'absorbance est lue à 492 nm.

## II. D. Développement du test d'agglutination

### II. D. - 1. Protocole d'adsorption des anticorps monoclonaux

#### II. D. - 1. 1. Principe

Les Acms sont adsorbés sur les billes de latex par simple contact (Figure 19).

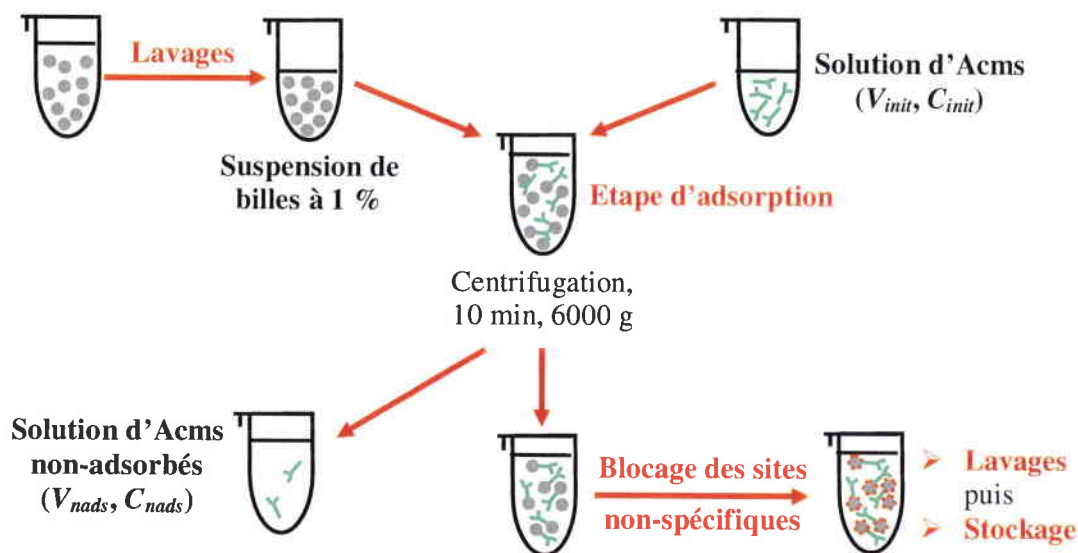


Figure 19 : Principe de la méthode d'adsorption des anticorps monoclonaux sur les billes de latex.

Les billes sont stockées dans de l'eau distillée contenant de l'azide de sodium (0,1 % de  $\text{NaN}_3$ ). Avant l'adsorption des Acms, les billes sont lavées dans un tampon d'adsorption, spécifique du type de billes. L'échantillon de billes est, dans un premier temps, centrifugé à  $6000 \times g$  pendant 10 min. La solution de stockage est alors éliminée et les billes sont remises en suspension dans le tampon d'adsorption, de manière à obtenir une suspension à 1 % (w/v). Cette étape de lavage est réalisée à nouveau deux fois.

La suspension de billes et la solution d'Acms (à une concentration  $C_{init}$ ) sont alors mélangées à volume égal ( $V_{init}$ ). L'ensemble est agité par des mouvements de rotation, selon une procédure temps/température spécifique de chaque type de billes. Ensuite, le mélange est centrifugé à  $6000 \times g$  pendant 10 min. Le surnageant est, alors récupéré, et son volume exact est

consigné ( $V_{nads}$ ) avant son stockage à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Cette solution sera utilisée ultérieurement pour déterminer la quantité d'Acms non-adsorbés ( $Q_{nads}$ ) sur les billes.

Les billes sont remises en suspension dans du tampon d'adsorption contenant 1 % de BSA. L'ensemble est incubé selon un schéma temps/température spécifique du type de billes. Afin de saturer les sites spécifiques, la solution de BSA est éliminée après centrifugation et trois nouveaux lavages sont effectués avec une solution de stockage spécifique : tampon PBS,  $\text{pH}=7,4$ , avec 1 % de BSA (w/v), 0,05 % de  $\text{NaN}_3$  (w/v), 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  d'anti-protéases et 5 % de glycérol (v/v), filtré sur 0,22  $\mu\text{m}$ . Les billes recouvertes d'Acms (1%, w/v) sont alors stockées à  $4^{\circ}\text{C}$ , à l'abri de la lumière.

### ***II. D. - 1. 2. Pour les billes de 2 $\mu\text{m}$***

Les premières billes testées pour mettre au point le test d'agglutination sont des particules de latex de 2  $\mu\text{m}$  (Interfacial Dynamics Corp., USA) dont la concentration massique est égale 4,3 % (w/v). Le protocole développé pour adsorber les Acms anti-VTG sur ces billes de 2  $\mu\text{m}$  est basé sur celui développé par Ramadass *et al.* (1999) (Ramadass *et al.*, 1999).

Le tampon d'adsorption utilisé dans ce protocole est un tampon carbonate-bicarbonate 0,5 M,  $\text{pH}=9,6$  (Tampon Ca-biCa), contenant du  $\text{NaN}_3$  (0,05 %). La mise en contact des billes et des Acms, pendant l'étape d'adsorption, s'effectue pendant une nuit, à température ambiante. Quant au blocage des sites non-spécifiques par la solution de BSA 1% préparée dans du tampon Ca-biCa, il dure entre 4 à 5 heures, toujours à température ambiante.

### ***II. D. - 1. 3. Pour le billes de 1 $\mu\text{m}$***

Les billes de 1  $\mu\text{m}$  sont des billes de latex Blue Dyed 2,5 % (w/v ; Biovalley, Polysciences, USA). Deux protocoles ont été développés pour adsorber les Acms sur ces billes de 1  $\mu\text{m}$  (Magalhães *et al.*, 2004a, Magalhães *et al.*, 2004c) basés, à la fois, sur les protocoles de Ramadass *et al.* (1999) et de Molina-Bolívar *et al.* (1999) ainsi que sur les instructions du fabricant.

Le premier protocole est, dans son principe, identique à celui développé pour les billes de 2  $\mu\text{m}$ . Le seul changement concerne l'étape d'adsorption où le tampon d'adsorption est remplacé

par un tampon Borate 0,1 M (pH=8,5) contenant 0,05 % de  $\text{NaN}_3$ . Les sites non-spécifiques sont également bloqués avec une solution de BSA 1 % préparée avec du tampon borate. L'ensemble est placé une nuit, à 4°C, sous agitation rotative. Le lendemain, deux nouvelles étapes de blocage sont effectuées, chacune d'une demie heure, à 37°C. Ensuite les billes recouvertes d'Acms sont lavées et stockées dans le tampon de stockage, à 4°C, à l'abri de la lumière (Magalhães *et al.*, 2004c).

Un deuxième protocole a été testé avec ce type de billes de manière à améliorer l'adsorption des Acms, avec comme premier changement le tampon d'adsorption qui est, dans ce cas, un tampon phosphate 0,1 M. D'autre part, le mélange de la suspension de billes et de la solution d'Acms ( $C_{init}$ ,  $V_{init}$ ) est placé dans une étuve, à 37°C, pendant 5 heures, sous agitation rotative. Après avoir récupéré le surnageant contenant les Acms non-adsorbés ( $Q_{nads}$ ), les billes sont lavées dans du tampon phosphate. Le blocage des sites non-spécifiques se fait comme précédemment avec une solution de BSA 1 % qui est toutefois préparée dans du tampon phosphate. Après les trois étapes de blocage, les billes recouvertes d'Acms sont de nouveau lavées puis stockées, aussi, dans du tampon de stockage, à 4°C, à l'abri de la lumière (Magalhães *et al.*, 2004a).

## ***II. D. - 2. Etude du pH d'adsorption***

Le tampon phosphate 0,1 M (+  $\text{NaN}_3$  0,05 % et anti-protéases 1  $\mu\text{l/ml}$ ), utilisé dans la deuxième méthode d'adsorption des Acms sur les billes de 1 $\mu\text{m}$ , a été choisi car il permet d'obtenir un large éventail de pH : de 5,3 à 8,2. Le pH optimal d'adsorption de chaque Acms, sur les billes de 1  $\mu\text{m}$ , a alors pu être déterminé.

Le tampon phosphate est préparé de la manière suivante : deux solutions de phosphates de sodium, monobasique ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) et dibasique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), à la concentration de 0,2 M, sont mélangées selon des volumes pré-établis pour obtenir un pH précis à 25°C (Tableau 16). Puis, les différentes solutions obtenues sont diluées au 1/2, avec de l'eau distillée contenant 0,1 % de  $\text{NaN}_3$  (w/v) et 2  $\mu\text{l/ml}$  d'anti-protéases. Le pH exact de ces nouvelles solutions est alors mesuré à la température d'adsorption (37°C).

Tableau 16 : Préparation des différentes solutions de tampon phosphate utilisé dans la détermination du pH optimal d’adsorption des Acms sur les billes de 1 µm.

|                                                                         |                  |      |      |      |      |      |      |     |     |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|
| pH théorique, à 25°C,du mélange 0,2 M                                   | 4,5              | 5    | 5,5  | 6    | 6,5  | 7    | 7,5  | 8   | 8,5 |
| Volume de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2M en ml                   | 99,4             | 98,3 | 95,5 | 87,7 | 68,5 | 39,0 | 16,0 | 5,3 | 2,3 |
| Volume de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2M                         | Ajuster à 100 ml |      |      |      |      |      |      |     |     |
| pH réel, à 37°C, du mélange 0,2 M                                       | 4,9              | 5,1  | 5,5  | 6,0  | 6,5  | 7,0  | 7,5  | 8,0 | 8,5 |
| pH réel, à 37°C,du mélange 0,1 M + NaN <sub>3</sub><br>+ anti-protéases | 5,3              | 5,5  | 5,8  | 6,2  | 6,6  | 7,1  | 7,5  | 7,9 | 8,2 |

***II. D. - 3. Etude de la cinétique d’adsorption des Acms  
retenus pour leur spécificité vis-à-vis de la VTG***

***II. D. - 3. 1. Concentrations testées***

La cinétique d’adsorption des Acms sur les deux types de billes, a été étudiée à partir d’un ou des trois Acms sélectionnés, pour leur spécificité élevée vis-à-vis des molécules de VTGs de cyprinidés et de percidés: le G10/5/1, le F4/8/1 et le F4/9/1 (Voir *III.B.-2*).

***Les billes de 2 µm***

Avec les billes de 2 µm, seul l’Acm G10/5/1 a été testé pour vérifier si ce type de billes peut être utilisé pour développer un test d’agglutination permettant de détecter la production anormale de VTG. Les concentrations étudiées sont les suivantes : 250, 500, 1000, 2000, 4000 et 8000 µg/ml (*C<sub>init</sub>*). Ces solutions sont préparées à partir d’une solution mère à 9 mg/ml obtenue après précipitation au sulfate d’ammonium (45 %) et dialyse. Les différentes solutions ont été obtenues par des dilutions en cascade au ½, dans du tampon PBS, pH=7,4 contenant du NaN<sub>3</sub> (0,05 %) et des anti-protéases (1 µl/ml).

***Les billes de 1 µm***

Pour tester si les billes de 1 µm étaient utilisables pour développer un test d’agglutination détecte la présence de VTG, seules trois concentrations de l’Acm G10/5/1 ont été étudiées : 240, 470 et 960 µg/ml (*C<sub>init</sub>*). Les deux solutions à 240 et 470 µg/ml ont préparées à partir de la

solution mère de 960 µg/ml, obtenue après purification par chromatographie d’affinité et dialyse. Ces deux solutions ont été préparées par dilution au ½ dans du tampon PBS, pH=7,4 contenant du NaN<sub>3</sub> 0,05 % et des anti-protéases (1 µl/ml).

Puis le protocole d’adsorption a été optimisé et la cinétique d’adsorption des trois Acms est étudiée à l’aide des solutions présentées dans le tableau 17. Pour chaque Acm, les solutions étudiées sont préparées par dilution au ½ dans du tampon phosphate 0,1 M. La solution mère a été obtenue, dans ce cas, par purification au sulfate d’ammonium (45 %) et après dialyse.

Tableau 17 : Concentration en Acms testées ( $C_{init}$ ) pour étudier la cinétique d’adsorption sur les billes de 1 µm.

| Acms    | Concentration en µg/ml |     |     |      |      |      |
|---------|------------------------|-----|-----|------|------|------|
| G10/5/1 | 141                    | 320 | 543 | 1085 | 2114 | 4407 |
| F4/8/1  | 142                    | 215 | 388 | 749  | 1551 | 3236 |
| F4/9/1  | 137                    | 254 | 497 | 1044 | 1987 | 3542 |

### II. D. - 3. 2. *Modélisation mathématique de l’adsorption*

#### *Dosage protéique*

Pour pouvoir modéliser la cinétique d’adsorption des Acms sur les billes de latex, les quantités d’Acms adsorbés ( $Q_{ads}$ ) et non-adsorbés ( $Q_{nads}$ ) sur les billes doivent être calculées avec précision. Pour cela, des dosages protéiques précis sont réalisés sur les différentes solutions d’Acms : les solutions initiales utilisées pour l’adsorption et les solutions d’Acms non-adsorbés, récupérées après l’étape d’adsorption (par centrifugation à 6000 x g, pendant 10 min).

Ces dosages protéiques sont réalisés à l’aide d’un kit BCA (Bicinchoninic acid protein assay ; Sigma) par microtitration. Ce kit est composé de deux réactifs : une solution de sulfate de cuivre (II) et une solution d’acide bicinchoninic. Ces deux solutions sont mélangées, extemporanément, selon le ratio 50/1, respectivement. Les protéines, présentes dans la solution à doser, réduisent le Cu (II), de la solution de sulfate de cuivre, en Cu (I), ceci car le milieu est alcalin. L’acide bicinchoninic interagit alors avec le Cu (I). Cette interaction induit la formation d’un complexe violet dont l’absorbance maximale est mesurable à 582 nm. L’absorbance va donc être fonction de la concentration en protéines dans le milieu.

Sur une plaque 96 puits (P96), chaque puits reçoit 10 µl d'échantillons. Le dosage de chaque échantillon est fait en triplicat. Puis, 200 µl de la solution de coloration sont distribués dans chaque puits. L'ensemble est placé dans une étuve à 37°C, pendant 30 min. L'absorbance est lue à 582 nm à l'aide d'un fluorimètre Fluostar Galaxy (BMG).

Pour réaliser la courbe étalon, 5 solutions différents de BSA sont utilisées dont les concentrations sont les suivantes : 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 et 1 mg/ml. Comme pour les autres échantillons, 10 µl de chacune de ces solutions de BSA sont déposés, en triplicat, dans une P96. Les concentrations protéiques des échantillons testés sont donc estimées à partir de la droite de régression obtenue à partir des résultats expérimentaux acquis avec les différentes solutions de BSA.

### ***Calculs de la concentration d'Acms adsorbés par volume de billes***

La quantité d'Acms adsorbés ( $Q_{ads}$ ) sur les billes est obtenue en soustrayant la quantité d'Acms non-adsorbés ( $Q_{nads}$ ) à la quantité d'Acms initialement apportée ( $Q_{init}$ ) :

$$Q_{ads} = Q_{init} - Q_{nads}$$

$$Q_{ads} = C_{init} V_{init} - C_{nads} V_{nads}$$

où  $C_{init}$  est la concentration (mg/ml) de la solution d'Acms avant son mélange avec la suspension de billes,

$V_{init}$  est le volume (ml) de la solution d'Acms avant son mélange avec la suspension de billes,

$C_{nads}$  est la concentration (mg/ml) de la solution d'Acms non-adsorbés, récupérée par centrifugation après l'adsorption,

$V_{nads}$  est le volume (ml) de la solution d'Acms non-adsorbés, récupérée par centrifugation après l'adsorption.

Puis pour obtenir la concentration d'Acms adsorbés par ml de suspension de billes ( $C_{Acm-bille}$ ), la quantité d'Acms adsorbés est multipliée par un facteur  $F$  tel que :

$$F = \frac{1}{V_{init}} \text{ avec } V_{init} \text{ en ml}$$

$$\text{alors } C_{Acm-bille} = Q_{ads} * F$$

### ***Modèles mathématiques***

Plusieurs modèles mathématiques sont utilisés pour étudier l'adsorption des Acms sur les billes de latex :

- L'isotherme d'adsorption : le graphique est obtenue en représentant la concentration  $C_{nads}$  *versus* la concentration  $C_{Acm-bille}$  (x *versus* y),
- L'isotherme de Freundlich :  $\ln C_{nads}$  *versus*  $\ln C_{Acm-bille}$ ,
- Le modèle de Scatchard :  $C_{Acm-bille}$  *versus*  $\frac{C_{Acm-bille}}{C_{nads}}$ .

A partir des représentations graphiques, les constantes d'affinités, la capacité d'adsorption et les constantes cinétiques sont estimées.

## ***II. D. - 4. Etude de l'immunoréactivité***

L'immunoréactivité de chacun des complexes billes-Acms est testée avec plusieurs échantillons plasmatiques provenant de carpes :

- mâles non-traités : témoins négatifs,
- femelles naturellement en vitellogenèse : témoins positifs,
- mâles et femelles traités avec de l'œstradiol,
- femelles, à la fois, en vitellogenèse et traitées avec de l'œstradiol.

Vingt cinq microlitres de plasma et 25 µl de la suspension de billes-Acms sont déposés sur une plaque d'opaline. Les deux gouttes sont mélangées par des mouvements circulaires. Ensuite le mélange est homogénéisé, également par des mouvements circulaires, pendant 5 min.

Parallèlement à ces tests, des témoins sont réalisés avec des billes non recouvertes. Les tests sont considérés comme positifs si une agglutination est visible uniquement avec des billes recouvertes d'Acms et des échantillons plasmatiques contenant de la VTG (Magalhães *et al.*, 2004a, Magalhães *et al.*, 2004c).







## ***Partie III.***

# ***Résultats et Discussion***



Le but de cette étude est de développer un test d'agglutination qui permettra de détecter la présence anormale de vitellogénine (VTG) dans le sang de poissons mâles ou immatures contaminés par des œstrogènes mimétiques (ŒMs). La mise au point de ce test immunologique nécessite la purification de la VTG pour produire des anticorps (Acs) reconnaissant spécifiquement cette molécule.

### ***III. A. Purification de la vitellogénine de carpe***

Le premier objectif de cette étude est le développement d'une procédure de purification, rapide et non dénaturante, de la VTG de carpe *Cyprinus carpio*, qui permettra d'obtenir des quantités élevées de cette protéine pure.

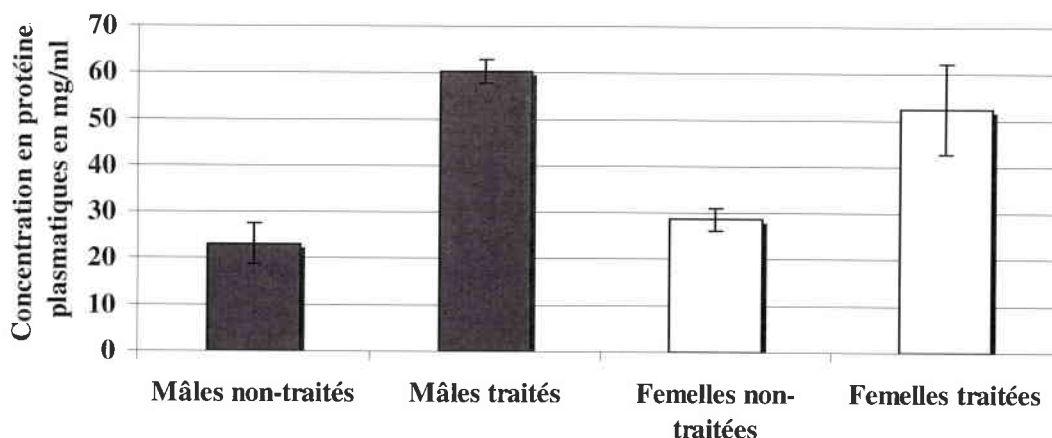
#### ***III. A. - 1. Induction de la synthèse de vitellogénine***

La première étape de cette procédure consiste à stimuler une surproduction de VTG chez des carpes, à l'aide d'un traitement par le 17 -œstradiol (E2), selon le protocole établi par Tyler et Sumpter en 1990 : 2 injections de 10 µg/g d'E2 à 10 jours d'intervalle (Tyler et Sumpter, 1990a).

##### ***III. A. - 1. 1. Induction de la synthèse protéique***

L'administration d'E2 induit chez les carpes (*Cyprinus carpio*) une augmentation de la concentration en protéines totales plasmatiques de  $23 \pm 4$  mg/ml chez les mâles non-traités à  $60 \pm 3$  mg/ml pour le groupe de mâles traités, et de  $29 \pm 10$  mg/ml pour le groupe de femelles non-traitées à  $52,4 \pm 9,7$  mg/ml chez femelles traitées (Figure 20).

Cet effet a, également, été observé pour d'autres poissons comme le bar de mer (*Dicentrarchus labrax*), les soles anglaises (*Pleuronectes vetulus*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Mañanós *et al.*, 1994b, Roubal *et al.*, 1997, Brion *et al.*, 2000). Dans ces études, les auteurs ont clairement démontré que cette augmentation de concentration résultait de la surproduction de VTG. En effet, après sa synthèse hépatique, la VTG est libérée dans la circulation sanguine (Mañanós *et al.*, 1994b) où elle peut perdurer pendant plusieurs jours avant d'être éliminée de l'organisme (Hemmer *et al.*, 2002).



**Figure 20 :** Effets du traitement à l'E2 sur la concentration en protéines plasmatiques chez des carpes (*Cyprinus carpio*) mâles et femelles (barre d'erreur : écartype ;  $n_{\text{traité}} = 5$ ,  $n_{\text{non-traité}} = 5$ ).

### ***III. A. - 1. 2. Analyse électrophorétique des échantillons plasmatiques des animaux traités ou non***

Pour vérifier que l'augmentation de la concentration en protéines plasmatiques reflète l'enrichissement du plasma en VTG, des analyses électrophorétiques, Native-PAGE ou SDS-PAGE, ont été effectuées sur les différents échantillons prélevés chez les carpes traitées et non-traitées. Les carpes non-traitées sont des mâles servant en même temps de témoins négatifs.

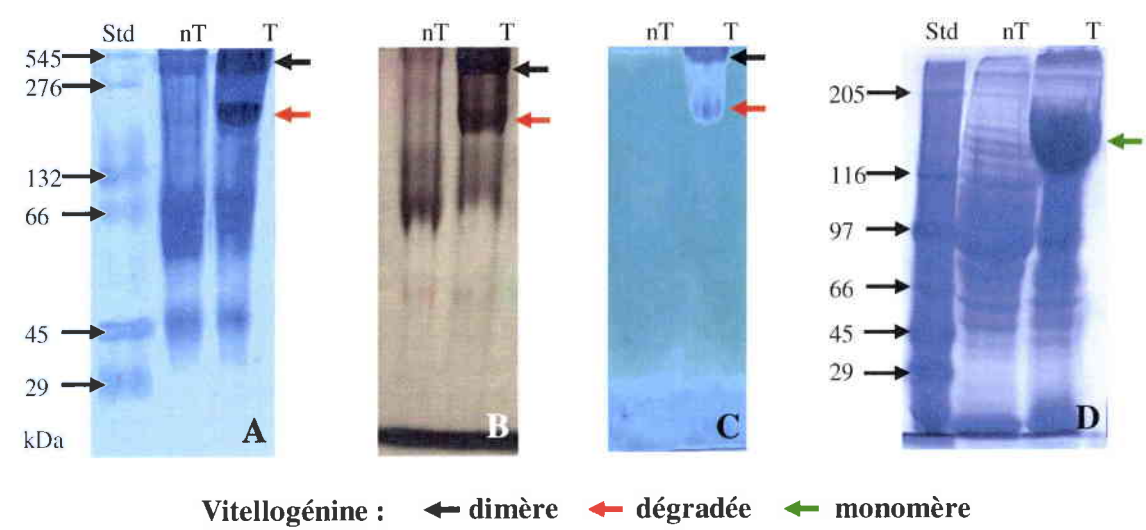
#### ***Electrophorèses***

Les analyses électrophorétiques réalisées en Native-PAGE avec une coloration au bleu de Coomassie montrent la présence (Figure 21 A) :

- d'une bande protéique surexprimée chez les carpes traitées, dont le poids moléculaire (PM) est compris entre 370 et 390 kDa environ,
- et d'une autre bande protéique uniquement exprimée chez les carpes traitées, dont le PM est compris entre 240 et 250 kDa.

De plus, les colorations spécifiques au noir Soudan et au vert de méthyle montrent que ces deux protéines possèdent les deux caractéristiques biochimiques des molécules de VTGs de poisson : des groupements lipidiques et phosphates (Figure 21 B et C).

La petite bande protéique de 370-390 kDa, visible chez les carpes non-traitées, correspond à des protéines plasmatiques dont le PM est très proche de celui de la VTG de carpe. Ces protéines ont déjà été observées par Tyler et Sumpter en 1990 b.



**Figure 21 :** Analyse électrophorétique, par Native-PAGE 6 % (A, B et C) et SDS-PAGE 7,5 % (D), de la composition protéique des échantillons plasmatiques provenant de carpes mâles non-traitées ( nT) ou de carpes traitées (mâles ou femelles, T) : coloration au bleu de Coomassie (A et D), au noir Soudan (B), ou au vert de méthyle (C). Std : standard.

Concernant la bande protéique de 240-250 kDa, il s'avère que Tyler et Sumpter (1990b), ainsi que Roubal *et al.* (1997) l'ont, également observée chez les carpes et les soles anglaises, mais uniquement après la purification de la VTG. D'après eux, cette protéine correspondrait à un produit de dégradation du dimère de la VTG, celui-ci disparaissant lorsque la purification est réalisée à une température inférieure à 9°C en présence d'anti-protéases (Tyler et Sumpter, 1990a, Roubal *et al.*, 1997).

Dans notre étude, pour limiter la dégradation de la VTG par des protéases lors de la purification, des anti-protéases sont distribuées dans les tubes héparinés recevant les échantillons de sang. De plus, les échantillons de sang sont conservés dans la glace, du prélèvement, jusqu'au stockage des plasmas à -20°C. Cependant la forme dégradée de la VTG est toujours présente, bien qu'en faible quantité. Elle pourrait résulter d'une métabolisation physiologique de la VTG induite par les poissons et non à une dégradation après le prélèvement sanguin (Mañanós *et al.*, 1994b).

Selon les espèces de poissons, les mâles contaminés produisent une (Mañanós *et al.*, 1994b, Brion *et al.*, 2000) à deux molécules (Tao *et al.*, 1993, Roubal *et al.*, 1997, Ohkubo *et al.*, 2003) de VTG. Ces molécules sont des dimères protéiques. Quand deux dimères sont produits au sein de la même espèce :

- les deux molécules peuvent être constituées de l'association d'un seul type de monomère (Tao *et al.*, 1993, Roubal *et al.*, 1997). La différence entre les deux dimères serait la conséquence de transformations post-traductionnelles.
- ou bien chaque dimère est constitué de l'association d'un type de monomère qui lui est spécifique (Ohkubo *et al.*, 2003). Dans ce cas, les deux types de monomères résultent de la transcription de deux gènes de VTG différents (Bowman *et al.*, 2000) ou d'une transformation post-traductionnelle différente.

Récemment, d'autres études ont révélé la présence d'un deuxième monomère chez la carpe *Cyprinus carpio* (Solé *et al.*, 2000, Fukada *et al.*, 2003, Shi *et al.*, 2003), son PM est compris entre 180 et 190 kDa. Sa concentration plasmatique est très faible, par rapport à la concentration de l'autre monomère ce qui le rend difficile à observer.

Une étude électrophorétique en condition dénaturante des échantillons de plasma permet de visualiser le ou les monomères délipidés composant le dimère de VTG de carpe. L'étude du contenu plasmatique, par SDS-PAGE, montre la présence d'une seule bande dont le PM est compris entre 130 et 160 kDa, exprimée uniquement chez les carpes traitées (Figure 21 D). Cet interval de PM est en accord avec celui trouvé effectivement par Tyler et Sumpter (1990a) pour le monomère délipidé de la VTG de carpe (160 à 170 kDa).

### ***III. A. - 1. 3. Séquençage du monomère***

L'analyse électrophorétique des échantillons plasmatiques des animaux traités et non-traités montre que la bande de 370-390 kDa correspondrait à un des dimères de la VTG de carpe *Cyprinus carpio*. Ce dimère serait constitué de deux monomères identiques, dont le poids moléculaires serait compris entre 156 et 192 kDa (monomère lipidé = PM du monomère délipidé + 20 % de lipides).



Pour le vérifier, un séquençage de l'extrémité N-terminale du monomère délipidé a été réalisé. Deux séquences différentes d'acides aminés ont été obtenues :

- Seq1 : X - Q - I - N - L - V - P - E - F - T - P - G -...,
- Seq2 : X - D - R - A - L - H - P - E - V - R - M - V -... .

Ces deux séquences, Seq1 et Seq2, sont toutes les deux retrouvées dans la séquence protéique de la molécule de VTG de carpe, actuellement identifiée (Figure 22). Ce résultat confirme que le monomère, détecté en SDS-PAGE, correspond au monomère délipidé de la VTG de carpe *Cyprinus carpio*.

```

1  mravvlaltv alvasqqinl vpeftpgkty vynyealllg glpheglara gikvnskvhl
61  savtentflm klmdpliyey agiwpkdpfv patkltsala aqlqipikfe yangvvgkvf
121  apagvsptvl nlhrgilnil qlnlkktqni yelqeagaqg vcrthyvise dpanhitvt
181  kskdlshcqe rivkdvrlay tercaeter ikslietaty nyimkpasag vliteatvee
241  vhfqfspnei hgaaqmeakq tlafveiekt lvvpikadyl argslqyefa teilqtpihl
301  mkisdapaqi ievlkhhlvan nvamvhedap lkfvqliql rvstleniea iwaqfkdkpa
361  yrrwlldalp svgtpviihf ikekflagel tlpefiqalv valqmvtdl dtiqltasla
421  mhekiakmpa lrevvmlgyg smiarhcvav ptcsaellrp iheiaaeats kndireitla
481  lkvlgnaghp aslkpimkll pglrtaassl plrvqvdaill alrniakkep klvqpvalql
541  vldralhpev rmvacivlfe skpsvalvss lagalktetn mhvvsfaysh iksltritap
601  dmaavagaan vaiklmsrkl drlsfrfsra lqldyyhtpl migaagsaym indaatilpr
661  avvakarayl agaaadvlei gvrtegigea llkspaades vdrtikikrt lralanwkdl
721  ptdqplasvy ikflggevaf vkidktiiee aipivtgpkp rellkralka lqegiawqya
781  kpllaaearr ilptavgvpm elslytaava aasvvnkati tpplpeeiet mtleqlkktd
841  vqlqaeearps ialqtfavmg vntaliqaav margkirtia pvkvaaradi lkgnykveal
901  pvevpehiat lsfetlavvr nieeptaert vplvpelavq nsqthsdyls senqdevpvr
961  apapfdktlc lavpyieikg cvelhshnaa firndplyyi igqhsaratv araegpaver
1021  lelevqvgrpr aaerllkqis lideetpegk aflklkeil etedknrpvs sesrsssssr
1081  snrssssssss ssssssssss msssrvshta timepfrkfh kdrylaphga skkvssgssa
1141  ssferiqkqa kflgnavppv faviaravrv dhkllgyqla ayfdkptarv qivvssiaen
1201  dnllkicvdga llskhkvtak lawgpecqgy avtakaeagv lgefpaarle lewerlpitv
1261  ttyakkmskh iymaafqagf rlervmnsek eieltlalpn qrslnvifri pemtlrmgi
1321  hlpyaipinp dgslsi qide dilswiqrhi kee

```

**Figure 22 :** Séquence du monomère (130-160 kDa) de la VTG de carpe *Cyprinus carpio* avec, soulignées, les deux séquences obtenues après séquençage de l'extrémité N-terminale (Magalhães *et al.*, 2004b).

Seq1 correspond à la séquence située entre le 17 et le 27<sup>ième</sup> acide aminé. Quant à Seq2, elle est correspond à la séquence 541-553<sup>ième</sup> acide aminé. Cette deuxième séquence serait obtenue à partir d'un produit de dégradation du monomère délipidé qui est libéré lors du séquençage.

De plus, des séquences plus ou moins identiques à Seq1 et Seq2 sont aussi présentes dans les molécules de VTG d'autres espèces de poissons (Tableau 18). Cette observation confirme que la molécule de VTG est relativement bien conservée entre les différentes espèces de poissons (Babin *et al.*, 1999, Fyhn *et al.*, 1999, Lim *et al.*, 2001), toutes les VTGs dérivant d'une même protéine ancestrale (Babin *et al.*, 1999). Les similitudes retrouvées entre plusieurs molécules de VTG de poissons, laissent supposer qu'il serait possible d'obtenir un anticorps monoclonal unique pouvant reconnaître la VTG de chacune de ces espèces de poissons, voire de la plupart des espèces de poissons.

Tableau 18 : Similitude entre les séquences Seq1 et Seq2 obtenues après le séquençage de l'extrémité N-terminale du monomère de 130-160 kDa et les séquences protéiques des molécules de VTGs de différentes espèces de poissons.

| Poissons                                                       | Séquence 1 |   |   |   |   |   |   |   |      |   | Similitude |
|----------------------------------------------------------------|------------|---|---|---|---|---|---|---|------|---|------------|
|                                                                | Q          | I | N | L | V | P | E | F | T    | P | en %       |
| VTG de carpe ( <i>Cyprinus carpio</i> )                        | Q          | I | N | L | V | P | E | F | T    | P | 100 %      |
| VTG de poisson tête de boule<br>( <i>Pimephales promelas</i> ) | Q          | I | N | L | V | P | E | F | A    | P | 90 %       |
| VTG II de médaka ( <i>Oryzias latipes</i> )                    | Q          | L | S | F | T | P | E | F | S    | P | 50 %       |
| VTG II de Choquemort<br>( <i>Fundulus heteclitus</i> )         | Q          | V | S | Y | A | P | E | F | A    | P | 50 %       |
| Séquence 1 tronquée                                            |            |   |   |   |   |   |   |   |      |   |            |
|                                                                | Q          | I | N | L | V | P | E | F |      |   |            |
| VTG de poisson zèbre<br>( <i>Danio rerio</i> )                 | Q          | V | N | L | A | P | E | F | 75 % |   |            |
| Séquence 2                                                     |            |   |   |   |   |   |   |   |      |   |            |
|                                                                | D          | R | A | L | H | P | E | V | R    | M |            |
| VTG de carpe                                                   | D          | R | A | L | H | P | E | V | R    | M | 100 %      |
| VTG de poisson zèbre                                           | D          | R | A | L | H | P | E | V | R    | M | 100 %      |
| VTG de poisson tête de boule                                   | D          | R | A | L | H | P | E | V | R    | M | 100 %      |
| VTG de truite arc-en-ciel<br>( <i>Onchorynchus mykiss</i> )    | D          | K | A | L | H | P | E | L | R    | M | 80 %       |
| VTG II de Choquemort                                           | D          | R | T | L | D | P | E | L | R    | M | 70 %       |
| VTG d'esturgeon blanc<br>( <i>Acipenser transmontanus</i> )    | D          | H | Q | L | H | S | E | V | R    | M | 70 %       |

### ***III. A. - 2. Méthode de purification***

La deuxième étape pour obtenir une solution pure de VTG de carpe, non dénaturée et suffisamment concentrée pour produire des Acms spécifiques, consiste à développer la meilleure méthode de purification de cette protéine. Une méthode a été mise au point afin d'améliorer celle proposée par Tyler et Sumpter, en 1990 pour le plasma de carpe (durée : 35 heures ; pertes de protéines importantes : nombre d'étapes de récupération) en tenant compte de plusieurs méthodes et techniques proposées par d'autres auteurs pour différents poissons (bar de mer, bar à rayures *Morone saxatilis*, sole anglaise ou truite arc-en-ciel) (Tao *et al.*, 1993, Mañanós *et al.*, 1994b, Roubal *et al.*, 1997, Brion *et al.*, 2000).

#### ***III. A. - 2. 1. Purification par chromatographie échangeuse d'anions***

Le plasma issu d'une carpe traitée avec de l'E2 (mâle ou femelle), a donc subi une première étape de purification par chromatographie échangeuse d'anions faibles. D'autres échantillons plasmatiques, provenant d'une carpe mâle non-traitée (témoin négatif) et d'une carpe femelle non-traitée ont également été purifiés, pour aider à identifier la VTG. Les figures 23 et 24 présentent les chromatogrammes obtenus, à 254 nm et 280 nm, lors de cette première étape de purification.

#### ***Les profils chromatographiques***

En comparant les quatre chromatogrammes, il apparaît que seuls les deux pics protéiques élués entre la 10<sup>ème</sup> et la 12<sup>ème</sup> minute peuvent contenir de la VTG de carpe. En effet, les protéines composant ces deux pics sont synthétisées en réponse à la stimulation œstrogénique puisqu'elles sont uniquement présentes chez les animaux traités avec de l'E2 (mâles ou femelles). Concernant la carpe femelle non-traitée, l'absence de VTG indique qu'elle n'était pas en vitellogenèse.

Les quatre autres pics, élués entre la 2-3<sup>ème</sup> min, 7-8<sup>ème</sup> min, 15-16<sup>ème</sup> min et 20<sup>ème</sup> min, correspondent à des protéines plasmatiques toujours présentes dans le plasma (2-3<sup>ème</sup> min, 7-8<sup>ème</sup> min) ou dont la présence est facultative (15-16<sup>ème</sup> min et 20<sup>ème</sup> min).

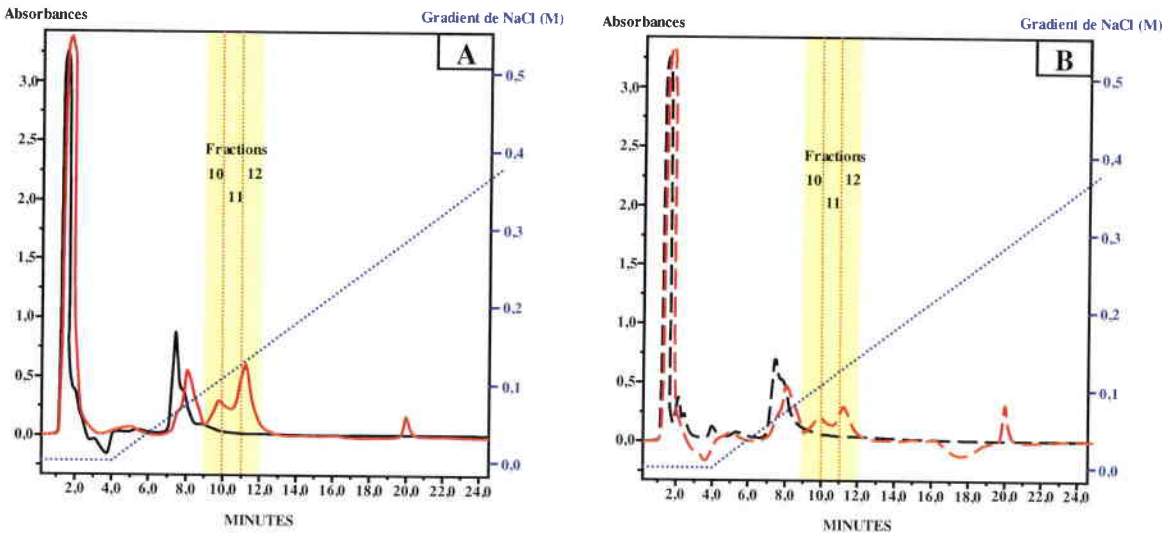


Figure 23 : Chromatogrammes de deux échantillons plasmatiques issus d’une carpe mâle non-traitée (tracés noirs) et d’une carpe mâle traitée (tracés rouges) obtenus lors de l’étape de chromatographie échangeuse d’anions faibles et mesurés à 254 nm (graphe A) et à 280 nm (graphe B).

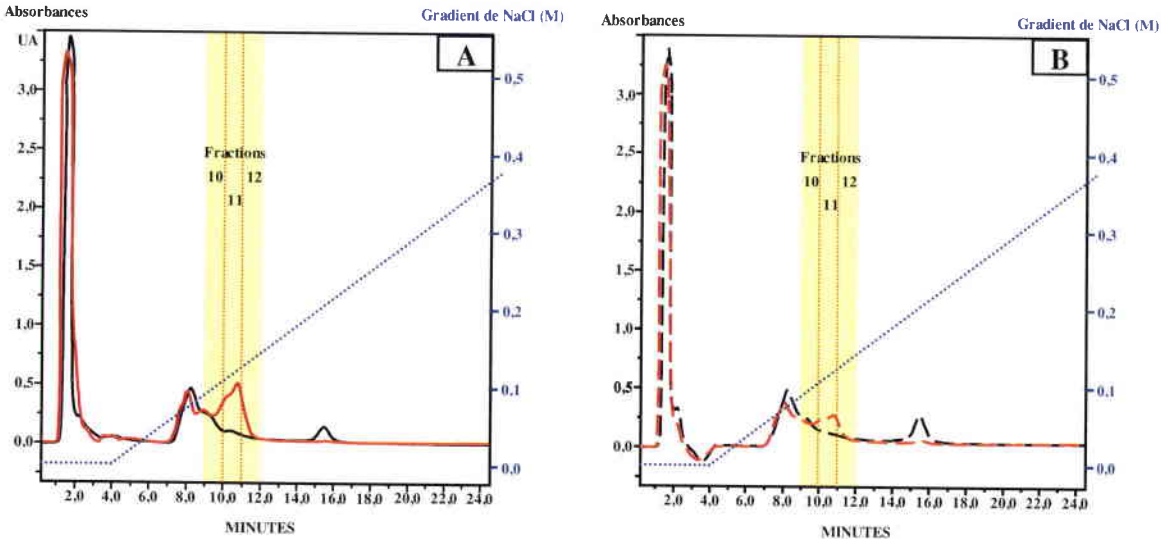
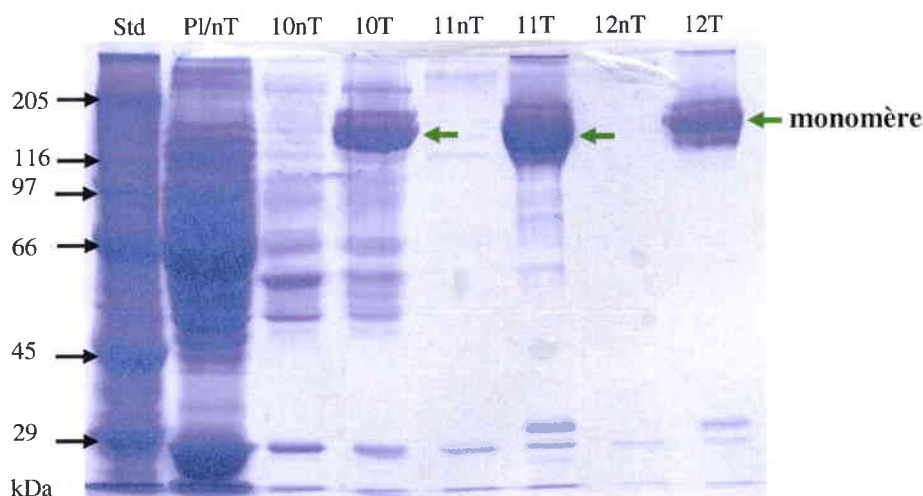


Figure 24 : Chromatogrammes de deux échantillons plasmatiques issus d’une carpe femelle non-traitée (tracés noirs) et d’une carpe femelle traitée (tracés rouges) obtenus lors de l’étape de chromatographie échangeuse d’anions faibles et mesurés à 254 nm (graphe A) et à 280 nm (graphe B).

## Electrophorèses

Afin de vérifier que la VTG est présente parmi les protéines éluées dans les fractions 10, 11 et 12, issues des animaux traités, leur contenu protéique est déterminé par électrophorèse SDS-PAGE (Figure 25).



**Figure 25 :** Analyse électrophorétique par SDS-PAGE (7,5 %) du contenu protéique des fractions 10, 11 et 12, obtenues à l'issue de la première étape de purification par chromatographie échangeuse d'anions faibles, d'un échantillon plasmatique d'une carpe traitée (T) et d'une carpe non-traitée (nT),. Pl/nT : échantillon plasmatique d'une carpe non-traitée ; Std : standard.

Les résultats obtenus révèlent, d'une part, qu'une protéine dont le PM correspond à la VTG, est présente dans ces fractions, puisqu'une bande protéique d'environ 140 à 150 kDa peut être observée. D'autre part, la SDS-PAGE montre qu'à l'issue de cette première étape de purification, cette protéine n'est pas totalement purifiée puisque d'autres bandes sont encore visibles.

Au vu des résultats exposés préalablement, les fractions 10, 11 et 12 issues des animaux traités ont été regroupées et concentrées. Ce nouvel échantillon semi-purifié dit "traité" a alors été étudié par électrophorèse en condition non dénaturante (Native-PAGE), avec les trois colorants cités précédemment : le bleu de Coomassie, le noir Soudan et le vert de méthyle (Figure 26). Les résultats obtenus confirment la présence de VTG dans l'échantillon semi-purifié "traité" puisqu'une protéine d'environ 370 kDa contenant, à la fois, des groupements lipidiques et phosphates est présente uniquement dans cet échantillon.

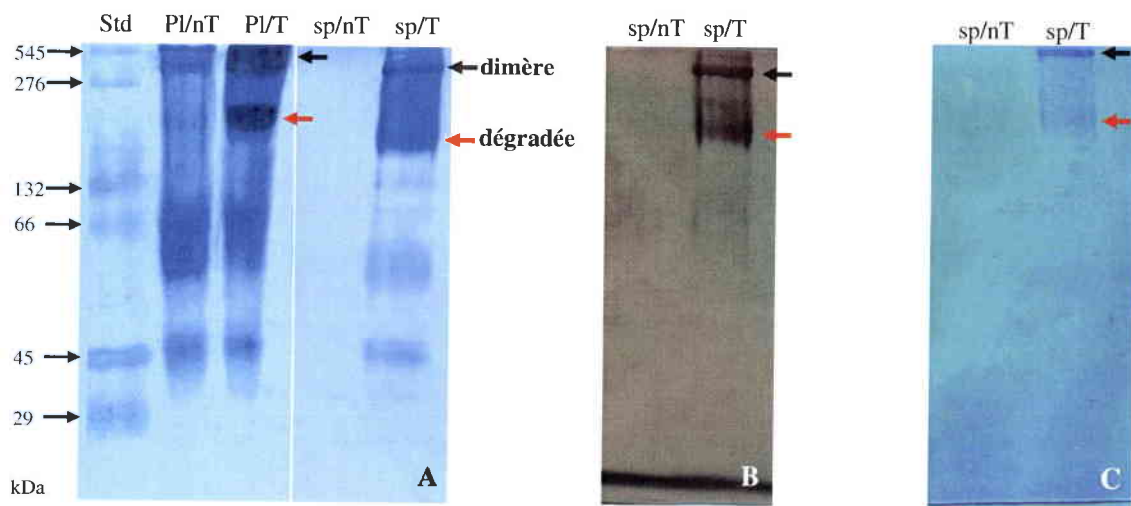


Figure 26 : Analyse électrophorétique, par Native-PAGE (6 %), de la composition protéique des échantillons semi-purifiés, “traité”(sp/T) et “non-traité” (sp/nT), obtenus après la première étape de purification par chromatographie échangeuse d’anions faible : coloration au bleu de Coomassie (A), au noir Soudan (B), et au vert de méthyle (C). PI/nT : échantillon plasmatique d’une carpe non-traitée ; PI/T : échantillon plasmatique d’une carpe traitée ; Std : standard.

Le profil électrophorétique obtenu permet également de constater que cette première étape de purification par chromatographie échangeuse d’anions faibles n’est pas dénaturante. En effet, aucune bande d’environ 140 kDa n’est révélée (monomère de VTG). Ainsi, bien que la protéine 240-250 kDa, correspondant à une forme dégradée du dimère de la VTG de carpe soit toujours présente, sa concentration n’a pas augmenté lors de cette première étape de purification.

En conclusion, les fractions 10, 11 et 12, issues de la purification par chromatographie échangeuse d’anions faibles du plasma de carpe traitée avec de l’E2 (mâle ou femelle) contiennent la VTG sous sa forme native, mais celle-ci n’est pas complètement pure. Il est donc, nécessaire de recourir à une deuxième étape de purification. La technique choisie est une chromatographie de filtration sur gel qui sépare les protéines selon leur poids moléculaire.

### III. A. - 2. 2. Purification par filtration sur gel

La purification de l’échantillon semi-purifié “traité” par chromatographie liquide haute performance de filtration sur gel a été suivie par spectrophotométrie à 254 et 280 nm (Figure 27).

*Les profils chromatographiques*

Les profils chromatographiques obtenus montrent la présence, dans l'échantillon semi-purifié "traité", d'un pic protéique supplémentaire absent de l'échantillon témoin (Figure 27).

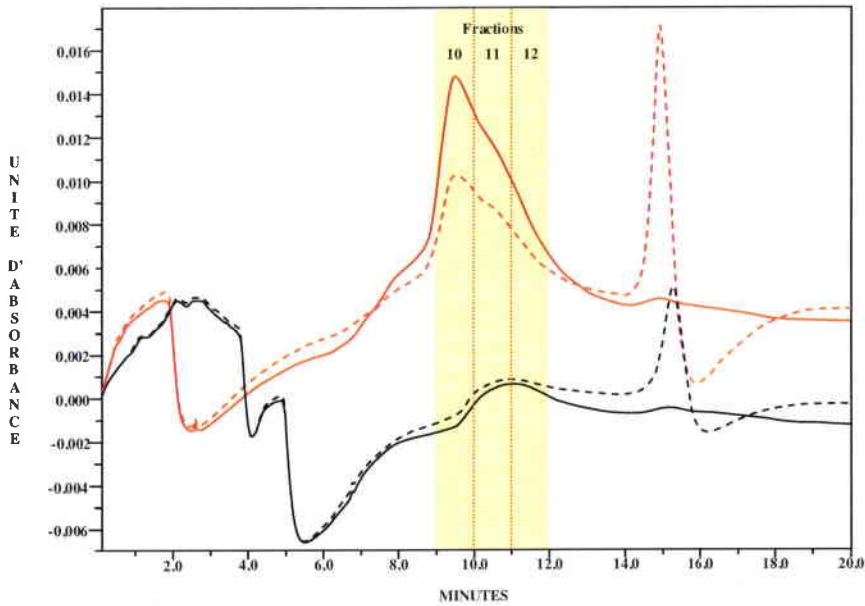
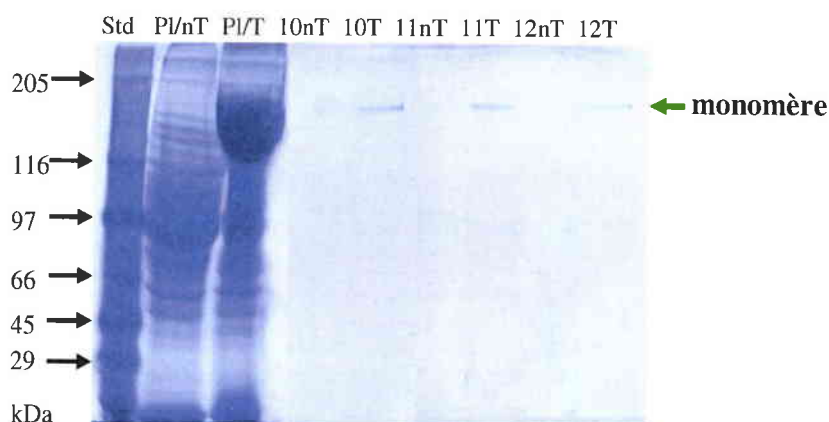


Figure 27 : Chromatogrammes obtenus à l'issue de la deuxième étape de purification par chromatographie de filtration sur gel. Chromatogrammes noirs : échantillon pur " non-traité " ; rouges : échantillon pur " traité " ; continus : lecture à 254 nm ; en pointillé : lecture à 280 nm.

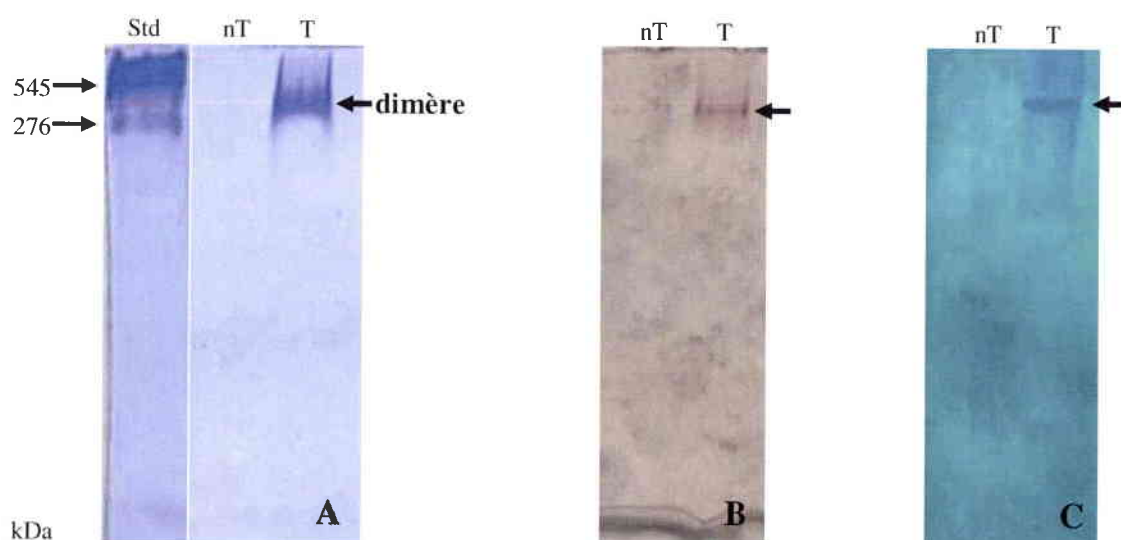
*Electrophorèses*

Pour déterminer le contenu protéique du pic, les fractions 10, 11 et 12 ont été analysées par SDS-PAGE 7,5 % (Figure 28). Une seule et unique bande d'environ 140 kDa est présente dans ces fractions. La protéine est donc totalement purifiée à l'issue de cette deuxième étape de purification. Ces fractions sont alors regroupées et concentrées par ultrafiltration.





**Figure 28 :** Analyse électrophorétique, par SDS-PAGE (7,5 %), de la composition protéique des fractions pures 10, 11 et 12, obtenues après la deuxième étape de purification, par chromatographie de filtration sur gel, des échantillons semi-purifiés “traité”(T) et “non-traité” (nT). Pl/nT : échantillon plasmatique d’une carpe non-traitée ; Pl/T : échantillon plasmatique d’une carpe traitée ; Std : standard.



**Figure 29 :** Analyse électrophorétique, par Native-PAGE (6 %), de la composition protéique de la solution pure de VTG obtenue après la deuxième étape de purification par chromatographie de filtration sur gel. Std : standard ; nT : échantillon provenant de la purification d’un plasma de carpe non-traitée ; T : échantillon provenant de la purification d’un plasma de carpe traitée.

Ce nouvel échantillon pur est alors étudié par Native-PAGE 6 % (Figure 29), et les résultats obtenus confirment, tout d’abord, que la protéine visualisée est la VTG de carpe, puisqu’elle fait environ 370 kDa et qu’elle contient des groupements lipidiques et phosphates.



Par ailleurs, ces résultats attestent que la VTG est totalement purifiée à l'issue de cette deuxième étape de purification, et qu'elle n'est pas dénaturée, aucune autre protéine n'étant visible.

**III. A. - 2. 3. Avantages et inconvénients de cette première méthode de purification**

Cette nouvelle méthode de purification de la VTG de carpe *Cyprinus carpio*, en deux étapes, utilisant deux techniques de chromatographies liquides à haute performance (une chromatographie échangeuse d'anions faibles suivie d'une filtration sur gel) a donc permis d'obtenir une solution pure de VTG de carpe, de manière beaucoup plus rapide que la méthode de Tyler et Sumpter (1990a), ainsi que par rapport aux méthodes mises au point pour purifier la VTG d'autres espèces de poissons (Tableau 19) (Tao *et al.*, 1993, Mañanós *et al.*, 1994b, Roubal *et al.*, 1997, Brion *et al.*, 2000). En effet, les temps de rétention de la VTG de carpe sont très faibles pour les deux étapes : inférieurs à 12 min dans les deux cas alors qu'il était supérieur à 1 heure pour les autres méthodes.

**Tableau 19 :** Intervalle des temps d'élution de différentes molécules de vitellogénine, variant selon la méthode de purification (début - fin d'élution) (Tyler et Sumpter, 1990a) [1], (Tao *et al.*, 1993) [2], (Mañanós *et al.*, 1994b) [3] (Roubal *et al.*, 1997) [4] et (Brion *et al.*, 2000) [5].

| Poissons           | Etape 1                             | Etape 2                             | Etape 3                     | Références |
|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------|
| <b>Carpe</b>       | <b>10,0-12,0<sup>ième</sup> min</b> | <b>10,0-12,0<sup>ième</sup> min</b> | -                           | -          |
| Bar de mer         | 54,0-84,0 <sup>ième</sup> min       | 6,0-6,5 <sup>ième</sup> h           | -                           | [3]        |
| Bar à rayure       | 9,0-10,2 <sup>ième</sup> h          | 2,0-4,0 <sup>ième</sup> h           | -                           | [2]        |
| Carpe              | 10,0-16,0 <sup>ième</sup> h         | 3,0-5,0 <sup>ième</sup> h           | 12,0-14,0 <sup>ième</sup> h | [1]        |
| Gougeon            | 14,4-15,6 <sup>ième</sup> min       | 42,5-57,5 <sup>ième</sup> min       | -                           | [5]        |
| Sole anglaise      | 2,6-2,8 <sup>ième</sup> h           | 1,5-2,0 <sup>ième</sup> h           | -                           | [4]        |
| Truite arc-en-ciel | 13,5-14,5 <sup>ième</sup> min       | 45,0-55,0 <sup>ième</sup> min       | -                           | [5]        |
| Vandoise           | 14,4-15,6 <sup>ième</sup> min       | 47,5-55,0 <sup>ième</sup> min       | -                           | [5]        |

h : heure                      min : minute

De plus, cette nouvelle méthode de purification de la VTG de carpe présente un rendement de purification équivalent aux autres méthodes en deux étapes avec une concentration de VTG pure environ égale à 770 µg/ml, obtenue à partir d'une échantillon plasmatique de 1 ml provenant d'une carpe mâle mature traité. Roubal *et al.* (1997), quant à eux, avaient obtenu, en

purifiant 1 ml de plasma de sole anglaise mâle mature traitée (avec 2 injections de 10 µg/g de E2), des solutions de VTG pure dont les concentrations varient entre 600 et 800 µg/ml.

Toutefois, le rendement de purification de cette nouvelle méthode reste insuffisant pour produire des Acms. En effet, le protocole de production d'Acm nécessite 500 µl/souris d'une solution de VTG pure, à la concentration minimale de 1,5 mg/ml.

Le calcul des rendements des étapes de concentration par ultrafiltration a permis d'évaluer que la perte protéique globale pouvait s'élever à 40 %, celle-ci se répartissant équitablement entre les différentes phases.

*Une méthode de purification, en une seule étape, permettrait donc de limiter ces pertes.*

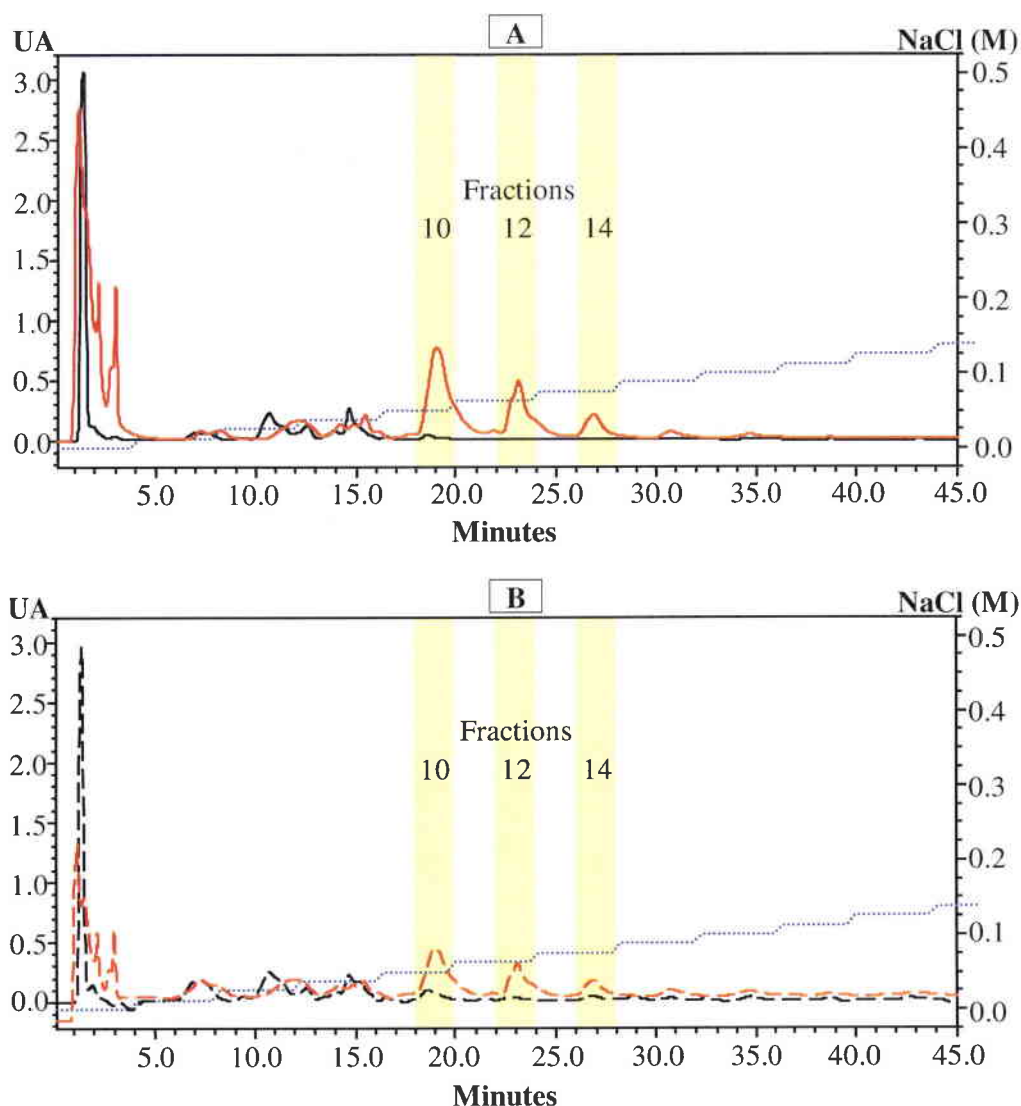
### ***III. A. - 3. Deuxième méthode de purification***

La deuxième méthode testée pour purifier la VTG de carpe *Cyprinus carpio* utilise une seule technique de chromatographie liquide échangeuse d'anions faibles. Dans ce cas, les protéines seront éluées à l'aide d'un gradient discontinu de NaCl, avec des paliers de 12,5 mM/4min, variant entre 0 à 0,5 M, et non pas par un gradient linéaire comme dans la méthode précédente.

Dans le mode d'élution discontinue, le gradient est segmenté en de multiples petits gradients linéaires, de durées et de hauteurs de paliers variables. Il permet donc de se focaliser sur une concentration saline précise, ce qui permet d'augmenter l'espacement entre les pics protéiques, et donc de mieux isoler les protéines tout en diminuant le temps de l'analyse (Jandera, 1999).

#### ***Profils chromatographiques***

La purification d'un échantillon plasmatique d'une carpe traitée (mâle ou femelle), par cette nouvelle méthode, a abouti à l'obtention de trois pics protéiques, absents des échantillons de carpes non-traitées (mâle ou femelle) (Figure 30).



**Figure 30 :** Chromatogrammes de deux échantillons plasmatiques issus d’une carpe mâle non-traitée (tracés noir) et d’une carpe traitée (tracés rouge) obtenus lors de la purification par chromatographie échangeuse d’anions faibles avec un gradient discontinu (courbe bleue) et mesurés aux deux longueurs d’onde : 254 nm (A) et de 280 nm (B).

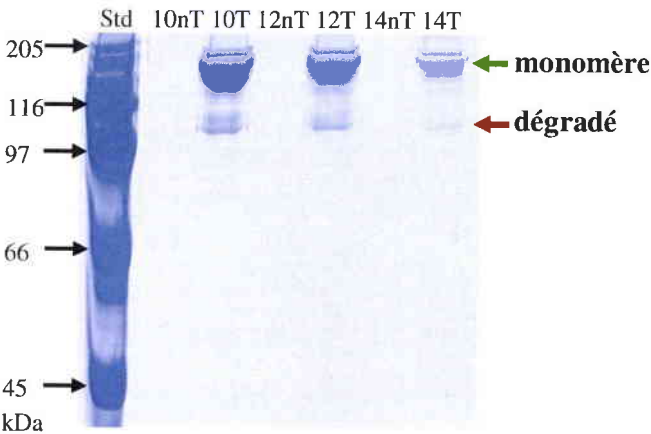
### *Electrophorèses*

L’analyse, en SDS-PAGE (7,5 %), du contenu protéique des trois fractions 10, 12 et 14 où les trois pics protéiques sont élués, montre qu’elles contiennent uniquement deux protéines qui pourraient être (Figure 31) :

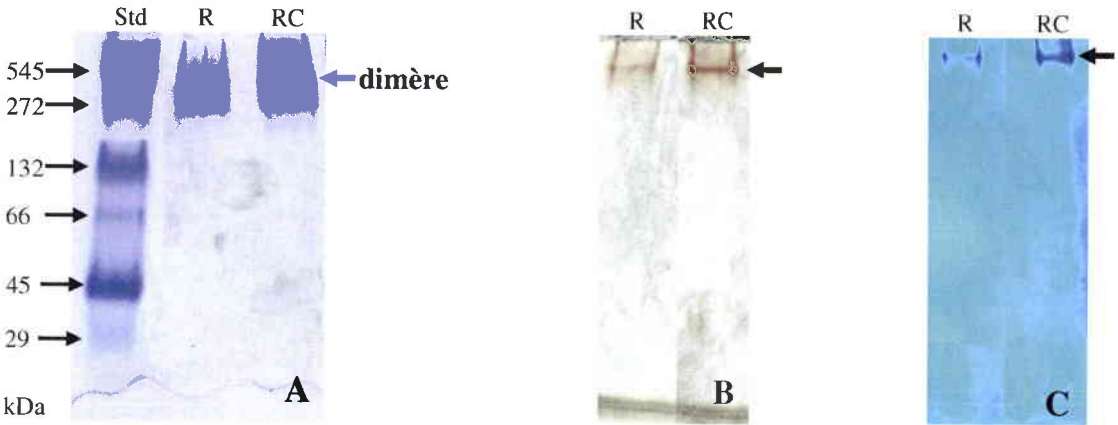
- le monomère délipidé de la VTG de carpe d’un PM variant entre 130 et 150 kDa,

- et une autre bande, minoritaire d'environ, 100 kDa qui correspondrait à un produit de dégradation du monomère de la VTG de carpe (Tyler et Sumpter, 1990a, Tao *et al.*, 1993).

En l'absence d'autres bandes protéiques à l'issue de la purification, la VTG de carpe serait, par conséquent totalement purifiée.



**Figure 31 :** Analyse électrophorétique par SDS-PAGE (7,5%) du contenu protéique des trois fractions 10, 12 et 14, obtenues après purification par chromatographie échangeuse d'anions faibles en gradient d'élution discontinu. Std : standard ; nT : non-traité ; T : Traité.



**Figure 32 :** Analyse électrophorétique par Native-PAGE (6%) du contenu protéique de la solution pure de VTG, regroupant les trois fractions 10, 12 et 14, obtenues après purification par chromatographie échangeuse d'anions faibles en gradient d'élution discontinu : A/ coloration au bleu de Coomassie ; B/ coloration au noir Soudan ; C/ coloration au vert de méthyle ; Std : standard ; R : fractions regroupées ; RC : fractions regroupées et concentrées.

Pour vérifier que la bande protéique principale est constituée de VTG et que la seconde résulte d'une dénaturation dépendante de la SDS-PAGE, une étude électrophorétique, en Native-

PAGE (6%) est réalisée sur la solution de VTG pure obtenue après regroupement des trois fractions 10, 12 et 14, et concentration (Figure 32). Les résultats obtenus montrent la présence d’une unique protéine dans la solution purifiée, d’un poids moléculaire d’environ 370 kDa, possédant des groupements phosphates et lipidiques.

Les trois pics protéiques séparés par la chromatographie échangeuse d’anions faibles, correspondent donc à l’élution d’une seule et unique molécule de VTG de carpe. Pourtant, l’obtention de trois pics traduit une différence de charge entre le contenu de chaque pic. La différence de charges serait donc, dans le cas de la carpe, suffisamment faible pour qu’elle n’implique aucune différence de poids moléculaire, contrairement aux cas des soles anglaises, des bars à rayure et des gobies (*Acanthogobius flavimanus*) où deux dimères sont détectables (Tao *et al.*, 1993, Roubal *et al.*, 1997, Ohkubo *et al.*, 2003). Cette différence serait la conséquence de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation).

### Rendement de purification

Le rendement de purification de cette nouvelle méthode est très satisfaisant puisqu’il permet d’obtenir une concentration suffisamment élevée pour produire des Acms. En effet, avec 400 µl de plasma de carpe traitée, nous obtenons 1 ml d’une solution de VTG dans du tampon phosphate de sodium contenant 4,4 mg de cette protéine pure. Le plasma de l’animal traité, utilisé pour purifier la VTG de carpe, contenait donc, au départ, au minimum 16,7 mg/ml de VTG (Tableau 20), soit environ 17 fois plus de VTG que ne peut en produire une carpe en vitellogénèse.

**Tableau 20 :** Estimation de la quantité de VTG présente dans 1 ml de plasma de carpe traitée par extrapolation des résultats obtenus avec 400 µl de plasma.

|                              | Valeurs expérimentales | Valeurs estimées |
|------------------------------|------------------------|------------------|
| Volume de plasma             | 400 µl                 | 1 ml             |
| <b>Après purification</b>    |                        |                  |
| Quantité de VTG              | 6,7 mg                 | 16, 7 mg         |
| <b>Après ultrafiltration</b> |                        |                  |
| Concentration en VTG         | 4,4 mg                 | 10,9 mg          |
| Volume final                 | 1 ml                   | 1 ml             |
| Perte protéique estimée      | 34 %                   | 34 %             |

Tyler *et al.* (1996) pensaient que les animaux traités ne pouvaient pas produire plus de VTG que le taux maximal normalement produit par une femelle en vitellogenèse (1mg/ml pour les carpes) (Tyler *et al.*, 1996). D'autres études réalisées sur les bars de mer et les soles anglaises ont, comme notre étude, démontré que cette valeur pouvait être dépassée (Mañanós *et al.*, 1994b, Roubal *et al.*, 1997).

### ***Exemple d'autres études***

Parallèlement à notre étude, deux autres équipes ont également mis au point une nouvelle méthode de purification de la VTG de carpe, utilisant un gradient d'élution discontinu. La première utilise une chromatographie d'hydroxylapatite et les protéines sont éluées avec un gradient discontinu de phosphate de potassium (0,2, 0,4, 0,8, 1,2 et 2,0 mol/l). Cette technique ne permet pas à elle seule de purifier totalement la VTG de carpe ce qui les oblige à recourir à une deuxième étape de purification par chromatographie de filtration sur gel (Fukada *et al.*, 2003). La seconde équipe utilise, quant à elle, une technique de chromatographie échangeuse d'anions sur membrane. Les protéines sont éluées avec un gradient discontinu de NaCl (0,07, 0,27, 0,33, 0,37, 0,47 et 1,07 M). Cette méthode possède l'avantage d'être très rapide : la molécule de VTG est éluée en moins de 5 min. Par contre, comme dans la méthode précédente, la VTG de carpe n'est pas totalement purifiée à l'issue de cette chromatographie. En effet, deux autres protéines sont toujours présentes dans la fraction où la VTG de carpe est éluée (Shi *et al.*, 2003).

La méthode chromatographique échangeuse d'anions faibles avec un gradient d'élution discontinu est plus appropriée pour purifier la VTG de carpe en une seule étape. Cette méthode permet d'obtenir une solution de VTG pure, non dénaturée, suffisamment concentrée pour pouvoir produire des Acms en moins de 30 min d'analyse (Magalhães *et al.*, 2004b).

### ***III. B. Production des anticorps monoclonaux spécifiques de la vitellogénine***

Le deuxième objectif de cette étude est de produire des anticorps (Acs) spécifiques de la VTG. Ces Acs pourront alors servir pour le développement d'un test d'agglutination permettant de reconnaître cette protéine. La solution pure de VTG de carpe préalablement purifiée sera utilisée comme immunogène.

#### ***III. B. - 1. Production des Acms anti- VTG de carpe***

##### ***III. B. - 1. 1. Sélection des souris***

Pour la production d'anticorps monoclonaux, trois souris BALB/c ont été immunisées avec une solution pure de VTG de carpe. Une semaine après la troisième injection un échantillon de sang est prélevé sur chaque souris, au niveau de la veine caudale. Les sérums obtenus sont analysés à l'aide d'un test ELISA indirect utilisant une solution de VTG à 200 ng/ml comme antigène et une solution d'anti-sérum dilué au 1/10000<sup>ième</sup> (contenant les Acs), afin de sélectionner les souris présentant les Acs, les plus réactifs vis-à-vis de la VTG, (Tableau 21).

Tableau 21 : Réactivité des Acs anti-VTG de carpe déterminée par chaque souris immunisées.

| Anti-sérum         | 1             | 2             | 3             |
|--------------------|---------------|---------------|---------------|
| Unité d'absorbance | 0.350 ± 0.021 | 0.630 ± 0.039 | 0.632 ± 0.027 |

Les souris 2 et 3 produisant les Acs anti-VTG les plus réatifs, sont choisies pour recevoir le dernier rappel intraveineux. La souris 1 a, quant à elle, été éliminée des essais. Quatre jours après, les souris sélectionnées sont sacrifiées et les cellules de la rate sont fusionnées avec des cellules myélomateuses spécifiques (SP2/O), selon le protocole développé par Galfré et Milstein (1981), modifié par Melchior *et al.* (2001).

### III. B. - 1. 2. Sélection des hybridomes

Chaque suspension cellulaire, obtenue à partir des deux fusions, réalisées avec les splénocytes des souris 2 et 3, est distribuée dans les puits de deux plaques 96 puits. Pendant 10 jours, les hybridomes issus de la fusion entre un splénocyte et un SP2/0, sont sélectionnés avec un milieu sélectif contenant du HAT (Hypoxanthine, Aminoptérine et Thymidine).

Trois cent quatre-vingt quatre surnageants de culture ont été analysés à l'aide d'un test ELISA indirect. Après dosages des Acs anti-VTG dans les surnageants de culture, 17 puits ont été retenus pour le clonage. Parmi ces puits, 10 provenaient de la fusion des splénocytes de la souris 2, et 7 de celle de la souris 3, soit environ 4,5 % des surnageants analysés (Tableau 22).

Tableau 22 : Valeurs de D.O. obtenues, en ELISA, à 492 nm, des 17 puits sélectionnés.

|                 | Nom du puits | DO    | Colonies  |
|-----------------|--------------|-------|-----------|
| <b>Souris 2</b> | A11          | 0,496 | Plusieurs |
|                 | B7           | 1,790 | Plusieurs |
|                 | D4           | 0,423 | Plusieurs |
|                 | D8           | 0,584 | 1         |
|                 | E8           | 1,483 | 1         |
|                 | F4           | 1,750 | 1         |
|                 | F7           | 0,605 | 1         |
|                 | G6           | 0,572 | 1         |
|                 | G10          | 1,278 | 1         |
|                 | H10          | 1,434 | Plusieurs |
| <b>Souris 3</b> | A3           | 1,109 | 1         |
|                 | C6           | 0,475 | Plusieurs |
|                 | D3           | 1,074 | 1         |
|                 | D9           | 0,517 | Plusieurs |
|                 | F3           | 0,569 | Plusieurs |
|                 | G3           | 0,616 | Plusieurs |
|                 | H9           | 1,292 | Plusieurs |

Enfin, une observation au microscope du contenu des puits a permis de déterminer ceux qui contenaient une ou plusieurs colonies. Seuls ceux qui contenaient une ou deux colonies ont été sélectionnés.



III. B. - 1. 3. Clonage

Première étape de clonage : par dilution limite

A partir des 8 hybrides issus d’une seule colonie, des dilutions limites ont été effectuées selon le protocole de Melchior (1998). Après une semaine de culture, les surnageants ont été testés en ELISA (Tableau 23) : 8 surnageants de culture ont ainsi présentés des résultats considérés comme positifs, c’est à dire avec une absorbance supérieure à 0,4 (492 nm).

Tableau 23 : Valeurs d’absorbances obtenues, en ELISA, à 492 nm, des différents surnageants obtenus après une première étape de clonage en milieu liquide par dilution limite.

| Puits d’origine | Clonage 1 | 18/12/01 | 28/12/01 | 07/01/02 | 11/01/02 | 16/01/02 | Clone      |
|-----------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| D8              | D8/2      | 0,638    | <0,4     | 0,652    | 0,823    | <0,4     | Monoclonal |
|                 | D8/6      | 1,084    | <0,4     | <0,4     | <0,4     | <0,4     | Monoclonal |
|                 | D8/9      | 1,100    | <0,4     | <0,4     | <0,4     | <0,4     | Monoclonal |
| F4              | F4/2      | 1,754    | 1,385    | 1,068    | 1,666    | 1,903    | Polyclonal |
|                 | F4/8      | 1,728    | 1,415    | 0,975    | 1,612    | 1,896    | Biclonal   |
|                 | F4/9      | 1,775    | 1,434    | 1,017    | 1,650    | 1,808    | Biclonal   |
|                 | F4/10     | 1,799    | 1,414    | 1,020    | 1,791    | 1,885    | Biclonal   |
| G10             | G10/5     | 1,820    | 1,511    | 0,974    | 1,716    | 1,893    | Triclonal  |

Deuxième étape de clonage : en agar noble 3%

Un mois et demi après le premier clonage, les contenus cellulaires, des puits G10/5, F4/2, F4/8 et F4/9 ont subi une nouvelle étape de clonage en agar noble 3% (Galfré et Milstein, 1981, Melchior *et al.*, 2001). Après 7-9 jours de culture, plusieurs clones monoclonaux ont été isolés :

- 10 clones pour le G10/5 parmi lesquels seulement 8 ont donné une réponse positive en ELISA ;
- seulement 4 clones ont été obtenus pour le F4/8 et le F4/9, donnant tous les quatre des résultats positifs en ELISA (Tableau 24).

Tableau 24 : Valeurs de D.O. obtenues, en ELISA, à 492 nm, des différents clones obtenus après les deux étapes de clonage, par dilution limite et en agar noble 3%.

| Puits d'origine | Clonage 1 | Clonage 2 | 22/01/02 | 24/01/04 | 29/01/02 | 25/04/02 | Clone      |
|-----------------|-----------|-----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| G10             | G10/5     | G10/5/1   | 0,563    | 0,621    | 0,605    | 1,315    | Monoclonal |
|                 |           | G10/5/2   | 0,641    | 0,571    | 0,699    | 1,335    | Monoclonal |
|                 |           | G10/5/3   | 0,679    | 0,576    | 0,610    | 1,229    | Monoclonal |
|                 |           | G10/5/4   | 0,680    | 0,634    | 0,697    | 1,217    | Monoclonal |
|                 |           | G10/5/6   | -        | 0,626    | 0,646    | 1,286    | Monoclonal |
|                 |           | G10/5/7   | -        | 0,666    | 0,619    | 1,173    | Monoclonal |
|                 |           | G10/5/8   | -        | 0,695    | 0,602    | 1,325    | Monoclonal |
|                 |           | G10/5/9   | -        | 0,630    | 0,612    | 1,299    | Monoclonal |
| F4              | F4/8      | F4/8/1    | -        | -        | 0,818    | 1,291    | Monoclonal |
|                 |           | F4/8/2    | -        | -        | 0,681    | 1,178    | Monoclonal |
|                 | F4/9      | F4/9/1    | -        | -        | 0,796    | 1,165    | Monoclonal |
|                 |           | F4/9/2    | -        | -        | 0,795    | 1,150    | Monoclonal |

**III. B. - 1. 4. Passage en culture grand volume**

Les contenus des 12 puits, cités précédemment ont été progressivement repiqués dans des volumes de milieu de culture de plus en plus grands jusqu'à l'obtention d'une culture stable en flasques de 80 cm<sup>3</sup> (35 ml). Parallèlement une observation au microscope a permis de voir que parmi les 8 clones (G10/5/1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 et G10/5/9), seuls G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 étaient adhérents.

Après trois mois de repiquage, au vu des résultats obtenus en ELISA et des observations au microscope, trois clones ont été sélectionnés : le G10/5/1, le F4/8/1 et le F4/9/1.

**III. B. - 1. 5. Caractéristiques des trois anticorps monoclonaux**

*Isotypes*

Un isotypage de trois Acms G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 a été réalisé après purification à l'aide d'une solution de sulfate d'ammonium saturée (concentration finale en sulfate d'ammonium égale à 35%). Les résultats obtenus montrent que ces trois Acs appartiennent à la classe des IgG1. Il en est de même pour les autres Acms spécifiques des VTGs de médaka

(*Oryzias latipes*) et de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) produits par d'autres équipes (Marx *et al.*, 2001, Nishi *et al.*, 2002).

*Spécificité vis-à-vis de la carpe*

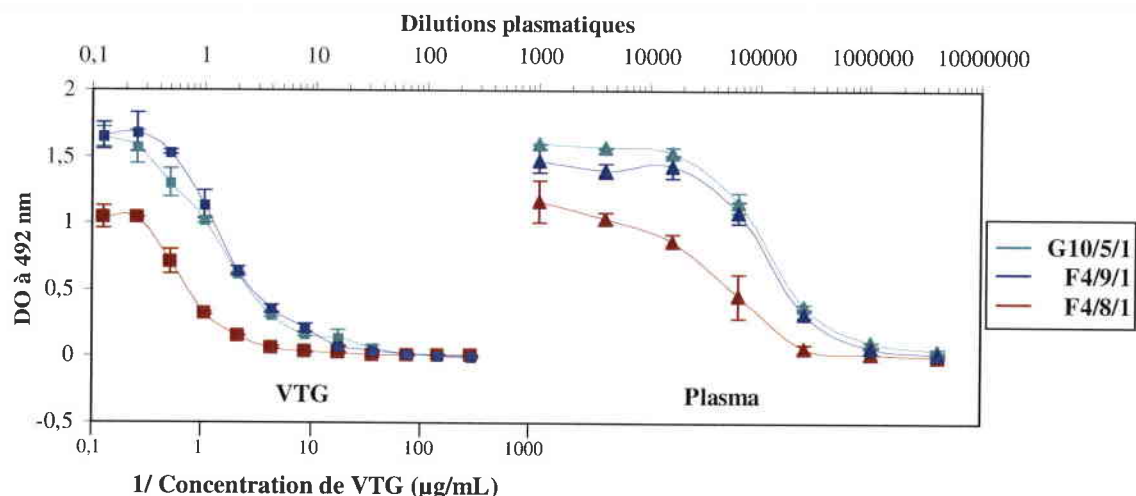
Ces Acs possèdent non seulement la capacité de reconnaître spécifiquement la VTG de carpe purifiée, mais aussi celle de femelles en vitellogenèse, et de carpes traitées avec de l'œstradiol. Ainsi, des valeurs élevées d'absorbances (de 0,391 à 1,598) ont été mesurées avec les trois Acms dans ces échantillons plasmatiques, les valeurs les plus faibles ayant été obtenues pour les échantillons plasmatiques de carpes femelles en vitellogenèse. Les valeurs mesurées chez carpes mâles traitées, elles sont légèrement inférieures à celles des carpes femelles traitées. De plus, aucun de trois Acms n'a interagi avec aucune protéine plasmatique de carpes mâles non-traitée (témoins négatifs) ou de femelles qui n'étaient pas en vitellogenèse, même à une dilution 10 fois moins importante que pour les animaux traités (Tableau 25).

Tableau 25 : Détection de la VTG de carpe par les trois anticorps monoclonaux, le G10/5/1, le F4/8/1 et le F4/9/1, à l'aide d'un test ELISA : valeurs d'absorbances obtenues à 492 nm.

| Carpe                        | Dilution | G10/5/1       | F4/8/1        | F4/9/1        |
|------------------------------|----------|---------------|---------------|---------------|
| Mâle non-traité              | 1/100    | nd            | nd            | nd            |
| Femelle non en vitellogenèse | 1/100    | nd            | nd            | nd            |
| Femelle en vitellogenèse     | 1/100    | 0,391 ± 0,009 | 0,424 ± 0,006 | 0,428 ± 0,013 |
| Femelle traitée              | 1/1000   | 1,598 ± 0,004 | 1,162 ± 0,157 | 1,472 ± 0,089 |
| Mâle traité                  | 1/1000   | 1,255 ± 0,041 | 0,984 ± 0,013 | 0,984 ± 0,034 |

*Affinité vis-à-vis de la carpe*

L'affinité de différents Acs peut être comparée à l'aide de tests ELISA (Mylchreest *et al.*, 2003). Pour cela, plusieurs dilutions de la solution pure de VTG de carpe (de 4 à 8000 ng/ml) et du plasma d'une carpe traitée (de 1/1000 à 1/4096000) sont préparées et analysées à l'aide d'un test ELISA indirect (Figure 33).



**Figure 33 :** Affinité des différents Acms pour la VTG purifiée et pour la VTG présente dans le plasma d'animaux traités avec de l'œstradiol.

Les résultats indiquent que l'affinité des trois Acms pour la VTG de carpe est identique puisque les courbes de dilutions sont parallèles. Il en est de même, pour l'affinité des Acms pour la VTG produite par les carpes traitées. Par contre, le plateau de saturation du F4/8/1 est atteint pour une valeur d'absorbances plus faible que pour les deux autres Acms. L'échantillon plasmatique utilisé, pour l'analyse de l'affinité des trois Acms, étant identique, cette différence ne traduit donc pas une différence de concentration en VTG. Elle indiquerait, plutôt, une affinité plus faible de l'Acm F4/8/1 pour la VTG.

### III. B. - 2. Sélection des Acms anti-VTGs multi-espèces

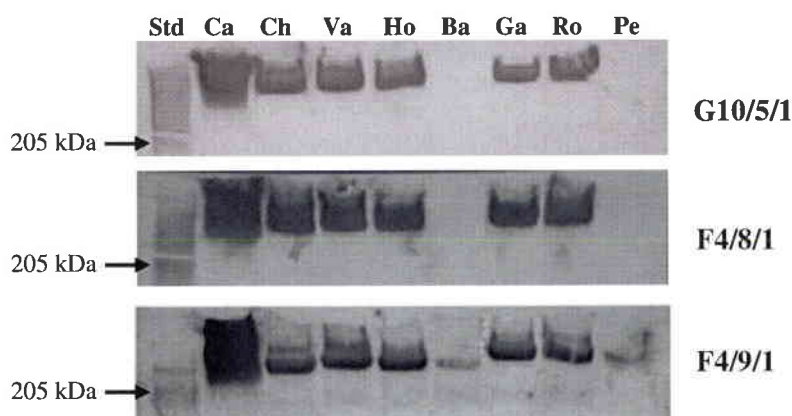
Afin de déterminer si les trois Acms sélectionnés pour leur haute affinité vis-à-vis de la VTG de carpe *Cyprinus carpio* reconnaissent également la VTG d'autres espèces de poissons appartenant à la famille des Cyprinidés ou à d'autres familles, des tests de croisement sont réalisés par western blot, et par ELISA avec :

- six espèces de la famille des cyprinidés : le chevesne (*Leusiscus cephalus*), la vandoise (*Leusiscus leusiscus*), le hotu (*Chondrostoma nasus*), le rotengle (*Scardinius erythrophthalmus*), le barbeau (*Barbus barbus*), le gardon (*Rutilus rutilus*),
- et une espèce de la famille des percidés, la perche (*Perca fluviatilis*).

### III. B. - 2. 1. Affinité pour les cyprinidés

#### Western blot

Après avoir séparées, par électrophorèse Native-PAGE (6%), les protéines composant chaque échantillon plasmatique provenant des poissons cités préalablement, un Western blot est réalisé avec les Acms : G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 (Figure 34).



**Figure 34 :** Etude des réactions croisées entre les 3 Acms, le G10/5/1, le F4/8/1 et le F4/9/1 et les molécules de VTG de plusieurs espèces de poissons : la carpe (Ca), le chevesne (Ch), la vandoise (Va), le hotu (Ho), le barbeau (Ba), le gardon (Ga), le rotengle (Ro) et la perche (Pe).

Une seule et unique bande protéique dont le poids moléculaire est environ égal à 370 kDa, ce qui correspond à la VTG de carpe, est détectée par les trois Acms, chez 4 espèces de cyprinidés, autres que la carpe : le chevesne, la vandoise, le gardon et le rotengle. L'intensité de la bande protéique obtenue pour ces 4 espèces indique que la concentration en VTG chez ces animaux est plus faible que celle détectée chez la carpe qui est la seule à avoir été traitée avec de l'œstradiol. De plus, un résultat positif peut être observé avec l'échantillon plasmatique provenant du rotengle bien que celui-ci soit un mâle ne produisant normalement pas de VTG. Ce résultat pourrait être lié à la provenance des poissons utilisés : ces animaux ont été pêchés dans la Moselle où déjà des problèmes de féminisation ont été observés (Flammarion *et al.*, 2000)

Quant à la VTG du barbeau et de la perche, elles sont détectées uniquement par le F4/9/1. Par conséquent, cet Acn semble reconnaître un épitope différent des deux autres Acms. Cet épitope, commun à plus d'espèces de poissons, se serait donc mieux conservé au cours de l'évolution.

Théoriquement, il serait, donc, possible de trouver une ou plusieurs séquences d’acides aminés communes aux différentes espèces qui pourraient être utilisées pour produire des Acs spécifiques de toutes les VTGs existantes chez les poissons. Ces 15 dernières années, quelques études ont tenté de trouver ces épitopes communs. Les résultats obtenus montrent que des Acs produits contre une espèce sont capables de reconnaître la VTG d’une autre espèce de poisson, appartenant le plus souvent à la même famille phylogénétique (Tyler et Sumpter, 1990b, Tyler *et al.*, 1996, Tyler *et al.*, 1999, Fukada *et al.*, 2001, Mylchreest *et al.*, 2003) et dans quelques cas à une autre famille (Hennies *et al.*, 2003) (Tableau 26).

Tableau 26 : Anticorps polyclonaux croisant avec plusieurs espèces de poissons (Tyler et Sumpter, 1990b) [1], (Tyler *et al.*, 1996) [2], (Tyler *et al.*, 1999) [3], (Fukada *et al.*, 2001) [4], (Hennies *et al.*, 2003) [5] et (Mylchreest *et al.*, 2003) [6].

| Espèce spécifique  | Autres espèces reconnues                             | Famille    | Références |
|--------------------|------------------------------------------------------|------------|------------|
| Carpe miroir       | Carpe commune                                        | Cyprinidés | [1]        |
|                    | Carpe koï                                            |            |            |
|                    | Carpe crustacé ( <i>Carassius carassius</i> )        |            |            |
|                    | Carpe grass ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )       |            |            |
|                    | Tanche ( <i>Tinca tinca</i> )                        |            |            |
|                    | Vandoise                                             |            | [2]        |
|                    | Gardon                                               |            |            |
|                    | Brème                                                |            |            |
|                    | Rotengle                                             |            |            |
|                    | Gougeons ( <i>Gobio gobio</i> )                      |            |            |
|                    | Vairon ( <i>Phoxinus phoxinus</i> )                  |            |            |
|                    | Poisson zèbre ( <i>Brachydanio rerio</i> )           |            |            |
|                    | Goldfish ( <i>Carassius auratus</i> )                |            |            |
|                    | Poisson tête de boule ( <i>Pimephales promelas</i> ) |            |            |
| Perche             | Perche                                               | Percidés   | [5]        |
|                    | Carpe miroir                                         | Cyprinidés |            |
| Truite arc-en-ciel | Truite Cutthroat ( <i>Oncorhynchus clarki</i> )      | Salmonidés | [4]        |
|                    | Saumon masu ( <i>Oncorhynchus masu</i> )             |            |            |
|                    | Sakhalin taimen ( <i>Hucho perryi</i> )              |            |            |
|                    | White-spotted char ( <i>Salvelinus leucomaenis</i> ) |            |            |

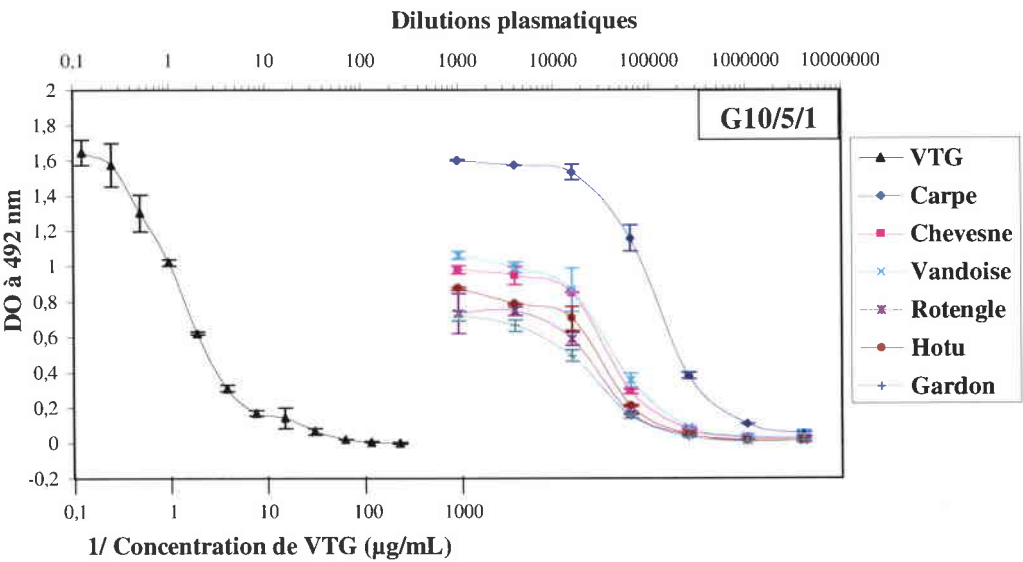
Généralement, ces Acs sont souvent spécifiques d’une famille. Cependant l’Acp produit par l’équipe de Tyler, reconnaissant 14 membres de la famille des cyprinidés, peut aussi reconnaître un représentant de la famille des percidés. Par contre, il ne reconnaît pas les molécules de VTG de la truite arc-en-ciel, du guppy (*Poecilia reticulata*) ou bien de la sole

(*Solea solea*), appartenant respectivement aux familles des salmonidés, cyprinodontiformes ou des pleuronectiformes (Tyler et Sumpter, 1990b, Tyler *et al.*, 1996, Tyler *et al.*, 1999, Hennies *et al.*, 2003, Mylchreest *et al.*, 2003).

Un Acs spécifique d'une famille de poissons ne reconnaît pas forcément toutes les espèces de cette famille. Ainsi, par exemple, G10/5/1 et F4/9/1 ne reconnaissent pas la VTG du barbeau qui appartient pourtant à la famille des cyprinidés. D'un autre côté, même si un Ac reconnaît spécifiquement la VTG de plusieurs espèces de poissons, l'affinité de celui-ci vis-à-vis des différentes molécules de VTG peut être très différente (Mylchreest *et al.*, 2003). Ainsi, par exemple, dans le cas du barbeau, le résultat obtenu en western blot avec le F4/9/1 peut traduire une affinité plus faible de cet Acs vis-à-vis de la VTG.

**ELISA**

L'affinité de différents Acs peuvent être comparée à l'aide de tests ELISA (Tyler *et al.*, 1999, Fenske *et al.*, 2001) ou des tests RIA (Tyler et Sumpter, 1990b, Tyler *et al.*, 1996) peuvent être utilisés. Afin d'évaluer l'affinité des trois Acms (G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1) pour les VTGs des six espèces de poissons étudiés, un test ELISA indirect a été réalisé, avec plusieurs dilutions plasmatiques (de 1/1000 à 1/4096000) et plusieurs dilutions de la solution pure de VTG de carpe (de 4 à 8000 ng/ml) (Figures 35, 36 et 37).



**Figure 35 :** Test de croisement entre le G10/5/1 et les molécules de VTG issues de différentes espèces de cyprinidés.



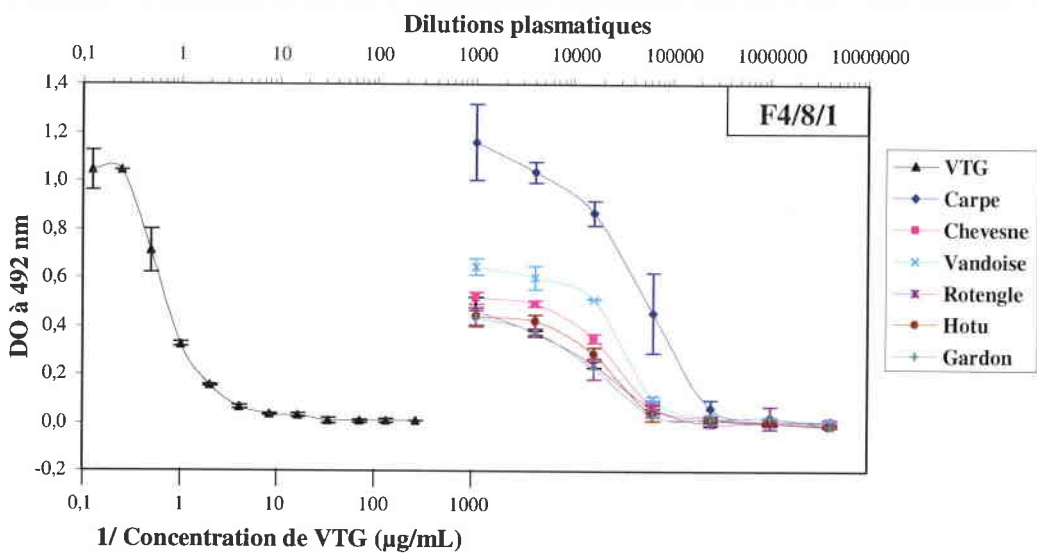


Figure 36 : Test de croisement entre le F4/8/1 et les molécules de VTG issues de différentes espèces de cyprinidés.

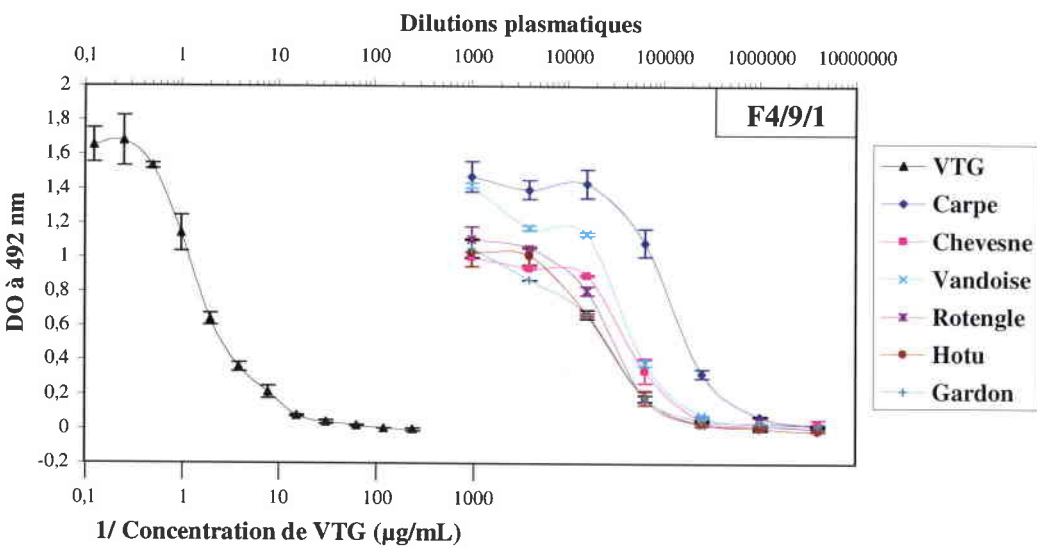


Figure 37 : Test de croisement entre le F4/9/1 et les molécules de VTG issues de différentes espèces de cyprinidés.

Les résultats obtenus avec les trois Acms, en ELISA, confirment le fait que G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 reconnaissent la VTG de carpe, de chevesne, de vandoise, de rotengle, de hotu et de gardon. De plus, leur affinité pour la VTG de ces différentes espèces est du même ordre puisque les courbes de dilutions sont parallèles. D'autres part, pour la carpe, le plateau de saturation est obtenu à des valeurs d'adsorbances plus élevées que pour les autres espèces.



Dans ce cas, cette différence peut traduire :

- une concentration supérieure en VTG dans l'échantillon plasmatique de la carpe,
- ou une affinité plus élevée des Acms pour la VTG de carpe.

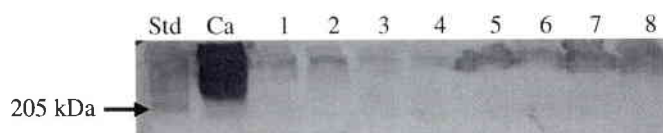
Aucune réponse positive en ELISA n'a été obtenue avec le barbeau et le F4/9/1, quelle que soit la dilution plasmatique testée (1/2 à 1/1000000) bien que cet Ac ait reconnu spécifiquement la VTG de barbeau par la technique de western blot (Figure 34). De plus, les Acs F4/9/1 donnent des réponses positives avec la VTG de barbeau lors de la réalisation des tests d'agglutination (Voir *III.B.-3.2.3*).

Dans les westerns blot, les antigènes (Ags) sont concentrés, favorisant ainsi l'interaction anticorps-antigènes, et cela, même si l'affinité de l'Ac pour l'Ag est très faible. Par contre, les lavages successifs, réalisés en ELISA, empêchent que les interactions de très faible affinité se conservent.

### ***III. B. - 2. 2. Affinité pour la perche***

Les résultats en western blot indiquent que le F4/9/1 reconnaît à la fois, la VTG de plusieurs cyprinidés et de la perche, comme l'Ac polyclonal produit par Hennies et son équipe (2003) (Figure 34). La réponse plus faible obtenue avec la perche, par rapport à celle présentée par les cyprinidés, résulte :

- soit de la présence d'une quantité plus faible de VTG dans le plasma de la perche femelle en vitellogenèse testée,
- soit de la faible affinité de cet Ac pour la VTG de perche.



**Figure 38 :** Etude de l'affinité du F4/9/1 pour la VTG de perche. Ca : carpe ; 1 à 4 : perche femelle en vitellogenèse ; 5, 7 et 8 : perche femelle traitée avec de l'œstradiol ; 6 : perche mâle traitée.

Pour vérifier cela, la surexpression de la VTG de perche a été induite à l'aide d'un traitement avec de l'œstradiol. Les résultats obtenus en western blot montrent que le traitement induit bien une augmentation de la concentration en VTG plasmatique (Figure 38) comme le montre l'épaisseur des bandes chez les animaux traités par rapport aux poissons contrôles qui sont tous des femelles en vitellogénèse (Tableau 27) Par ailleurs, le troisième animal traité est un mâle (Tableau 27), et d'après les résultats du western blot, le traitement induit une production de VTG inférieure à celle induite chez les femelles traitées. Les résultats sont, par conséquent, proportionnels à la quantité de VTG présente dans le plasma.

Tableau 27 : Sexe et stade de développement des perches non-traitées et traitées, déterminés histologiquement (Gupta, 1975).

| Numéros               | Sexe    | Stade de développement |
|-----------------------|---------|------------------------|
| Perches non- traitées |         |                        |
| 1                     | Femelle | 3                      |
| 2                     | Femelle | 2                      |
| 3                     | Femelle | 1                      |
| 4                     | Femelle | 3                      |
| Perches traitées      |         |                        |
| 5                     | Femelle | 3                      |
| 6                     | Mâle    | 1                      |
| 7                     | Femelle | 3                      |
| 8                     | Femelle | 3                      |

Par contre, malgré l'augmentation de VTG chez ces animaux aucun résultat en ELISA n'a été obtenu quelles que soient les dilutions plasmatiques testées. Comme dans le cas de la VTG de barbeau, ce résultat peut traduire soit une faible affinité du F4/9/1 pour la VTG de perche soit une production plus faible de VTGs chez les perches traitées.

*Les trois Acms produits (G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1) sont spécifiques de la VTG de plusieurs espèces de cyprinidés. Pour autant, ils ne sont pas tous spécifiques de tous les cyprinidés puisque deux d'entre eux ne reconnaissent pas le barbeau (G10/5/1 et F4/8/1). Quant à l'Acm qui reconnaît le barbeau (le F4/9/1) il reconnaît également la VTG de la perche, qui est le représentant majeur de la famille des percidés (Hennies et al., 2003).*

### ***III. C. Développement d'un test d'agglutination***

Actuellement, plusieurs tests immunologiques de type ELISA et RIA ont été mis au point pour doser avec précision la quantité anormalement produite de VTG par les poissons mâles ou les jeunes immatures contaminés par des ŒMs. Par contre, aucun test de diagnostic rapide, simple d'utilisation, directement utilisable sur le terrain, n'a encore été développé.

Le dernier objectif de cette étude est le développement d'un test qui réponde à ces critères et permet ainsi rapidement de :

- cartographier les sites pollués,
- déterminer l'emplacement des sources de pollutions,
- et de faire un suivi régulier de la pollution.

Le type de test sélectionné est un test d'agglutination. Ce test d'agglutination, appelé VTG-LAT (vitellogenin latex agglutination test) est constitué de billes de latex recouvertes d'Acms spécifiques de la VTG. Après la capture d'un poisson mâle ou d'un jeune immature, un échantillon de sang d'environ 100  $\mu$ l est prélevé. Vingt cinq microlitres de sérum sont mis en contact avec un volume identique de la suspension de billes recouvertes d'Acms. L'ensemble est mélangé par des mouvements circulaires inclinés, pendant 5 min. Parallèlement, 25 autres  $\mu$ l de sérum, du poisson étudié, sont mélangés avec un échantillon de billes non-recouvertes, qui servira de témoin négatif. Le témoin positif est réalisé avec une solution de VTG. Lors de la réalisation du test, des agglutinations visibles à l'œil nu ont lieu seulement en présence de plasmas contenant la VTG et des billes recouvertes par des Acs.

La mise au point de ce test d'agglutination implique l'utilisation de plusieurs tailles de billes (2  $\mu$ m et 1  $\mu$ m) et la mise au point d'un protocole d'adsorption pour chaque type de billes de latex. Enfin, l'immunoréactivité des complexes billes-Acms obtenus a dû, également, être optimisée.

### ***III. C. - 1. Développement avec des billes de 2 µm***

Un premier test d'agglutination avait déjà été développé par notre laboratoire, avec des billes de latex de 2 µm pour la reconnaissance d'une protéine membranaire d'environ 45 kDa de la bactérie du sol *Ralstonia metallidurans* CH34 (Melchior *et al.*, 2001). Les Acs utilisés pour mettre au point ce test étaient aussi des anticorps monoclonaux de type IgG<sub>1</sub>.

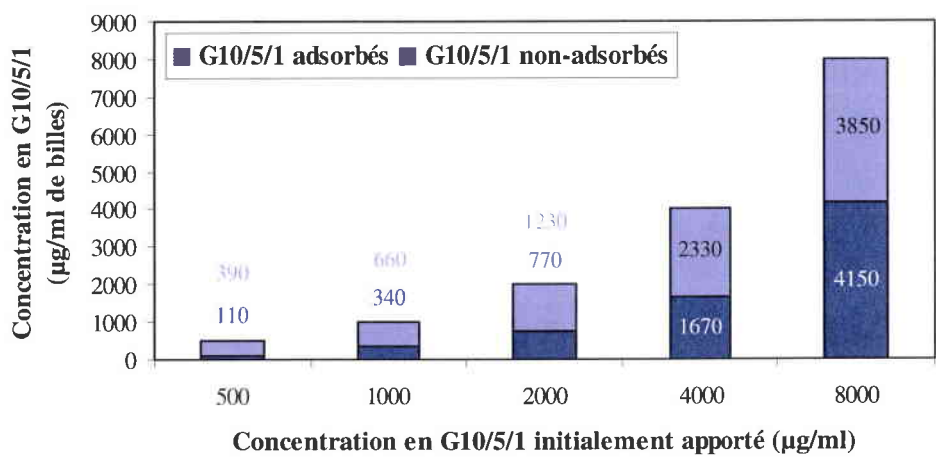
Les résultats d'immunoagglutination obtenus avec ce test étant pertinents, un premier essai de mise au point d'un test d'agglutination pour détecter la production anormale de VTG, par les poissons mâles ou les jeunes immatures, a été réalisé dans des conditions proches. Le tampon d'adsorption utilisé est un tampon carbonate-bicarbonate 0,5 M, dont le pH est égal à 9,6. Ce tampon est celui préconisé par le fabricant pour maintenir la stabilité des billes de 2 µm, c'est-à-dire pour maintenir l'équilibre entre les forces attractives de Van der Waals générées par le composant hydrophobe des billes et les forces répulsives électrostatiques générées par les charges des billes (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

#### ***III. C. - 1. 1. Effet de la concentration initiale en Acms sur le processus d'adsorption***

Ce premier essai de mise au point d'un test d'agglutination a été réalisé avec le premier Acm anti-VTG produit, l'Acm G10/5/1, de fait de son affinité élevée pour la VTG de carpe *Cyprinus carpio*. Plusieurs concentrations (500, 1000, 2000, 4000 et 8000 µg/ml) de cet Acm ont été testées pour évaluer l'adsorption des ces Acms sur les billes de latex.

#### ***Adsorption des Acms sur les billes de latex de 2 µm***

Le dosage protéique des solutions restantes après adsorption a permis de calculer les concentrations en Acm G10/5/1 non-adsorbés en µg/ml de billes. A partir de ces résultats, et des concentrations d'Acm G10/5/1 initialement apportées, les concentrations d'Acm G10/5/1 adsorbés par ml de billes ont été estimées.



**Figure 39 :** Rapport entre les concentrations en G10/5/1 initialement apportées, non-adsorbées, et adsorbées sur les billes de 2 µm.

Les résultats montrent que la totalité des Acms G10/5/1 initialement apportés n’est pas adsorbée sur les billes (Figure 39). Un équilibre s’installe entre la quantité d’Acms adsorbés sur les billes et la quantité d’Acms non-adsorbés (voir *I.E.-4.1.*) (Serra *et al.*, 1992). Cet équilibre dépend de plusieurs phénomènes (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003) :

- de la probabilité de rencontre entre les billes et les Acs dans le mélange,
- des forces attractives de Van der Waals générées par la surface non recouverte des billes,
- et des forces répulsives électrostatiques associés à l’encombrement stérique généré par les Acs déjà adsorbés sur les billes.

Ainsi, quand les concentrations en Acs sont très faibles, la probabilité de contact entre un Ac et une bille est elle aussi très faible. C’est pourquoi, pour la concentration initiale en Acm G10/5/1 égale à 500 µg/ml, le pourcentage d’Acms adsorbés n’est que de 22 %. Au fur et à mesure que la concentration initiale en Acs augmente, la probabilité de rencontre, entre ces Acs et les billes, croît. Le pourcentage d’Acs adsorbés passe de 22 % à 52 % dans notre étude (Tableau 28).

**Tableau 28 :** Répartition entre le pourcentage en G10/5/1 adsorbés sur la surface des billes de 2µm et celui en G10/5/1 non-adsorbés à l’équilibre.

| Pourcentage de G10/5/1 | Concentration initiale en G10/5/1 (µg/ml) |      |      |      |      |
|------------------------|-------------------------------------------|------|------|------|------|
|                        | 500                                       | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 |
| Adsorbés               | 22                                        | 34   | 38   | 42   | 52   |
| non-adsorbés           | 78                                        | 66   | 62   | 58   | 48   |

Ceci est valable tant que le point de saturation des billes de 2  $\mu\text{m}$  n'est pas atteint. Le point de saturation résulte, à la fois :

- d'une saturation de type mécanique : la surface des billes encore libre n'est plus accessible, du fait de l'encombrement stérique généré par les Acs déjà adsorbés,
- d'une saturation de type électrostatique : les forces électrostatiques répulsives générées par les Acs déjà adsorbés deviennent tellement importantes qu'elles empêchent l'adsorption de nouveaux Acs (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

Au-delà du point de saturation, le pourcentage d'adsorption diminue.

### *Isotherme d'adsorption*

Pour déterminer si ce point de saturation a été atteint avec les concentrations en G10/5/1 étudiées, un isotherme d'adsorption a été tracé à partir des concentrations en G10/5/1 non-adsorbées et adsorbées sur les billes de 2  $\mu\text{m}$ .

La courbe obtenue (Figure 40) montre que le point de saturation des billes de 2  $\mu\text{m}$  n'est pas encore atteint. D'ailleurs, pour la concentration la plus élevée en Acms initialement apportés (8000  $\mu\text{g/ml}$ ), le processus d'adsorption se situe encore dans sa phase croissante. En effet, alors que pour les concentrations initiales comprises entre 500 et 4000  $\mu\text{g/ml}$ , l'adsorption est inférieure à 50 %, pour la concentration en G10/5/1 initiale de 8000  $\mu\text{g/ml}$ , l'adsorption est supérieure à 50 % de la valeur estimée.

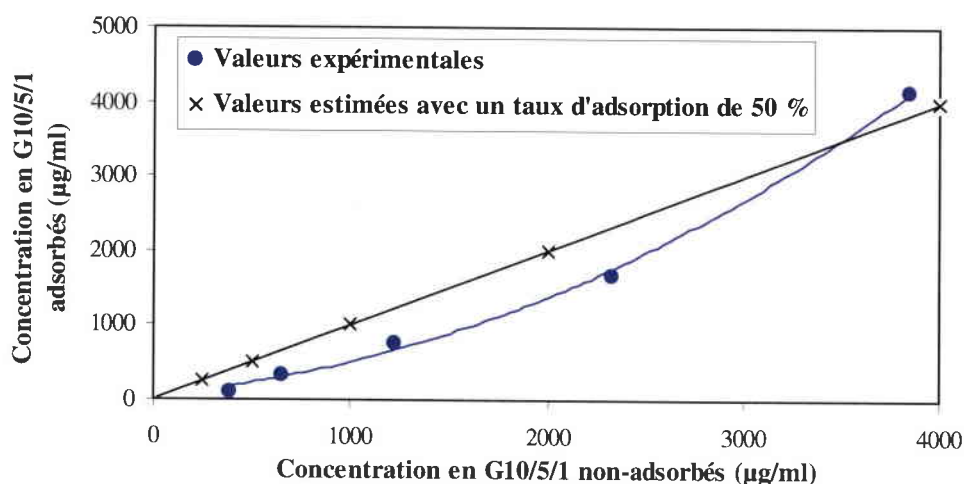


Figure 40 : Isotherme d'adsorption du G10/5/1 sur la surface des billes de latex de 2  $\mu\text{m}$ .

*Isotherme de Freundlich*

En sachant que la saturation n'est pas atteinte et afin de confirmer les résultats de l'isotherme d'adsorption ainsi que pour déterminer l'affinité et la capacité d'adsorption des billes de latex de 2 µm, un isotherme de Freundlich obtenu par transformation logarithmique népérien de l'isotherme d'adsorption, a été tracé (Figure 41).

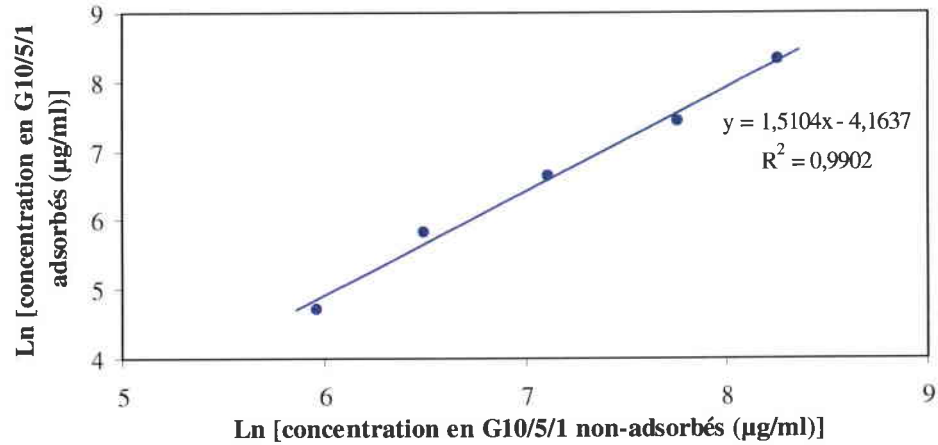


Figure 41 : Isotherme de Freundlich modélisant l'affinité des anticorps G10/5/1 pour la surface des billes de 2 µm.

L'obtention d'une droite confirme que le point de saturation des billes de 2 µm n'est pas atteint, pour les concentrations en G10/5/1 étudiées (Figure 41). En effet, la concentration en Acms adsorbés croît continuellement.

De plus, ce résultat indique que l'affinité des Acms G10/5/1 sur les billes de 2 µm reste constante quelques soient les concentrations en G10/5/1 adsorbés et non-adsorbés, avec une valeur  $k$  est égale à 0,0155 (Figure 41). Quant à la valeur de la capacité d'adsorption ( $1/n$ ) des billes de 2 µm, elle est égale à 1,510.

*Modèle de Scatchard*

Pour mieux comprendre, le processus d'adsorption de l'Acm G10/5/1, sur les billes de 2 µm, un troisième modèle mathématique est utilisé : le modèle de Scatchard. Les Acs, et plus particulièrement les IgGs, comme le G10/5/1, possèdent souvent plusieurs phases d'adsorption

(Molina-Bolívar *et al.*, 1998a, Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003) que ce modèle permet de visualiser.

La courbe biphasique obtenue indique que les Acms G10/5/1 possèdent deux phases d'adsorption présentant chacune une constante d'association différente dont les valeurs sont  $k'_a = 0,001$  pour les concentrations les plus faibles, et  $k'_b = 0,0001$  pour les concentrations les plus élevées (Figure 42).

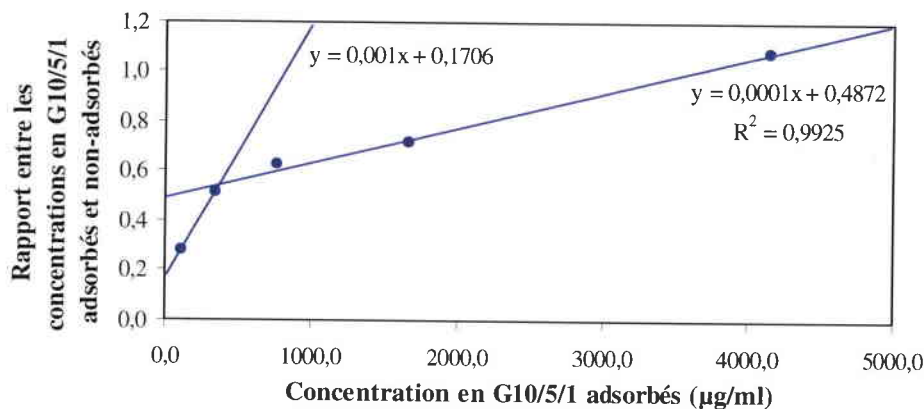


Figure 42 : Modèle de Scatchard modélisant les différents modes d'association des anticorps G10/5/1 avec la surface des billes de 2 µm.

Les deux droites décrivant une figure convexe, la coopération est positive (Falla et Block, 1993). Autrement dit, pour les concentrations en G10/5/1 étudiées, plus la concentration en G10/5/1 initialement apportée est élevée plus le phénomène s'accélère. Cette accélération qui résulte de l'augmentation de la probabilité de rencontre des Acms et des billes, est plus importante pour les concentrations les plus faibles puisque leur constante d'association est 10 fois supérieure. Nous sommes, donc, dans ce cas, très loin du point de saturation des billes de 2 µm.

La droite obtenue avec les concentrations les plus élevées traduit la mise en place de l'équilibre entre les phénomènes qui favorisent l'adsorption (probabilité élevée de rencontre entre les Acs et les billes, forces de Van der Waals) et ceux qui l'entravent (Forces répulsives générées par les Acs déjà adsorbés sur les billes) (Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).



### ***III. C. - 1. 2. Immunoréactivité***

Après avoir analysé la capacité d'adsorption des Acms G10/5/1 sur la surface des billes de 2  $\mu\text{m}$ , l'immunoréactivité des différents complexes a été testée avec des échantillons plasmatiques provenant :

- de carpes mâles non-traitées (témoins négatifs),
- et de carpes, femelles ou mâles, traitées avec 10  $\mu\text{g/g}$  d'œstradiol,
- un témoin agglutination a été réalisé avec des billes non-recouvertes d'Acms.

#### ***Résultats des complexes de billes B-G10/5/1 non saturées en albumine***

Les résultats obtenus avec les complexes billes-G10/5/1, non saturées d'albumine (BSA ou Bovine Serum Albumin), sont reportés dans la figure 43. Aucune agglutination n'a été observée avec les billes non-recouvertes d'Acms, et ceci quelques soient les échantillons plasmatiques testés (Figures 43 a, b). De plus, aucune agglutination ne s'est formée avec les billes recouvertes et l'échantillon plasmatique provenant d'une carpe mâle non-traitée (Figure 43 c, f, et h). Les agglutinations observées avec les billes recouvertes et les plasmas de carpes traitées (mâle ou femelle) sont, par conséquent, spécifiques de l'interaction G10/5/1-VTG (Figures 43 d, e, et g).

Le nombre et la taille des agglutinats augmentent proportionnellement à la concentration en G10/5/1 adsorbés sur les billes, jusqu'à la concentration de 340  $\mu\text{g/ml}$  environ (Figure 43 e). Au delà de cette concentration, la taille et le nombre des agglutinats diminuent (Figure 43 g).

A partir de la concentration environ égale à 1670  $\mu\text{g/ml}$ , plus aucune agglutination n'est visible (Figure 43 i). Ce phénomène a également été observé dans d'autres études (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1996, Molina-Bolívar *et al.*, 1998b, c, Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001). Dans certains cas, il peut être dû à l'encombrement stérique provoqué par une trop grande quantité d'Acs adsorbés sur la surface des billes, réduisant l'accès aux Ags. Dans nos essais, il est plus probable que ce phénomène soit dû à un excès d'Ag provoquant un encombrement des paratopes et par conséquent une inhibition de l'immunoréactivité.

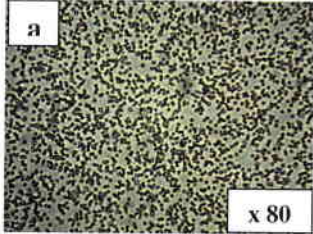
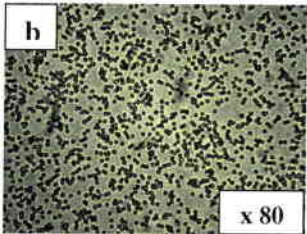
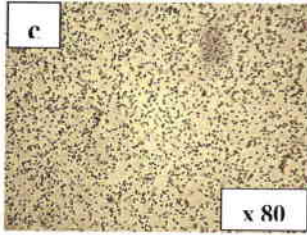
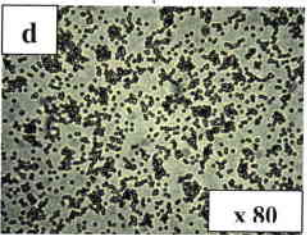
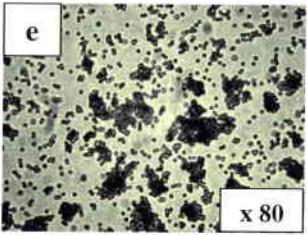
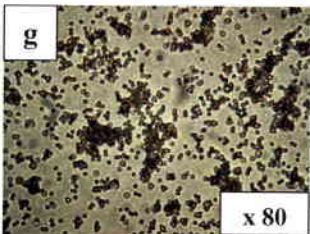
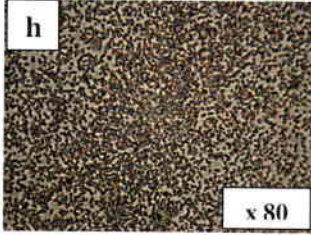
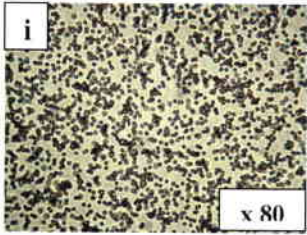
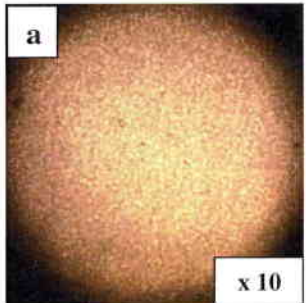
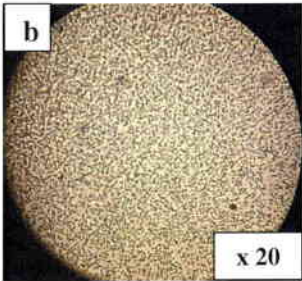
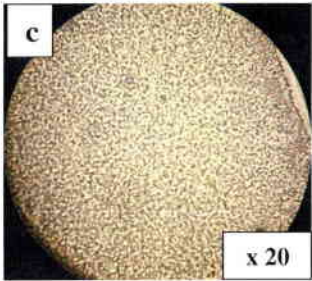
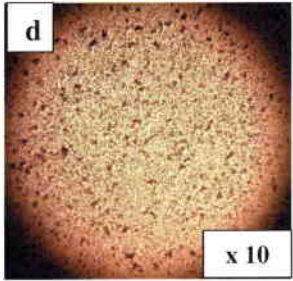
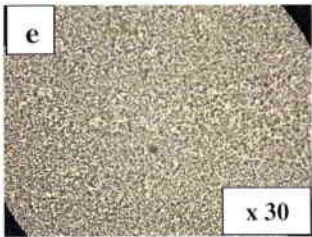
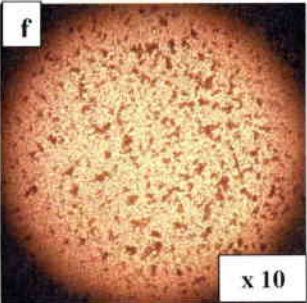
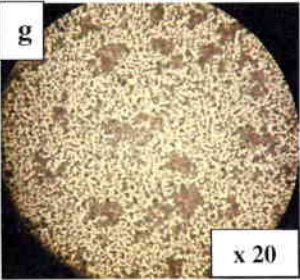
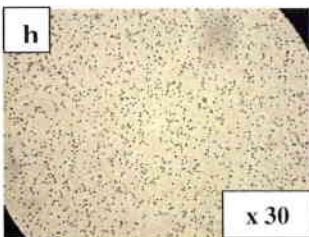
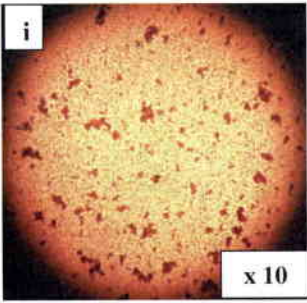
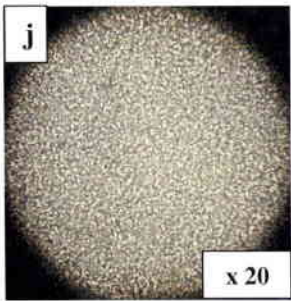
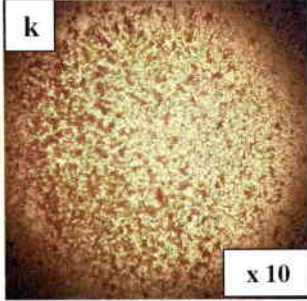
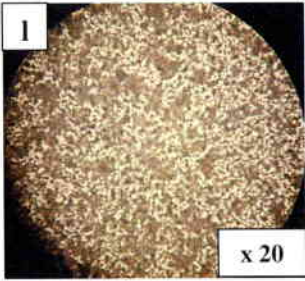
| G10/5/1 adsorbés<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Carpes mâle témoins                                                                 | Carpes femelle et mâle traitées                                                      |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                        |    |    |
| 110                                      |    |    |
| 340                                      |                                                                                     |   |
| 770                                      |  |  |
| 1670                                     |  |  |

Figure 43 : Résultats du test d'agglutination développé avec des billes de 2  $\mu\text{m}$  recouvertes de G10/5/1, dont les sites non-spécifiques n'ont pas été saturés.

| G10/5/1 adsorbés<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Carpes mâles témoins                                                                | Carpes, femelles ou mâles, traitées                                                 |                                                                                       |
|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                        |    |    |                                                                                       |
| 110                                      |    |    |                                                                                       |
| 340                                      |   |   |   |
| 770                                      |  |  |                                                                                       |
| 1670                                     |  |  |  |

**Figure 44 :** Résultats du test d'agglutination développé avec des billes de 2  $\mu\text{m}$  recouvertes de G10/5/1, dont les sites non-spécifiques ont été saturés avec une solution de BSA 0,5 ou 1 %.



Contrairement à ce qui pouvait être supposé, il semble que les concentrations élevées en Acs adsorbés ne soient pas celles qui favorisent le plus l'immunoréactivité des complexes billes-G10/5/1. En effet, les plus gros agglutinats sont obtenus avec la concentration en G10/5/1 adsorbés de 340 µg/ml environ (Figure 43 e).

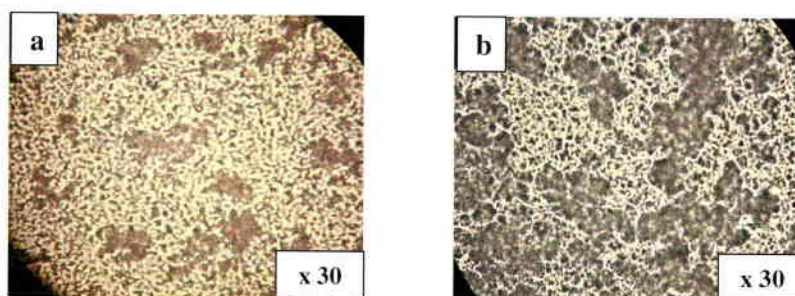
### ***Résultats des complexes de billes B-G10/5/1 saturées d'albumine***

Nous avons également examiné le rôle de la BSA sur le processus d'immunoagglutination. Pour cela, deux concentrations de BSA ont été utilisées pour saturer les sites non-spécifiques : 0,5 et 1 % (w/v).

L'immunoréactivité des complexes saturés avec les deux concentrations de BSA, donnent des résultats équivalents (Figure 44). Les agglutinations, observées seulement avec les plasmas de carpes traitées, montrent également la spécificité de l'interaction G10/5/1-VTG (Figure 44 d, f, g, i, k et l).

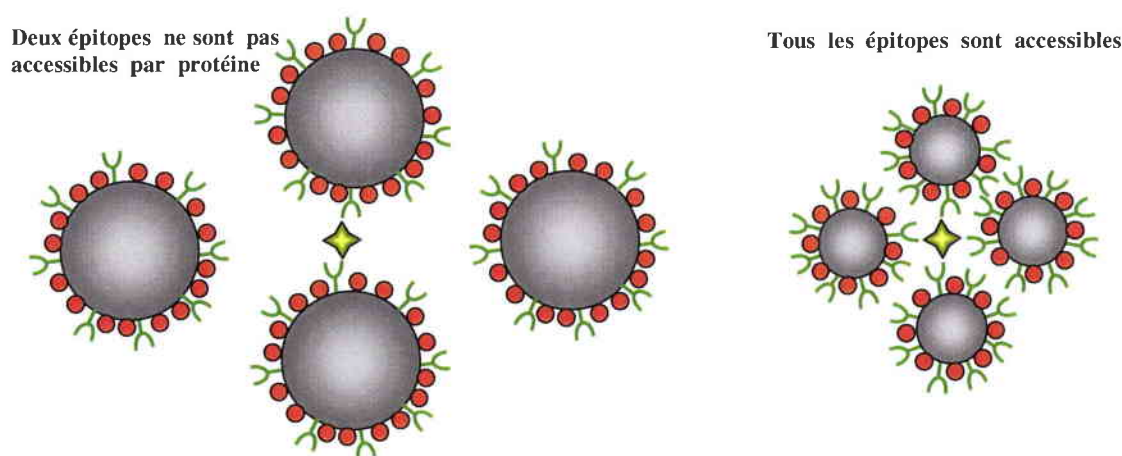
De plus, les agglutinats obtenues, dans ces conditions, sont beaucoup plus volumineux que ceux observés avec les complexes non saturés. La BSA, en stabilisant les complexes billes-G10/5/1 avant l'apport de VTG, favoriserait l'agglutination spécifique induite par la liaison G10/5/1-VTG.

Les plus gros agglutinats sont aussi, dans ce cas, obtenus avec la concentration en G10/5/1 adsorbés de 340 µg/ml environ (Figure 44 g) avec toutefois une légère différence entre les complexes de billes saturés avec les deux concentrations en BSA (0,5 % et 1 %) : les agglutinats des complexes saturés avec 1 % de BSA sont plus nombreux et plus volumineux (Figure 45).



**Figure 45 :** Résultats des tests d'agglutination réalisés avec les complexes de billes de 2 µm recouvertes de 340 µg/ml de G10/5/1 et saturés avec a : 0,5 % de BSA, ou b : 1 % de BSA.

Malgré ces résultats concluants, la taille des agglutinats et la vitesse d'agglutination doivent être encore améliorées. Pour cela, un deuxième type de billes a été testé, d'un diamètre inférieur, égale à 1  $\mu\text{m}$ , généralement employées pour détecter des Ags protéiques de petites tailles (diamètre de billes compris entre 0,8 et 1  $\mu\text{m}$ ) (Büscher *et al.*, 1999, Ramadass *et al.*, 1999, Attar *et al.*, 2001, Chandrakesan et Parija, 2003). En effet, si les billes occupent un volume trop important par rapport à la taille de la protéine (VTG), l'accès à un ou plusieurs épitopes de la VTG peut être bloqué. Le nombre de billes pouvant s'agglutiner autour d'une molécule de VTG est alors plus faible (Figure 46).



**Figure 46 :** Représentation schématique de l'encombrement stérique dû à la taille des billes de latex.

### ***III. C. - 2. Essai préliminaire avec des billes de 1 $\mu\text{m}$***

Un deuxième test d'agglutination a donc été mis au point avec, cette fois-ci, des billes de 1  $\mu\text{m}$ . L'utilisation de ces billes a impliqué un changement de tampon d'adsorption (Tampon Borate 0,1 M, pH 8,5). En effet, ces billes étant plus petite, les forces de Van der Waals générées par le matériel hydrophobe les composant sont aussi plus faible. Pour maintenir la stabilité des billes, la force ionique et le pH du tampon ont dû être diminués afin de diminuer la charge des particules et donc les forces électrostatiques générées par cette charge. L'équilibre responsable de la stabilité des billes, entre les forces attractives de Van der Waals et les forces répulsives électrostatiques est alors maintenu (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001).

### III. C. - 2. 1. Capacité des billes de 1 $\mu\text{m}$ à adsorber des Acms

La première étape pour développer un test d'agglutination avec de nouvelles billes consiste à vérifier si ces billes possèdent la capacité d'adsorber des Acms et si cette adsorption n'induit pas la perte de l'immunoréactivité des Acms. Un premier essai est réalisé avec trois concentrations initiales en G10/5/1 : 240, 479 et 958  $\mu\text{g/ml}$ .

Les résultats du dosage des Acms restant en solution après l'adsorption, montrent que ces billes possèdent la capacité d'adsorber des Acms de type IgG<sub>1</sub> comme les billes de 2  $\mu\text{m}$  (Figure 47).

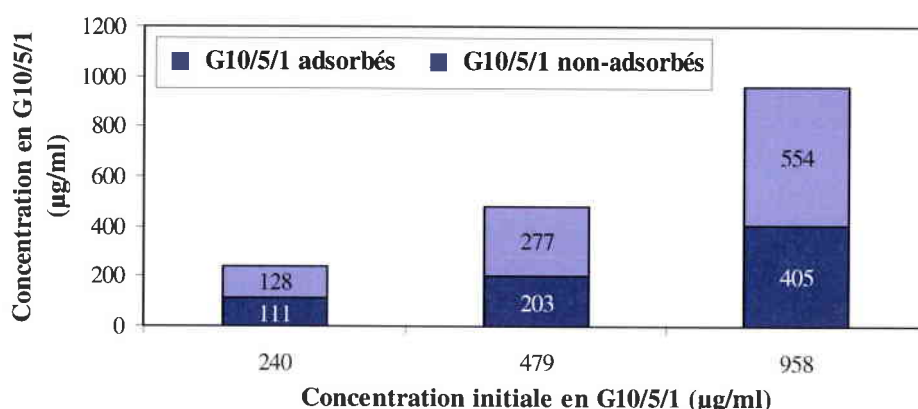


Figure 47 : Rapport entre les concentrations en G10/5/1 initialement apportés, non-adsorbés, et adsorbés sur les billes de 1  $\mu\text{m}$ .

#### *Isotherme d'adsorption*

A partir de ces résultats, un isotherme d'adsorption est tracé afin de déterminer si le point de saturation des billes de 1  $\mu\text{m}$  n'était pas atteint. Les résultats obtenus indiquent que ce n'est pas le cas, même à la concentration en G10/5/1 adsorbés de 405  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 48), les trois concentrations étudiées se situant plutôt dans la phase croissante du processus d'adsorption.

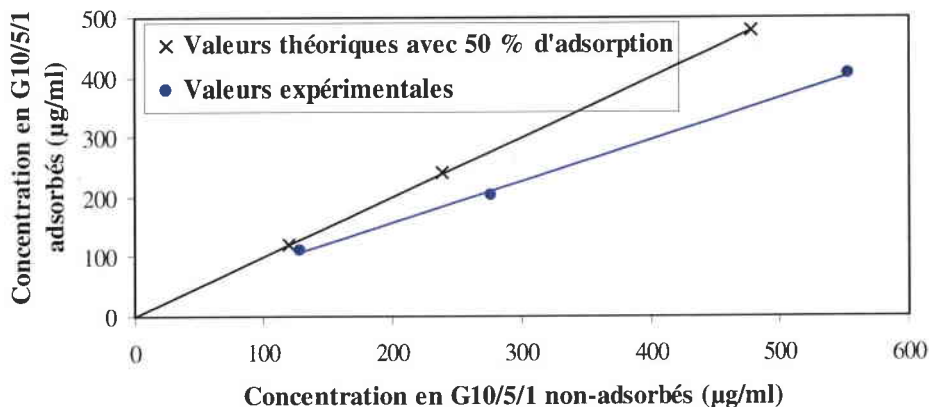


Figure 48 : Isotherme d'adsorption du G10/5/1 sur la surface des billes de latex de 1 µm.

Pour les trois concentrations en G10/5/1 testées, l'adsorption est inférieure à 50 %. Les conditions d'adsorption tels que le pH ou la force ionique sont donc à optimiser (Molina-Bolívar, 1999, Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001, Molina-Bolívar et Galisteo-González, 2003).

### *Isotherme de Freundlich*

L'isotherme de Freundlich des billes de 1 µm, indique que les Acms G10/5/1 s'adsorbent sur ces billes avec une affinité ( $k = 1,508$ ) supérieure aux billes de 2µm ( $k = 0,0155$ ) (Figure 49).

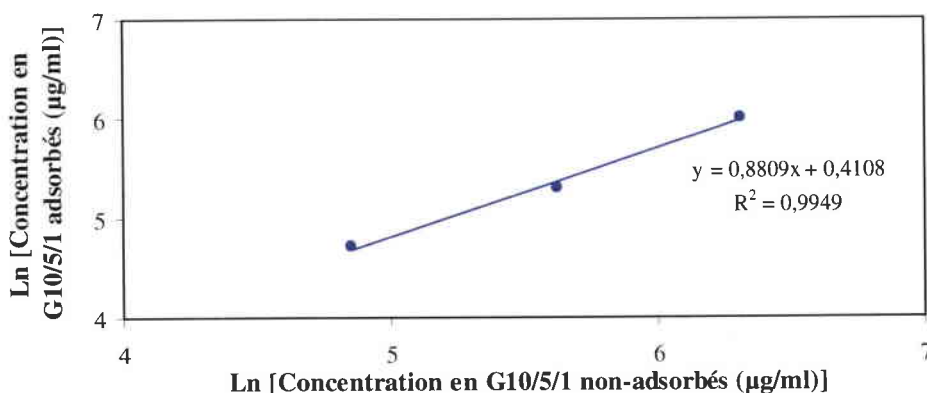


Figure 49 : Isotherme de Freundlich modélisant l'affinité des anticorps G10/5/1 pour la surface des billes de 1 µm.

En revanche, la capacité d'adsorption ( $1/n$ ) des billes de 1 µm, est égale à 0,8809 alors que la capacité d'adsorption des billes de 2 µm est environ une fois et demi supérieure à celle des billes de 1 µm ( $1/n_{2\mu m} = 1,510$ ), ce qui peut s'expliquer par le fait que la surface d'adsorption des billes d'1 µm est inférieure à celle des billes de 2 µm.

### III. C. - 2. 2. Immunoréactivité

L'immunoréactivité des complexes billes 1  $\mu\text{m}$ -G10/5/1 a été analysée pour vérifier l'activité des Acs après adsorption. En effet, l'adsorption peut rendre les Acs inactifs (Quesada *et al.*, 1997), soit parce que leur structure a été modifiée, soit parce qu'ils sont adsorbés dans le mauvais sens (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a, Dávalos-Pantoja *et al.*, 2001).

Pour cela, les complexes de billes recouvertes de G10/5/1 ont été testés avec différents échantillons plasmatiques provenant de carpes :

- un témoin agglutinations avec des billes non-recouvertes d'Acms,
- mâles non traités (témoin négatif),
- femelles non traitées en vitellogenèse,
- mâles et femelles traitées avec 10  $\mu\text{g/g}$  d'œstradiol.

Comme pour le test développé avec les billes de 2  $\mu\text{m}$ , celui développé avec les billes de 1  $\mu\text{m}$  détecte spécifiquement la présence de la VTG. En effet, aucune agglutination n'est obtenue avec les billes non recouvertes et les différents échantillons plasmatiques testés (Figure 50 a, b, c et d). De même, aucune agglutination ne se forme avec les billes recouvertes de G10/5/1 et le plasma de carpe mâle non-traitée (Figure 50 h, m et r). Les seules agglutinations observées sont obtenues avec :

- les plasmas de femelle en vitellogenèse : les agglutinats se forment en 1 min 20 s pour la concentration en Acms de 111  $\mu\text{g/ml}$  et en 58 s pour les deux autres concentrations de 205 et 403  $\mu\text{g/ml}$  (Figure 50 e, f, j, k, o et p).
- et les plasmas provenant de carpes traitées, mâles ou femelles (Figure 50 g, i et j).



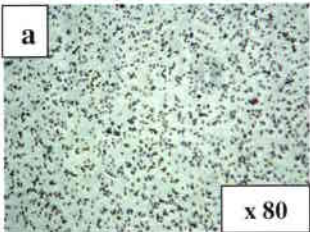
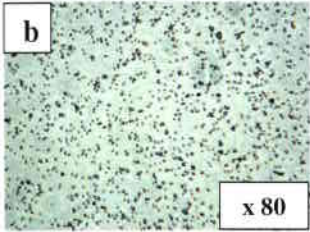
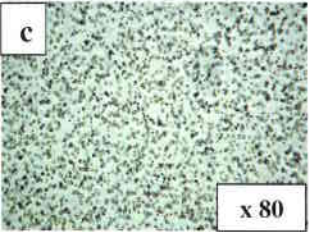
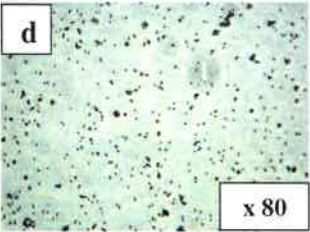
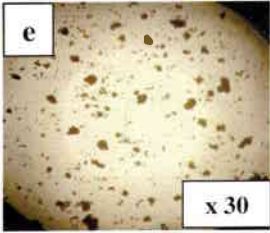
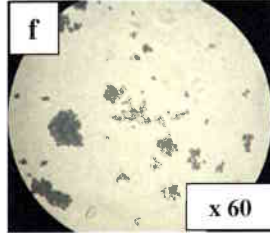
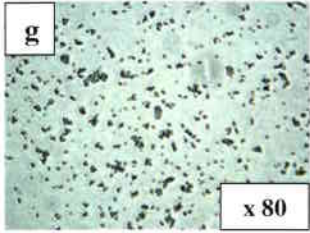
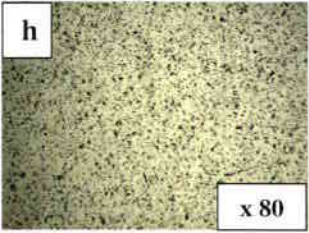
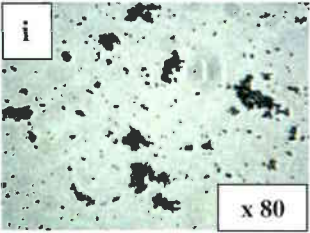
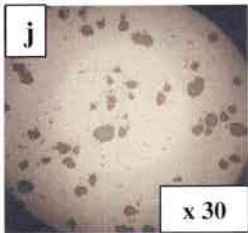
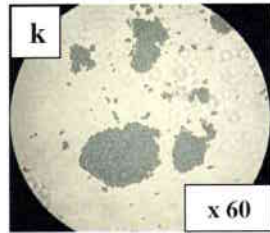
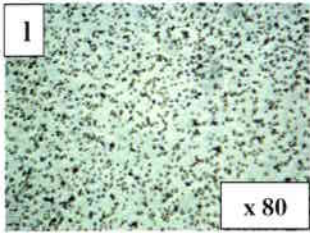
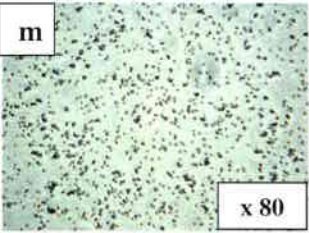
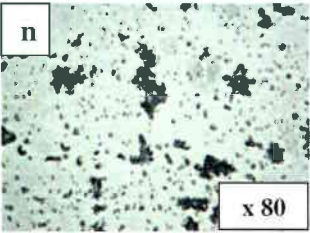
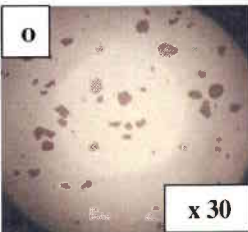
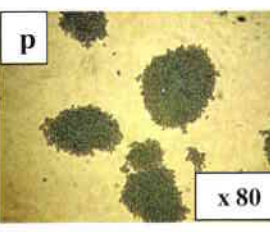
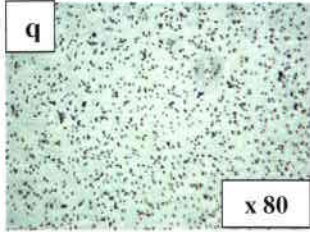
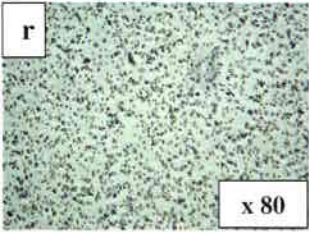
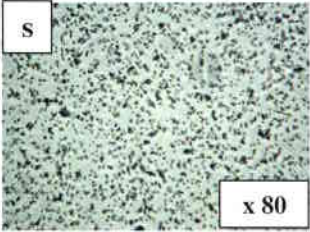
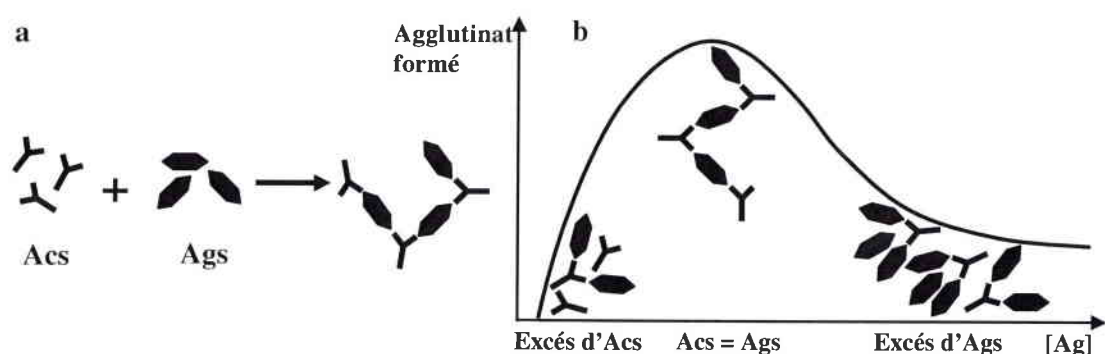
| G10/5/1 adsorbés<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) | Carpe femelle en vitellogénèse non-traitée                                         |                                                                                    | Carpe femelle traitée                                                                | Carpe mâle non-traitée                                                               | Carpe mâle traitée                                                                   |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                        |   |                                                                                    |   |   |   |
| 111                                      |   |   |   |   |   |
| 203                                      |   |   |   |   |   |
| 405                                      |  |  |  |  |  |

Figure 50 : Résultats des tests d'agglutination réalisés avec les billes  $1\ \mu\text{m}$  recouvertes de G10/5/1.

Par contre, avec les plasmas de carpes traitées, les billes d'1  $\mu\text{m}$  recouvertes de G10/5/1 s'agglutinent plus difficilement, ce qui peut être expliqué de deux façons :

- D'après la théorie de Heiderberger et Kendall, un excès d'antigènes (Ags) par rapport aux Acs, peut inhiber l'immunoagglutination, par la saturation des paratopes des Acs par les Ags (Figure 51). Théoriquement, ce problème peut être résolu en diluant la solution d'Ags ou en augmentant la concentration en Acs adsorbés sur les billes (Ortega-Vinuesa et Bastos-González, 2001). Cette dernière solution ne semble cependant pas avoir l'effet escompté (Figure 50 l, q et s).



**Figure 51 :** Processus d'immunoréaction entre un Ag polyvalent et son Ac : a, processus de l'immunoréaction ; b, représentation de Heiderberger-Kendall (Molina-Bolívar, 1999).

- Au pH physiologique, la VTG est hautement chargée négativement. Sa liaison avec les Acs aboutit à la formation d'une cape de charges négatives entourant les billes. Les forces électrostatiques, générées par ces charges, augmentent et empêchent de ce fait l'immunoagglutination (Figure 52). Théoriquement, plus la concentration en Acms adsorbés sur les billes est élevée, plus ce phénomène s'accroît. Cette explication semble mieux correspondre à nos résultats indiquant que la neutralisation de la protéine pourrait améliorer l'agglutination. Pour cela, il est nécessaire de déterminer son pHi, ce qui permettra de trouver le pH de la solution de suspension de billes permettant, qu'après mélange avec le plasma des poissons (pH=7,4), la solution obtenue présente un pH égal au pHi de la VTG.

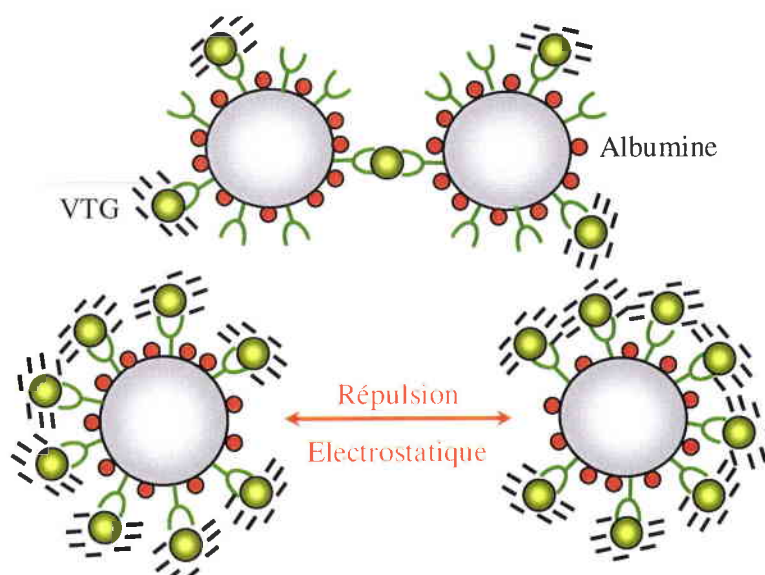


Figure 52: Effets de la saturation par la VTG, des billes de 1  $\mu\text{m}$  recouvertes par des Acs G10/5/1, sur les forces répulsives de type électrostatiques.

*Bien que provenant de tests non encore optimisés, ces premiers résultats indiquent que l'adsorption des Acms sur les billes de 1  $\mu\text{m}$  n'inhibe pas leur immunoréactivité. Les agglutinations obtenues sont spécifiques et se forment très rapidement (en moins de 5 min). De plus, les agglutinats obtenus avec les plasmas de femelles en vitellogenèse sont visibles à l'œil nu. Par contre, l'immunoagglutination est entravée par la saturation électrostatique dû à une concentration en VTG trop élevée des plasmas de carpes traitées.*

### III. C. - 3. Optimisation du test avec les billes de 1 $\mu\text{m}$

Les trois Acms anti-VTG sélectionnés, le G10/5/1, le F4/8/1 et le F4/9/1, sont utilisés afin d'optimiser les protocoles d'adsorption des Acs et d'immunoréactivité. Leur capacité d'adsorption et d'immunoréaction seront alors comparés et l'Ac le plus actif sera sélectionné.

Un mélange des trois Acms (à concentration égale) est, également, étudié pour vérifier si l'utilisation de plusieurs Acms favorise l'immunoagglutination, comme l'ont indiqué Ortega-Vinuesa *et al.* (1998). En effet, si chaque type d'Acm reconnaît un épitope différent de l'Ag, l'utilisation de plusieurs Acms pourrait augmenter le nombre de point d'ancrage sur l'Ag (Ortega-Vinuesa *et al.*, 1998).

### III. C. - 3. 1. Optimisation du protocole d'adsorption des anticorps monoclonaux

#### *pH optimal d'adsorption*

Le pH étant la variable qui influe le plus sur l'adsorption des Acs, différents pHs (de 5,2 à 8,2) ont été testés. Les limites de 5,2 et de 8,2 ont été choisies selon les instructions du fabricant afin de respecter l'intégrité des billes (Polysciences, USA).

Un tampon phosphate 0,1 M a été choisi pour l'adsorption afin d'obtenir les différents pHs tout en maintenant la stabilité des billes de 1  $\mu$ m.

Les résultats du G10/5/1 montrent que le maximum d'adsorption est obtenu pour un pH proche de son pHi, soit 6,2 (Galisteo *et al.*, 1994).

Concernant les Acms F4/8/1 et F4/9/1, les maximums d'adsorption observés sont obtenus pour la plus faible valeur de pH testée, soit 5,2 (Figure 53).

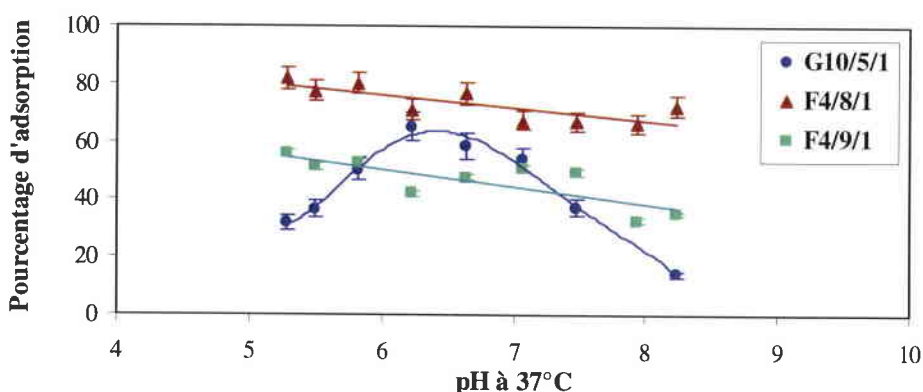


Figure 53 : Effet de la variation du pH sur l'équilibre d'adsorption des trois Acms G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 (concentration en Acms : 500  $\mu$ g/ml ; température 37°C).

Des valeurs de pH égales à 5,2 pour les Acms F4/8/1 et F4/9/1, à 6,2 pour le G10/5/1, et de 5,7 pour le mélange des trois Acms, ont donc été choisies pour tester l'effet de la variation de la concentration en Acms initialement apportés sur le processus d'adsorption.



*Concentrations initiales en Acms étudiés*

La valeur des concentrations en Acms adsorbés et non-adsorbés diffère selon la concentration en Acms initialement apportés, augmentant légèrement avec la concentration initiale en Acms (Figures 54, 55, 56 et 57).

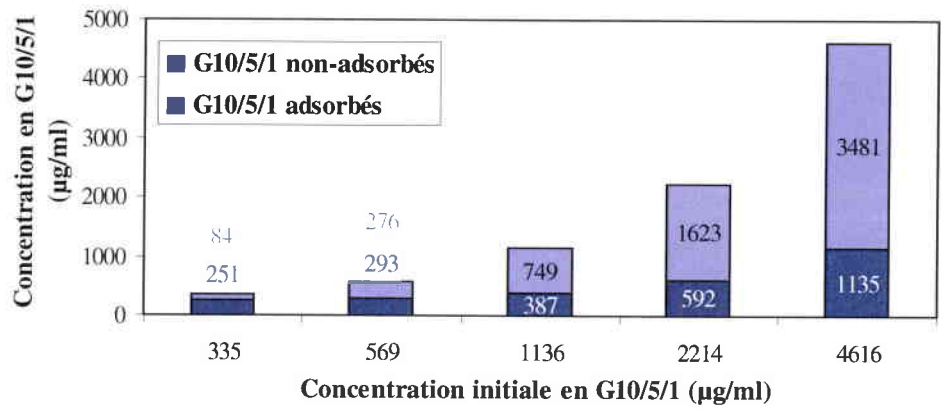


Figure 54 : Effet de la concentration initiale en G10/5/1 sur les concentrations en Acms adsorbés et non-adsorbés (température: 37°C; pH=6,2).

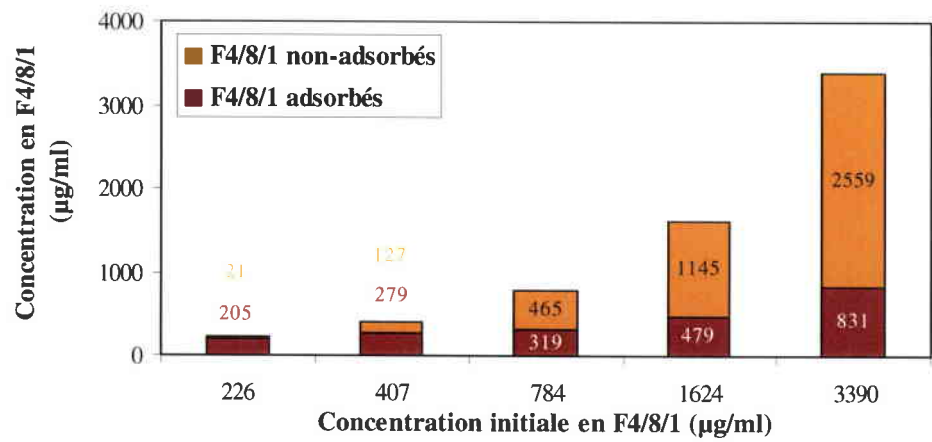


Figure 55 : Effet de la concentration initiale en F4/8/1 sur les concentrations en Acms adsorbés et non-adsorbés (température: 37°C; pH=5,2).

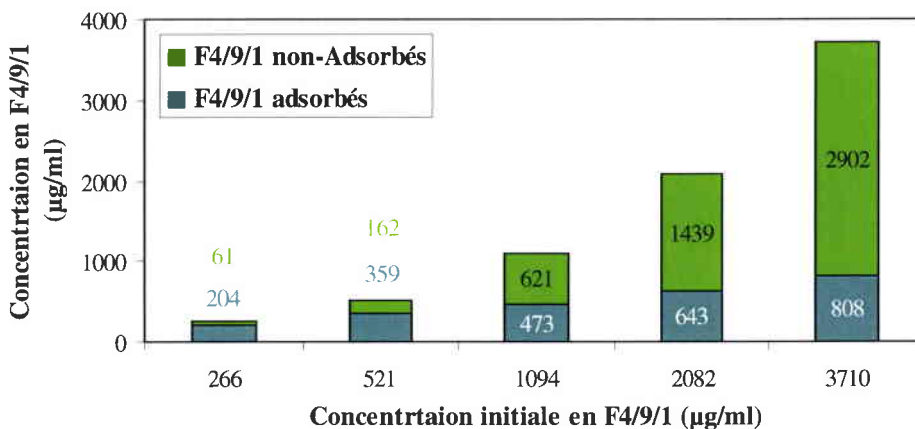


Figure 56 : Effet de la concentration initiale en F4/9/1 sur les concentrations en Acms adsorbés et non-adsorbés (température: 37°C; pH=5,2).

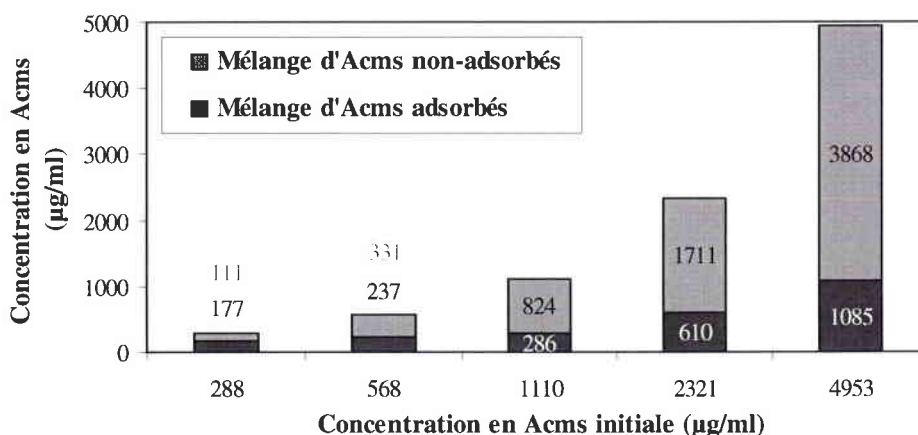


Figure 57 : Effet de la concentration initiale en Acms sur les concentrations en Acms adsorbés et non-adsorbés (température: 37°C; pH=5,7).

Ce nouveau protocole permet d’améliorer l’adsorption avec des pourcentages d’adsorption supérieurs à 50 % mesurés pour les concentrations initiales en Acms suivantes :

- < 1136 µg/ml, pour le G10/5/1 (Figure 54),
- < 784 µg/ml, pour le F4/8/1 (Figure 55),
- < 1094 µg/ml, pour le F4/9/1 (Figure 56),
- < 568 µg/ml, pour le mélange (Figure 57).

### *Isothermes d'adsorption*

Les isothermes d'adsorption des trois Acms, le G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 et du mélange décrivant l'équilibre entre les concentrations en Acms adsorbés et non-adsorbés sont représentés dans la figure 58. Deux profils d'adsorption différents sont observés : un pour le F4/9/1 et un autre pour les Acms G10/5/1 et F4/8/1 ainsi que le mélange (Figure 57).

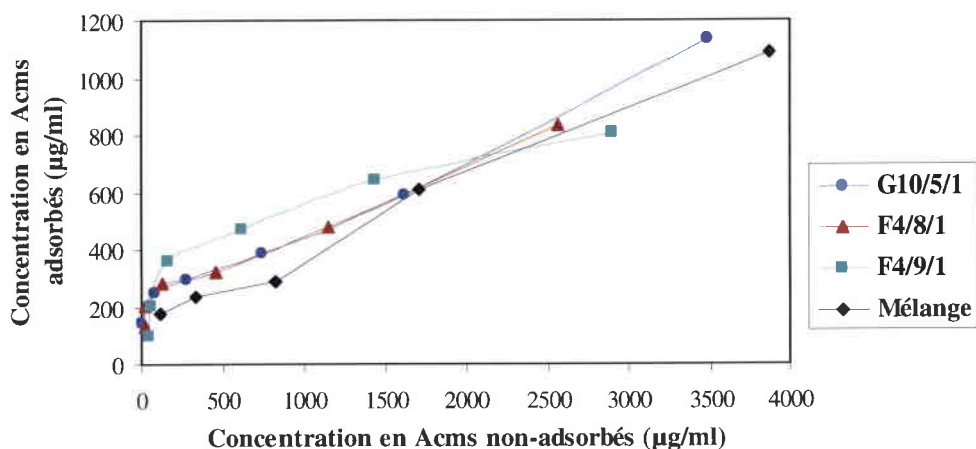


Figure 58 : Isothermes d'adsorption des Acms, G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 sur les billes de 1 µm.

Dans le cas du F4/9/1, l'adsorption augmente d'abord très fortement, puis la courbe s'infléchit et tend vers une asymptote qui pourrait correspondre à la saturation des billes de latex de 1 µm (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a).

Les Acms G10/5/1, F4/8/1 et le mélange présentent également une première phase de d'adsorption très élevée. Puis, contrairement au F4/9/1, dans la deuxième phase, l'adsorption continue à augmenter, de manière constante, mais plus faiblement. D'après Molina-Bolívar *et al.* (1998), certains Acs posséderaient la capacité de modifier leur conformation ou leur orientation afin d'optimiser l'interaction avec la surface des billes (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a), ce qui pourrait expliquer que l'adsorption de ces Acs ne tende pas vers un plateau.

### *Isothermes de Freundlich*

Les adsorptions de chaque Acm et du mélange sont analysées à l'aide de l'isotherme de Freundlich, afin de vérifier l'affinité d'adsorption des Acms G10/5/1, F4/8/1 et du mélange.

Les résultats des isothermes de Freundlich confirment les différences trouvées avec les isothermes d'adsorption (Figures 59, 60 et 61).

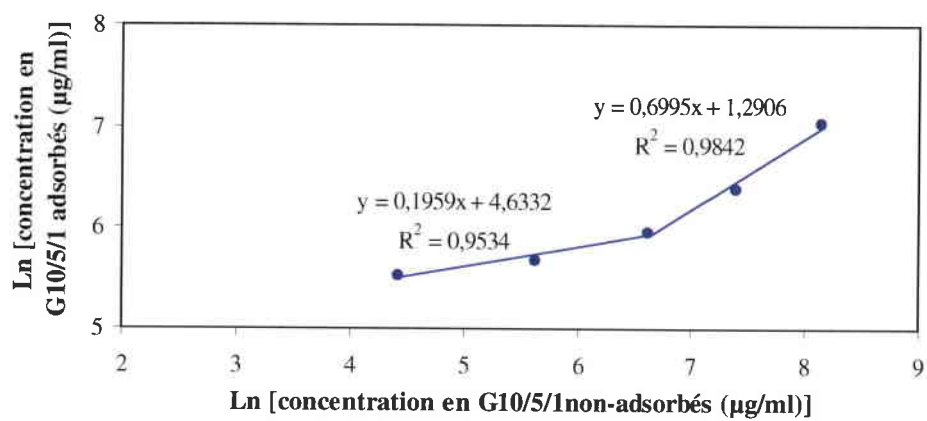


Figure 59 : Isotherme de Freundlich décrivant l'adsorption de l'Acm G10/5/1 sur les billes de 1 µm.

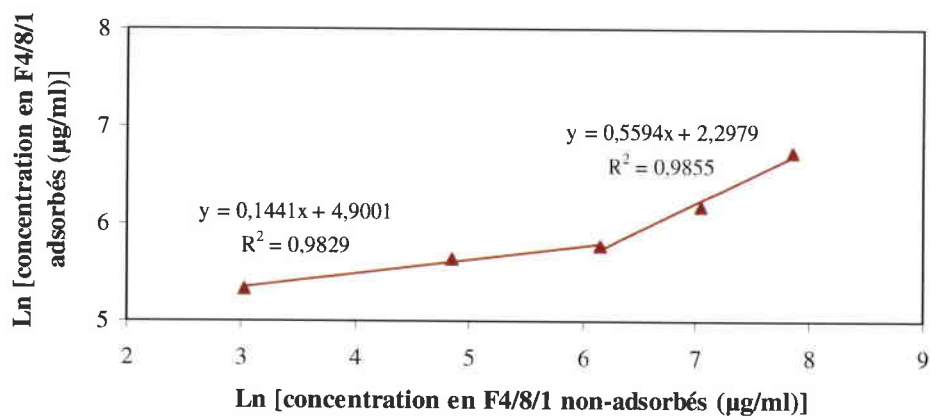


Figure 60 : Isotherme de Freundlich décrivant l'adsorption de l'Acm F4/8/1 sur les billes de 1 µm.

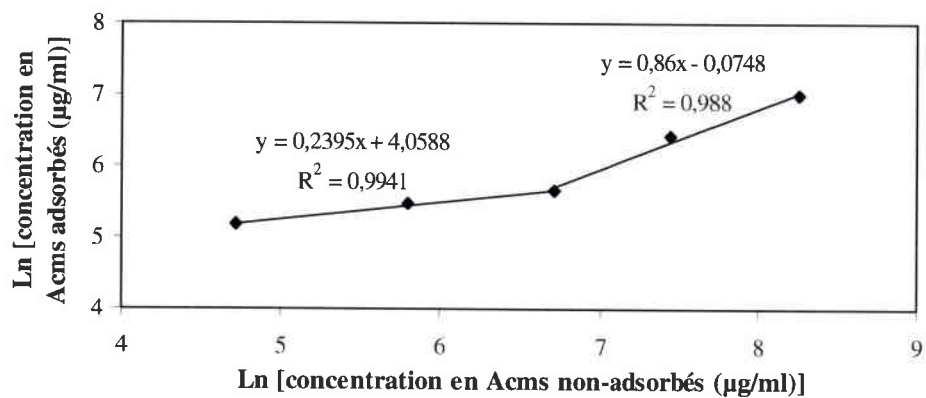


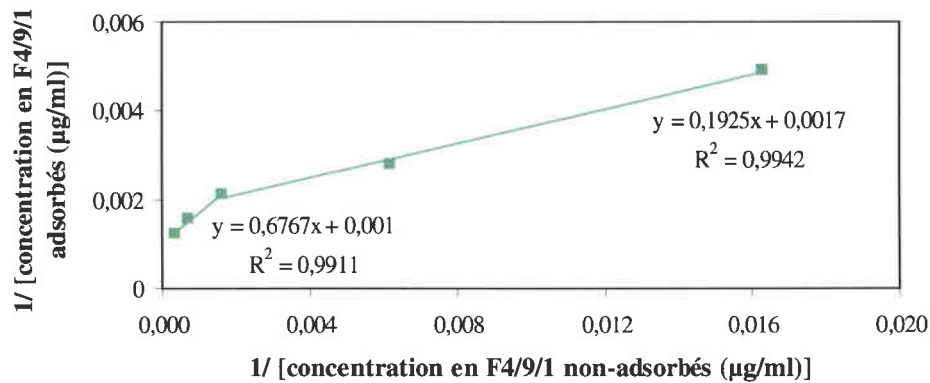
Figure 61 : Isotherme de Freundlich décrivant l'adsorption du mélange des trois Acms sur les billes de 1 µm.



En effet, pour le G10/5/1, le F4/8/1 et le mélange des trois Acms, les trois isothermes de Freundlich présentent un profil similaire: biphasique avec deux pentes positives (Figures 59, 60 et 61). Chacune de ces deux phases devrait correspondre à une affinité différente des Acms pour les billes ou à une différence de conformation ou d'orientation adoptée par les Acms (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a).

***Isotherme de Langmuir***

Dans le cas de F4/9/1, un isotherme de Langmuir est réalisé car son isotherme d'adsorption présente un plateau de saturation. Dans ce cas, une droite biphasique peut être mise en évidence montrant que, malgré la faible affinité de la deuxième phase, cet Ac se fixe sur des billes avec deux affinités différentes (Figure 62).



**Figure 62 :** Isotherme de Langmuir décrivant l'adsorption de l'Acm F4/9/1 sur les billes de 1 µm.

***Modèle de Scatchard***

Ce modèle a souvent été utilisé en physico-chimie pour la compréhension de l'accumulation des molécules (Falla, 1990). Dans notre étude, nous nous efforçons de comprendre la fixation d'une macromolécule (Acs) sur une particule (bille de latex). Ce phénomène subit l'influence non seulement des aspects liés à la physique d'adsorption des macromolécules sur des particules (forces de Van der Waals, forces électrostatiques, encombrement stérique) mais aussi à la conformation des Acs qui peut changer au cours de l'adsorption (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a).

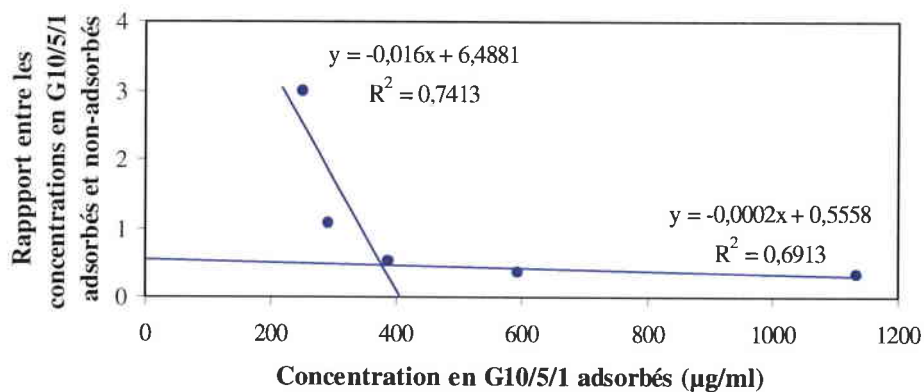


Figure 63 : Modélisation de Scatchard de l’adsorption de l’Acm G10/5/1 sur les billes de 1 µm.

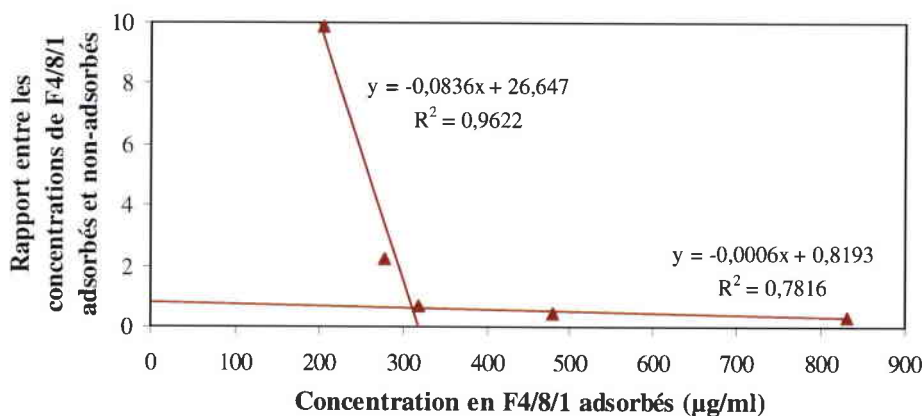


Figure 64 : Modélisation de Scatchard de l’adsorption de l’Acm F4/8/1 sur les billes de 1 µm.

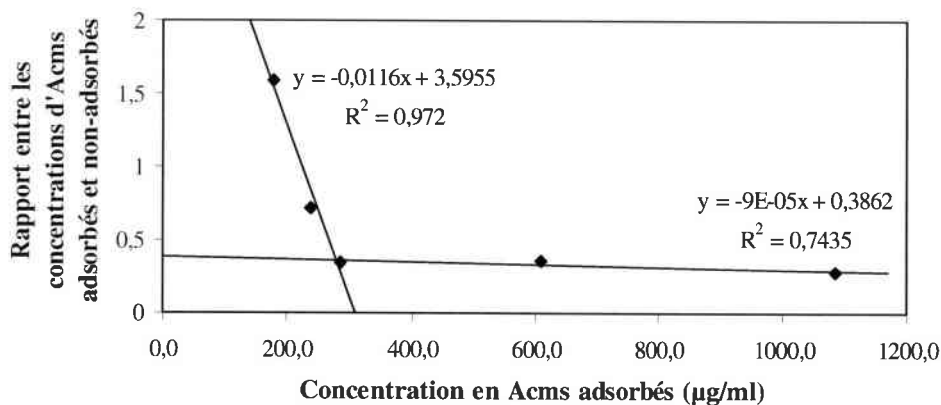


Figure 65 : Modélisation de Scatchard de l’adsorption du mélange des trois Acms sur les billes de 1 µm.

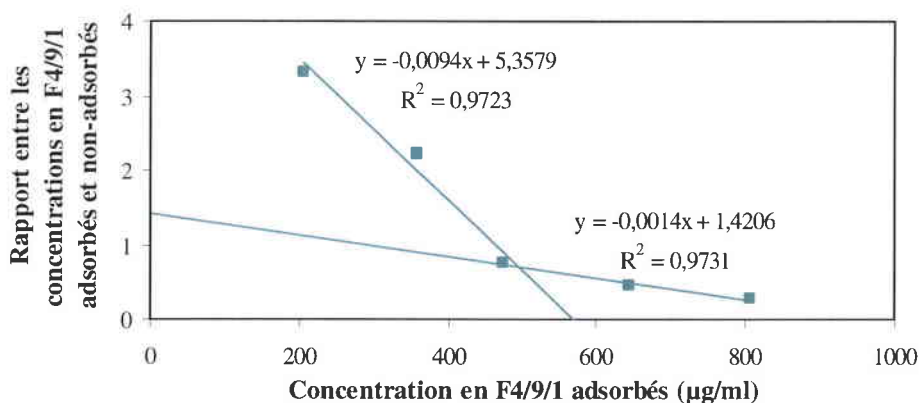


Figure 66 : Modélisation de Scatchard de l’adsorption de l’Acm F4/9/1 sur les billes de 1 µm.

Le modèle de Scatchard montre que chaque Acs s’adsorbe sur les billes avec deux conformations différentes, même le F4/9/1 (Figures 63, 64, 65 et 66).

D’après les valeurs des constantes d’association, la capacité d’association de chaque conformation d’Ac avec les billes peut être classé de la manière suivante :

- conformation d’origine : F4/9/1 > mélange > G10/5/1 > F4/8/1,
- deuxième conformation : mélange > G10/5/1 > F4/8/1 > F4/9/1.

Ce résultat montre que le F4/9/1 possède une affinité beaucoup plus faible pour les billes de 1 µm, sous sa deuxième conformation (Tableau 29).

Tableau 29 : Valeurs des constantes d’association des Acms G10/5/1, F4/8/1 et F4/9/1 et du mélange.

| Acms    | Modèle de Scatchard |         |
|---------|---------------------|---------|
|         | $k'_a$              | $k'_b$  |
| G10/5/1 | 0,0160              | 0,0002  |
| F4/8/1  | 0,0835              | 0,0006  |
| F4/9/1  | 0,0094              | 0,0014  |
| Mélange | 0,0116              | 0,00005 |

De plus, les profils concaves des courbes de Scatchard des trois Acms et du mélange, montrent que leurs adsorptions présentent une coopération négative. C'est-à-dire que l’adsorption d’une nouvelle molécule d’immunoglobuline sur les billes de latex est entravée par la présence des molécules déjà adsorbées (Falla et Block, 1993).

### ***III. C. - 3. 2. Immunoréactivité***

#### ***III. C. - 3. 2. 1. Résolution du problème d'inhibition de l'immunoagglutination***

Avant de tester l'immunoréactivité des différents complexes billes-Acms obtenus, il était nécessaire de résoudre le problème d'inhibition de l'immunoagglutination résultant de la concentration trop élevée en VTG dans les échantillons plasmatiques de carpes traitées, qu'elles soient mâles ou femelles. Pour cela, plusieurs tampons utilisés pour suspendre les billes ont été préparés avec des forces ioniques et des pHs différents afin de neutraliser les charges de la VTG de carpe :

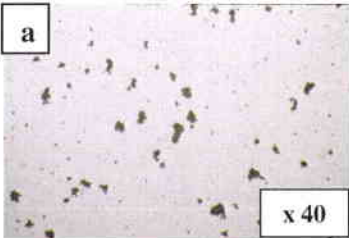
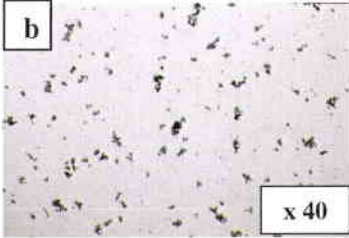
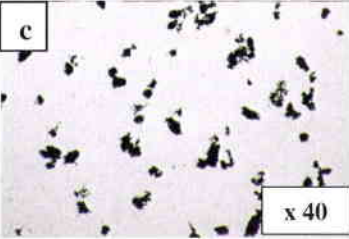
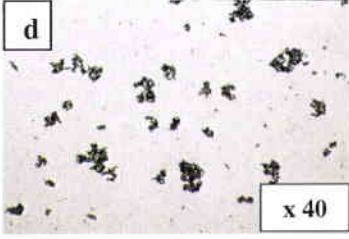
- Tampon phosphate 0,1 M, pH=5 ;
- Tampon phosphate 0,1 M, pH=6 ;
- Tampon PBS, pH=5 ;
- Tampon PBS, pH=6 ;
- Tampon PBS + BSA 1 %, pH=6.

Ces essais ont été réalisés avec les complexes de billes recouvertes par 293 µg/ml de G10/5/1.

Les tampons phosphates (pH=5 et 6) et le tampon PBS de pH=5, donnent des résultats équivalents : de très petits agglutinats régulièrement disposés dans le mélange (Figure 67 a, b). Le problème d'inhibition de l'immunoagglutination n'est donc toujours pas résolu par l'emploi de ces tampons.

Par contre, avec les tampons PBS de pH=6 enrichis ou non en BSA, les agglutinats obtenus avec les plasmas de carpes femelles en vitellogenèse et de carpes traitées, mâles ou femelles, sont beaucoup plus volumineux : ces deux tampons neutralisent les charges de la VTG. En fait, le pH du mélange entre le tampon de suspension des billes (pH=6) et l'échantillon plasmatique (pH=7,4), se rapproche du pHi du dimère de la VTG de carpe que nous avons purifié (pHi=6,96).

De plus, la formation des agglutinations avec les billes-Acms suspendues dans le tampon PBS + BSA (pH=6), est beaucoup plus rapide que celle obtenue avec les billes-Acms suspendues dans le tampon PBS sans BSA (pH=6) : 25 secondes au lieu de 2 min 19 s.

| Tampons         | Carpe femelle en vitellogenèse non-traitée                                        | Carpe traitée                                                                      |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Phosphate, pH 5 |  |  |
| Phosphate, pH 6 |                                                                                   |                                                                                    |
| PBS, pH 5       |                                                                                   |                                                                                    |
| PBS, pH 6       |  |  |
| PBS + BSA, pH 6 |                                                                                   |                                                                                    |

**Figure 67 :** Résultats des tests d’agglutination obtenus avec les complexes de billes recouvertes de 405 µg/ml de G10/5/1 suspendus dans différents tampons, pour résoudre le problème d’inhibition du phénomène d’immunoagglutination quand la VTG est trop concentrée.

Le tampon de suspension des billes retenu, pour la suite de l’étude, est un tampon PBS, pH=6, contenant 1 % de BSA.

### III. C. - 3. 2. 2. Résultats des tests d’agglutination

#### Spécificité des résultats d’agglutination

L’immunoréactivité des trois types de complexes de billes recouvertes de G10/5/1, F4/8/1 ou F4/9/1 a été testée avec des échantillons plasmatiques provenant :

- de carpes (mâles et femelles) traitées avec de l’œstradiol,
- et carpes non-traitées : mâles (témoins négatifs) ou femelles en vitellogenèse (témoins positifs).

Aucune agglutination n’a été observée avec les complexes de billes recouvertes mises en présence de plasma de carpes mâles non-traitées (Figure 68 a<sub>1</sub> et a<sub>2</sub>). Par contre, les échantillons plasmatiques, provenant de femelles en vitellogenèse et des carpes traitées avec de l’œstradiol, induisent l’agglutination des billes recouvertes avec les trois différents Acms (Figure 68 b, c, d, e et f).

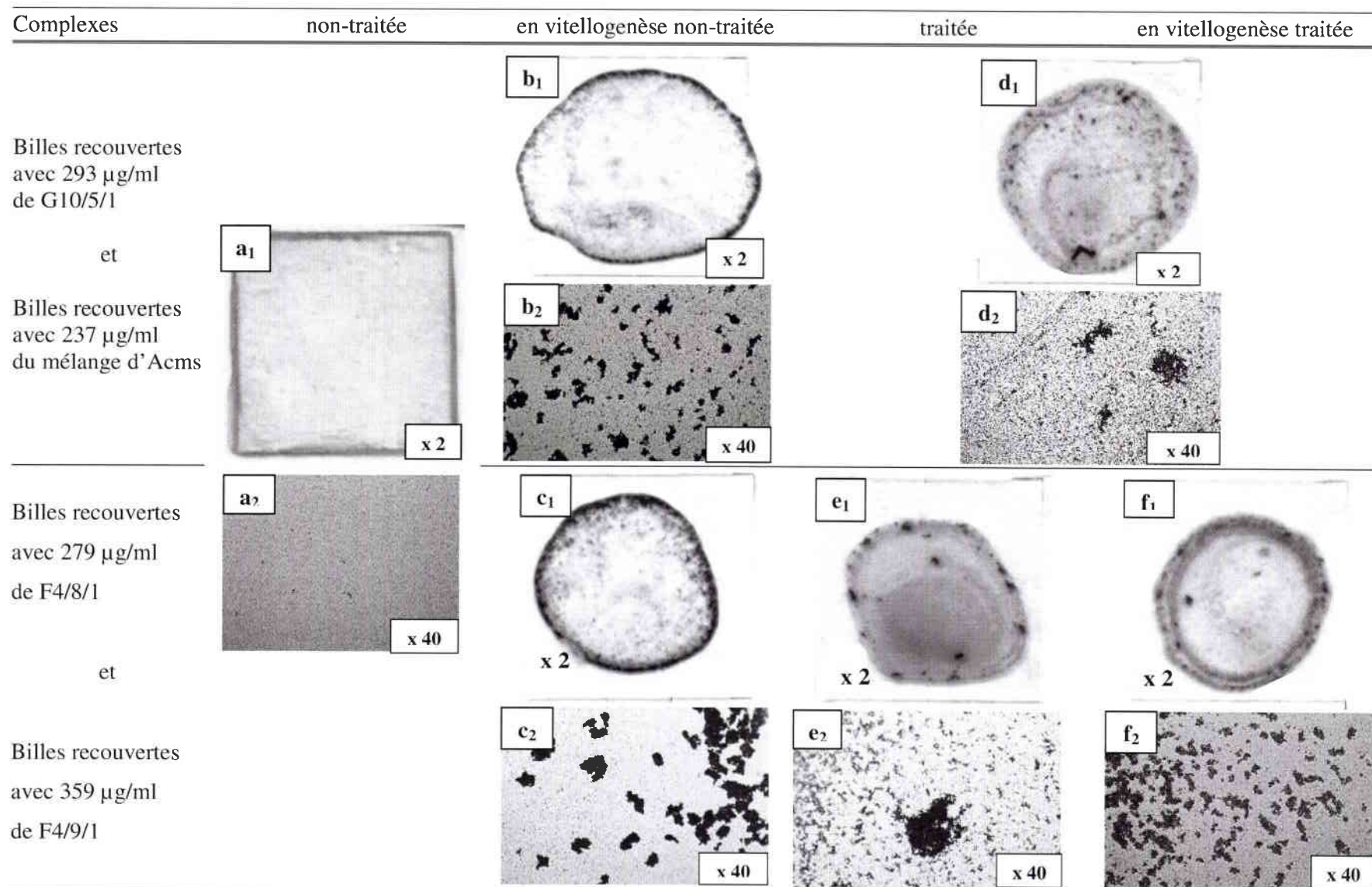


Figure 68 : Résultats des tests d'agglutination obtenus avec les trois différents complexes de  $1\mu\text{m}$  : billes-G10/5/1, b-F4/8/1, b-F4/9/1 et b-mélange.



Par conséquent, les agglutinations observées sont la conséquence de l'interaction spécifique entre la VTG présente dans les échantillons plasmatiques des carpes et les Acms adsorbés sur les billes de 1  $\mu\text{m}$  : le test d'agglutination développé peut être utilisé pour diagnostiquer la contamination des carpes par les CEMs.

### Description des différents profils

Selon l'origine du plasma et le complexe de billes-Acms impliqué, trois types de profils d'agglutination se forment. Ces différents profils se caractérisent par le ou les types d'agglutinats qui les composent. Trois types d'agglutinats sont observables :

- des agglutinats ronds, de taille moyenne, facilement visible à l'œil nu (Figure 68 b<sub>2</sub>, c<sub>2</sub> et f<sub>2</sub>) qui forment un halo autour du mélange (Figure 68 b<sub>1</sub> et c<sub>1</sub>),
- de grands agglutinats, moins nombreux, répartis sur toute la surface du mélange, visibles très facilement à l'œil nu (Figure 68 e<sub>2</sub>),
- des petits agglutinats d'une forme diffuse, moins nets, très nombreux, également répartis sur toute la surface du mélange (Figure 68 d<sub>2</sub> et e<sub>2</sub>).

Les agglutinats ronds se forment avec des échantillons plasmatiques provenant de carpe femelle en vitellogenèse (Tableau 30 : Profil 1). Les deux autres types d'agglutinats, grands et diffus, apparaissent dans les tests réalisés avec des animaux traités avec de l'œstradiol, mâle ou femelle (Tableau 30 : Profil 2). Les trois agglutinats apparaissent ensemble, uniquement, avec les complexes de billes B-F4/8/1 et F4/9/1, et le plasma d'une carpe femelle, à la fois, traitée et en vitellogenèse (Tableau 30 : Profil 3).

**Tableau 30 :** Description des différents types de profils d'agglutination obtenus avec les trois complexes billes-Acms et les différents échantillons plasmatiques de carpes.

| Plasmas        | Carpe femelle en vitellogenèse |       |        |          |       |        | Carpe mâle traité |       |        |
|----------------|--------------------------------|-------|--------|----------|-------|--------|-------------------|-------|--------|
|                | non-traitée                    |       |        | traitée  |       |        |                   |       |        |
| Agglutinats    | Rond                           | Grand | Diffus | Rond     | Grand | Diffus | Rond              | Grand | Diffus |
| Complexes      |                                |       |        |          |       |        |                   |       |        |
| Mélange-bille  | +                              | -     | -      | -        | +     | +      | -                 | +     | +      |
| G10/5/1-billes | +                              | -     | -      | -        | +     | +      | -                 | +     | +      |
| F4/8/1-billes  | ++                             | -     | -      | +        | ++    | ++     | -                 | ++    | ++     |
| F4/9/1-billes  | ++                             | -     | -      | +        | ++    | ++     | -                 | ++    | ++     |
|                | Profil 1                       |       |        | Profil 3 |       |        | Profil 2          |       |        |

L’obtention de ces trois types de profils d’agglutination différents confirme l’observation rapportée par Solé *et al.* (2000), Hennies *et al.* (2003) et Fukada *et al.* (2003) qui rapportent l’existence de deux monomères de VTG chez la carpe *Cyprinus carpio* : un monomère majoritaire de 150-156 kDa environ et un autre moins concentré et plus fragile de 180-190 kDa (Solé *et al.*, 2000, Fukada *et al.*, 2003, Hennies *et al.*, 2003). De plus, les résultats de nos agglutinations montrent que le ratio entre les deux molécules de VTGs de carpe (VTG<sub>1</sub> et VTG<sub>2</sub>) est différent, entre les carpes femelles en vitellogénèse et les carpes traitées, mâles ou femelles (Tableau 31).

Tableau 31 : Proportion de VTG<sub>1</sub> / VTG<sub>2</sub> dans les échantillons plasmatiques provenant de carpe femelle en vitellogénèse et de carpes traitées, mâles ou femelles en vitellogénèse.

| VTGs \ Plasmas   | Carpe femelle en vitellogénèse |         | Carpe mâle traitée |
|------------------|--------------------------------|---------|--------------------|
|                  | non-traitée                    | traitée |                    |
| VTG <sub>1</sub> | ++++                           | ++      | n.d.               |
| VTG <sub>2</sub> | n.d.                           | ++++    | ++++               |

n.d. : non détectée

Finalement, ces résultats montrent que les deux monomères de VTG de carpes ne sont pas produits dans les mêmes conditions. Ils pourraient posséder un rôle différent comme c’est le cas des deux molécules de VTG présentes chez les carpes Indian major (*Cirrhinus mrigala*) : la VTG nommée HA-I est ainsi capable d’activer, à la fois, sa synthèse et son incorporation, alors que la vitellogénine HA-II possède uniquement la capacité de stimuler sa synthèse. (Nath et Maitra, 2001).

***Effet de la concentration en Acms adsorbés sur les profils et les temps d’agglutination***

En premier lieu, la variation de la concentration en Acms adsorbés sur les billes agit sur les profils d’agglutination. Ainsi, aux concentrations en F4/8/1 et F4/9/1 adsorbés sur les billes (479 ou 831 µg/ml et 643 ou 803 µg/ml, respectivement), les agglutinats du type rond n’apparaissent plus (Tableau 32, chiffre en italique). Ces concentrations sont celles où une partie des Acms ont changé de conformation ou d’orientation lors de l’adsorption (Molina-Bolívar *et al.*, 1998a). Ce changement de structure induirait une perte de l’immunoréactivité de ces Acs.



Tableau 32 : Effets de la concentration en Acms adsorbés sur les billes de 1 µm sur les temps d’agglutination.

| Complexes                                       | Acms adsorbés<br>en µg/ml | Carpe femelle en vitellogenèse<br>non-traitée | Carpe femelle en vitellogenèse<br>traitée | Carpe mâle traitée   |
|-------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------|
| Billes-G10/5/1                                  | 251                       | 30 s                                          | 1 min / n.o.                              | 2 min / n.o.         |
|                                                 | <b>293</b>                | <b>25 s</b>                                   | <b>50 s / n.o.</b>                        | <b>1 min / n.o.</b>  |
|                                                 | <b>387</b>                | <b>45 s</b>                                   | <b>50 s / n.o.</b>                        | <b>50 s / n.o.</b>   |
|                                                 | 592                       | 40 s                                          | 1 min 30 / n.o.                           | 40 s / n.o.          |
|                                                 | 1135                      | 1 min 20 s                                    | 1 min 30 / n.o.                           | 50 s / n.o.          |
| Billes-F4/8/1                                   | 205                       | 14 s                                          | 1 min / idem                              | 1 min / n.o.         |
|                                                 | <b>279</b>                | <b>15 s</b>                                   | <b>30 s / 1 min</b>                       | <b>1 min / 3 min</b> |
|                                                 | <b>319</b>                | <b>15 s</b>                                   | <b>30 s / 2 min 40 s</b>                  | <b>40 s / 2 min</b>  |
|                                                 | 479                       | 15 s                                          | 50 s / n.o.                               | 30 s / 4 min         |
|                                                 | 831                       | 30 s                                          | 50 s / n.o.                               | 30 s / 3 min         |
| Billes-F4/9/1                                   | 204                       | 14 s                                          | 2 min 30s / idem                          | 2 min / n.o.         |
|                                                 | <b>359</b>                | <b>20 s</b>                                   | <b>1 min / idem</b>                       | <b>1 min / 2 min</b> |
|                                                 | <b>473</b>                | <b>20 s</b>                                   | <b>30 s / 2 min</b>                       | <b>30 s / 2 min</b>  |
|                                                 | 643                       | 17 s                                          | 50 s / n.o.                               | 30 s / 4 min         |
|                                                 | 808                       | 40 s                                          | 50 s / n.o.                               | 40 s / 3 min         |
| Billes-Mélange                                  | 177                       | 40 s                                          | 1 min 20 / n.o.                           | 2 min / n.o.         |
|                                                 | <b>237</b>                | <b>35 s</b>                                   | <b>1 min / n.o.</b>                       | <b>1 min / n.o.</b>  |
|                                                 | <b>286</b>                | <b>40 s</b>                                   | <b>1 min 30 / n.o.</b>                    | <b>50 s / n.o.</b>   |
|                                                 | 2321                      | 50 s                                          | 1 min 30 / n.o.                           | 50 s / n.o.          |
|                                                 | 4953                      | 2 min                                         | 1 min 30 / n.o.                           | 1 min/idem           |
| s : seconde ; min : minute ; n.o. : non-observé |                           | Agglutinat Rond                               | Agglutinats Grand / Rond                  |                      |

D’autre part, la variation de la concentration en Acms adsorbés sur les billes agit sur le temps d’apparition des agglutinats (Tableau 32). Il existe un intervalle de concentrations d’Acms adsorbés sur les billes pour lesquelles le temps d’agglutination est optimal :

- pour le complexe B-G10/5/1 : entre 293 et 387 µg/ml,
- pour le complexe billes-F4/8/1 : entre 279 et 319 µg/ml,
- pour le complexe billes-F4/9/1 : entre 359 et 473 µg/ml,
- pour le complexe billes-mélange : entre 237 et 473 µg/ml.

En dessous de cette concentration, la quantité d’Acs n’est pas suffisante pour favoriser l’immunoagglutination et au dessus, l’encombrement stérique dû à la quantité élevée d’Acms sur la surface des billes ralentit le phénomène d’immunoagglutination (Molina-Bolívar, 1999).

### *Le complexe billes-mélanges*

Les résultats d'immunoagglutination obtenus avec les complexes billes-mélanges sont équivalents à ceux obtenus avec les complexes billes-G10/5/1 : G10/5/1 est l'Acs qui s'est majoritairement adsorbé sur les billes. Quand plusieurs Acms sont mis en contact avec des billes, ils entrent en compétition pour s'adsorber sur les billes. G10/5/1 est donc l'Acs le plus compétitif.

### *III. C. - 3. 2. 3. Tests multi- espèces*

Afin de vérifier la multi-spécificité des Acms vis-à-vis des différentes molécules de VTG de chevesne, de vandoise, de hotu, de gardon, de rotengle, de barbeau et de perche, des échantillons plasmatiques de femelles en vitellogenèse et de mâles pêchés dans des zones *a priori* contaminées ont été analysés avec les trois tests d'agglutination G10/5/1-LAT, F4/8/1-LAT et F4/9/1-LAT. Les résultats confirment ceux déjà acquis avec les western blots. Les molécules de VTG des cinq cyprinidés, chevesne, vandoise, hotu, gardon et rotengle sont détectées par les trois Acms (Figure 69 d, e, f, g et h). Quant aux molécules de VTG de barbeau et de perche, elles sont uniquement reconnues par le F4/9/1 (Figure 69 b et c). En effet, les tests réalisés avec les billes recouvertes de G10/5/1 et de F4/8/1 sont tous négatifs (Figure 69 a).

Les deux types d'agglutinats, précédemment dénommés “ rond ” et “ grand ”, ne sont pas obtenus chez tous les animaux :

- chez le barbeau et le chevesne, ces deux types d'agglutinats sont présents dans des quantités identiques et ils forment tous les deux un halo (Figure 69 c, d) ;
- chez la vandoise, le hotu et le gardon, les agglutinats ronds sont majoritaires (Figure 69 e, f et g) ;
- chez le rotengle et la perche, seuls des grands agglutinats sont visibles. (Figure 69 b et h).

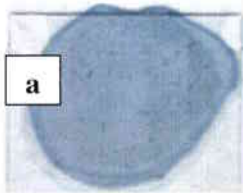
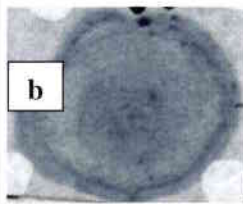
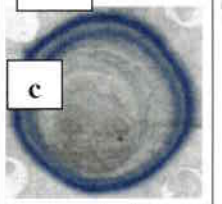
Certains de ces profils rappellent ceux observés chez les carpes. Ainsi, les profils obtenus avec la vandoise, le hotu et le gardon confirment que ces animaux sont des femelles (stade 3) en vitellogenèse (présence d'agglutinats ronds) (Gupta, 1975). De plus, ces animaux, pêchés dans la Moselle, présentent aussi les agglutinats caractérisant une contamination par des ŒMs (présence

de grands agglutinats). Concernant le rotengle, son profil d'agglutination confirme qu'il s'agit d'un mâle (stade 1), et qu'il est probablement contaminé comme l'avait indiqué les résultats de western blot et d'ELISA (présence de grands agglutinats). Quant à la perche (mâle en stade 1), la présence de grands agglutinats, dans son profil d'agglutination, résulte de son traitement avec de l'œstradiol.

Pour le barbeau et le chevesne, leur profil d'agglutination diffère de ceux observés chez les carpes et chez les autres animaux. En effet, les deux types d'agglutinats rond et grand sont présents en quantité identique.

Plusieurs espèces de poissons possèdent deux types de VTG, comme les carpes Indian major (*Cirrhinus mrigala*), les carrelets Barfin (*Verasper moseri*), les gobies (*Acanthogobius flavimanus*), les petotes (*Cyprinodon variegatus*), la sole anglaise (*Pleuronectes vetulus*). Toutes deux sont détectables, à la fois, chez les animaux traités et chez les femelles en vitellogenèse (Roubal *et al.*, 1997, Matsubara *et al.*, 1999, Bowman *et al.*, 2000, Nath et Maitra, 2001, Ohkubo *et al.*, 2003). Dans le cas du chevesne et du barbeau, il se pourrait que deux molécules de VTG soient produites, de manière identique, chez les animaux traités et chez les femelles en vitellogenèse, ce qui expliquerait la présence des deux types d'agglutinats dans le profil d'agglutination du mâle barbeau contaminé.

*Détecter la production anormale de VTG chez les carpes mâles contaminés par des ŒMs avec les tests d'agglutination développés avec les trois Acms G10/5/1, F4/8/1 ou F4/9/1, présente plusieurs avantages. Ces tests sont rapides, simples à exécuter et comme ils ne nécessitent pas de matériels spécifiques de laboratoire, ils peuvent être utilisés directement sur le terrain. De plus, avec les tests F4/8/1- ou F4/9/1-LAT, il est possible de différencier les carpes contaminées, mâles et femelles, des carpes femelles saines naturellement en vitellogenèse. Le test F4/9/1-LAT, présente en plus l'avantage de reconnaître un épitope commun aux molécules de VTGs de 7 espèces de cyprinidés (la carpe, le chevesne, la vandoise, le hotu, le rotengle, le gardon et le barbeau) et d'une espèce de la famille des percidés (la perche), soit 2 espèces de plus que les deux autres tests développés avec les Acms G10/5/1 et F4/8/1.*

| Complexes        | Perche                                                                                                    |                                                                                                           | Barbeau                         |       | Chevesne                                                                                                   |       | Vandoise                                                                                                    |       | Hotu                                                                                                        |       | Gardon                                                                                                      |       | Rotengle                                                                                                    |       |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| B-G10/5/1        | <div></div> <div>a</div> |                                                                                                           |                                 |       | <div></div> <div>d</div> |       | <div></div> <div>e</div> |       | <div></div> <div>f</div> |       | <div></div> <div>g</div> |       | <div></div> <div>h</div> |       |
| B-F4/8/1         |                                                                                                           |                                                                                                           |                                 |       |                                                                                                            |       |                                                                                                             |       |                                                                                                             |       |                                                                                                             |       |                                                                                                             |       |
| B-F4/9/1         | <div></div> <div>b</div> | <div></div> <div>c</div> | x 2                             |       | x 2                                                                                                        |       | x 2                                                                                                         |       | x 2                                                                                                         |       | x 2                                                                                                         |       |                                                                                                             |       |
| Agglutinats      | Rond                                                                                                      | C x 2                                                                                                     | Rond                            | C x 2 | Rond                                                                                                       | Grand | Rond                                                                                                        | Grand | Rond                                                                                                        | Grand | Rond                                                                                                        | Grand | Rond                                                                                                        | Grand |
| G10/5/1          | n.d.                                                                                                      | n.d.                                                                                                      | ++                              | ++    | ++                                                                                                         | ++    | +++                                                                                                         | +     | +++                                                                                                         | +     | +++                                                                                                         | +     | n.d.                                                                                                        | +++   |
| F4/8/1 et F4/9/1 | n.d.                                                                                                      | +++                                                                                                       |                                 |       |                                                                                                            |       |                                                                                                             |       |                                                                                                             |       |                                                                                                             |       |                                                                                                             |       |
| Sexe des animaux | (stade 3) traitées avec de l'E2                                                                           |                                                                                                           | (stade 1) pêché dans la Moselle |       | en vitellogenèse (stade 3) pêché dans la Moselle                                                           |       | en vitellogenèse (stade 3) pêché dans la Moselle                                                            |       | en vitellogenèse (stade 3) pêché dans la Moselle                                                            |       | en vitellogenèse (stade 3) pêché dans la Moselle                                                            |       | (stade 1) pêché dans la Moselle                                                                             |       |

**Figure 69 :** Résultats des tests d'agglutination obtenus avec des plasmas de barbeau, de perche, de chevesne, de vandoise, de hotu, de gardon et de rotengle et les différents complexes de billes-G10/5/1, billes-F4/8/1 et billes-F4/9/1.

### III. C. - 4. Essai sur le terrain

Des études sont actuellement en cours, au Portugal, par le département d'Ingénierie de l'Environnement de l'Université Nouvelle de Lisbonne, pour déterminer l'impact œstrogénique en sortie d'une STEP desservant la ville de Lisbonne (Diniz *et al.*, 2004). L'impact œstrogénique de ces effluents sur des carassins mâles (*Carassius carassius*) est évalué de deux manières :

- par la détection de la production anormale de VTG à l'aide d'un de nos Acms (G10/5/1),
- par les perturbations histologiques générées.

Une production anormale de VTG significative est détectée chez les carassins mâles contaminés avec les effluents sortant de la STEP (donc après traitement). Une augmentation significative de la production de VTG est également observée chez les femelles. La quantité de VTG anormalement produite est, pour les deux sexes, proportionnelle au facteur de dilution de l'effluent (Figure 70).

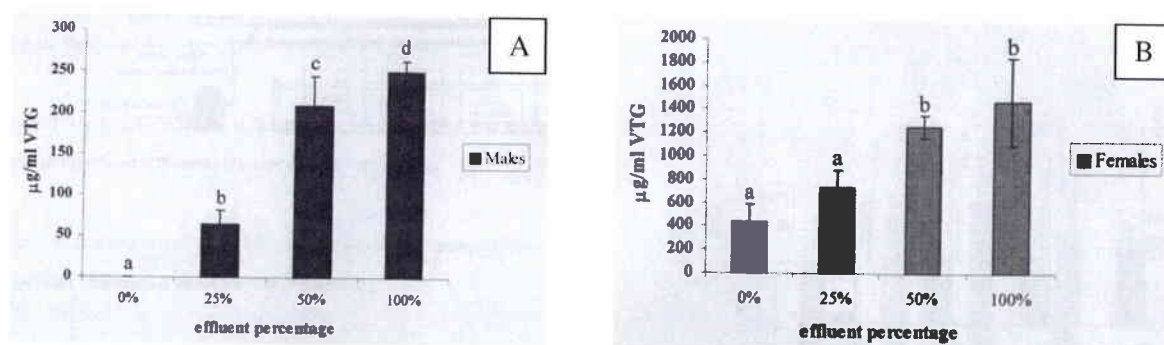
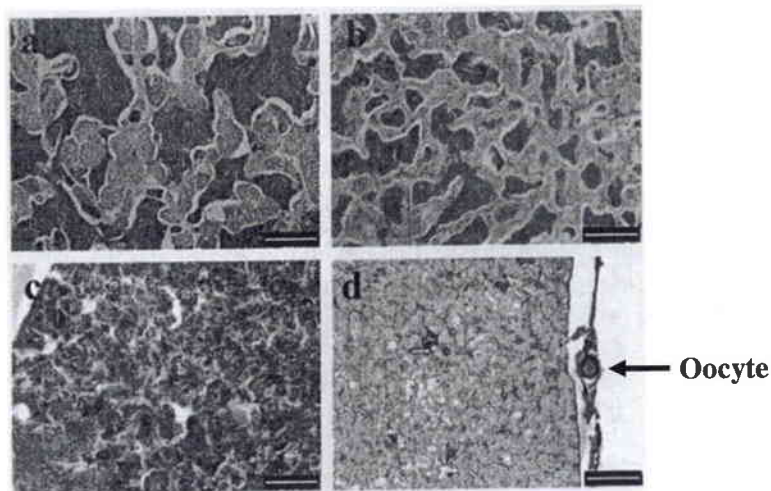


Figure 70 : Effet de la dilution des effluents traités sur la production de vitellogénine chez les carassins mâles (A) ou femelles (B), après 28 jours d'exposition ; les différences sont significatives si les lettres sont différentes ( $p < 0,05$ ) (Diniz *et al.*, 2004).

Les premières perturbations histologiques sont observées chez les mâles contaminés avec un effluent traité dilué à 50 %. L'épithélium testiculaire est touché : des cellules hypertrophiées sont observables autour des lobules séminifères et les cystes sont moins nombreux que chez les animaux contrôles (Figure 71 c). Quant aux animaux contaminés avec un effluent traité pur, la majorité présente une dégénérescence testiculaire grave : la spermatogenèse est complètement inhibée et aucun cyste n'est visible. Par contre, pour les autres, la spermatogenèse est encore

active. En effet, des spermatozoïdes sont présents dans la lumière des lobules. En contrepartie, des oocytes sont anormalement présents à la périphérie des gonades et parfois au centre d'un cyste (Figure 71 d).



**Figure 71 :** Histologie des testicules de carassins mâles contrôles (a), et de carassins mâles contaminés pendant 28 jours avec 25 % d'effluent traité (b), ou avec 50 % d'effluent traité (c) ou bien avec 100 % d'effluent traité (d). Bar : 100  $\mu$ m) (Diniz *et al.*, 2004).







# *Conclusions et Perspectives*



## ***Conclusions et Perspectives***

L'objectif de ce travail était de développer un test d'agglutination pour la détection, *in situ*, de la vitellogénine (VTG) : biomarqueur de la contamination des écosystèmes aquatiques par les œstrogènes mimétiques (EMs). Cette protéine spécifique des femelles ovipares, est anormalement produite chez les poissons mâles ou les jeunes immatures contaminés par ces polluants. Pour mettre au point ce test immunologique d'agglutination, plusieurs étapes ont été nécessaires :

- la purification de la protéine à détecter ;
- la production d'Acs spécifiques de cette protéine ;
- la mise au point du processus d'adsorption des Acs sur les billes de latex et son application ;
- la mise au point du protocole d'immunoagglutination ;
- la validation de son utilisation sur des poissons provenant d'une zone polluée.

Ce test permet ainsi de détecter visuellement la présence de VTG par la formation d'agglutinat.

Une première méthode de purification, basée sur d'autres méthodes, a été adaptée à la VTG de carpe. Cette méthode utilise successivement deux techniques de chromatographies liquides à haute performance : échangeuses d'anions faibles et filtration sur gel ; elle nous a permis d'obtenir très rapidement une solution pure de VTG, non-dénaturée. Par contre, la concentration de la solution de VTG ne s'est pas avérée suffisante pour induire la production des Acs monoclonaux (Acms) spécifiques de cette protéine.

Une seconde méthode, en une seule étape, a donc été développée, sur la base d'une chromatographie liquide à haute performance échangeuse d'anions faibles. Dans ce cas, les protéines ont été éluées par un gradient salin discontinu (Magalhães *et al.*, 2004b). Avec cette nouvelle méthode, la solution de VTG de carpe obtenue est également pure, non dénaturée et suffisamment concentrée. Après trente minutes d'analyse, la solution de VTG obtenue est 5,7 fois plus concentrée que celle obtenue avec la première méthode.

Cette solution de VTG a servi à immuniser des souris femelle BALB/C en vue de la production d'Acms. Presque 400 suspensions d'hybridomes, ont été analysées. Parmi elles, 17 hybrides produisant des Acs anti-VTG de type IgG ont été sélectionnés. Après les étapes de

clonage, seulement 12 hybrides se sont avérés producteurs d'Acms spécifiques de la VTG. Finalement, parmi ces 12 clones, 3 ont été retenus pour le reste de l'étude (G10/5/1, le F4/8/1 et le F4/9/1) car ils présentent une intensité de détection plus élevée de la VTG de carpe, et une meilleure adaptation à la culture en masse.

Enfin, des tests de croisements ont été réalisés pour identifier l'Acs reconnaissant un épitope multi-espèces. Parmi les différentes espèces de poissons testées, 6 espèces appartenant à la famille des cyprinidés, comme la carpe (chevesne, vandoise, hotu, gardon, rotengle, et barbeau) et une espèce à la famille des percidés (perche). Les deux Acms G10/5/1 et le F4/8/1 reconnaissent seulement la VTG de 5 espèces sur les 7, toutes issues de la famille des cyprinidés. Le F4/9/1 reconnaît en plus la VTG de barbeau et de perche.

Un premier test d'agglutination a été mis au point avec des billes de 2  $\mu\text{m}$ . Les résultats d'adsorption montrent que le point de saturation de ces billes n'est pas atteint, même pour la concentration en Acms adsorbés de 4150  $\mu\text{g/ml}$ . De plus, sur les cinq concentrations testées, dans un cas seulement le pourcentage d'adsorption a dépassé les 50 % (4150  $\mu\text{g/ml}$ ). Le rendement d'adsorption pouvait donc encore être améliorée en optimisant le protocole d'adsorption. En revanche, les résultats d'immunoréactivité bien que spécifiques de la présence de VTG dans le plasma testé, restent très limités quant à la taille des agglutinats. Ceci est dû au volume occupé par les billes de 2  $\mu\text{m}$ , réduisant le nombre de billes pouvant s'agglutiner autour d'une molécule de VTG.

De nouvelles billes d'un diamètre de 1  $\mu\text{m}$  ont alors été utilisées pour développer un nouveau test (Magalhães *et al.*, 2004c). Une première étude a été réalisée pour déterminer si le polymère des billes et les Acms étaient compatibles, et si l'adsorption n'induisait pas la perte de l'immunoréactivité des Acms. Les résultats d'adsorption montrent que les immunoglobulines s'adsorbent sur ces billes et que leur réactivité reste bonne mais perfectible. En effet, les agglutinations obtenues sont spécifiques de l'interaction Acms-VTG, toutefois un problème de saturation en VTG apparaît avec les échantillons plasmatiques provenant de carpes traitées avec de l'œstradiol. Cette saturation provoque la formation d'une cape hautement chargée de VTG autour des billes générant des forces répulsives, diminuant le processus d'agglutination.

Afin d'améliorer l'adsorption des Acs et la production d'agglutinats, un nouveau protocole a été mis au point (Magalhães *et al.*, 2004a). Dans un premier temps, le pH optimal d'adsorption pour chaque Acm a été déterminé. Il est égal à 6,2 pour le G10/5/1, et à 5,2 pour le F4/8/1 et le F4/9/1. Le processus d'adsorption sur les billes de 1 µm, de chaque Acm et d'un mélange des trois, a été ensuite étudié à l'aide de plusieurs modèles mathématiques. Les résultats obtenus montrent que les Acs se fixent sur les billes avec deux affinités d'adsorption, la première étant toujours plus élevée que la seconde. De plus, les trois Acms possèdent la capacité de changer de conformation ou d'orientation lors du processus d'adsorption. Chacune de ces conformations présente une affinité différente pour le polymère des billes. Selon ces affinités nous pouvons classer les Acs :

- Affinité 1 : F4/9/1 > mélange > G10/5/1 > F4/8/1,
- Affinité 2 : mélange > G10/5/1 > F4/8/1 > F9/9/1.

Avant de tester l'immunoréactivité des différents complexes billes-Acms, une étude a été réalisée sur le tampon de suspension des billes afin de neutraliser les forces répulsives liées aux grandes concentrations de VTG de carpe. Cette étude a permis de sélectionner ce tampon : PBS, pH=6 contenant 1 % de BSA, permettant l'apparition d'agglutinats de très grandes tailles, visibles à l'œil nu, toujours spécifiques de la VTG. Trois types d'agglutinats sont observables :

- des agglutinats ronds de taille moyenne, très nombreux, qui forme un halo autour du mélange billes x plasma ;
- des agglutinats grands moins nombreux, répartis sur toute la surface du mélange ;
- et des petits agglutinats d'une forme diffuse, très nombreux et également répartis sur toute la surface du mélange.

Trois profils d'agglutinations différents sont obtenus avec ces trois types d'agglutinats :

- un profil uniquement composé d'agglutinats ronds, caractéristique des carpes femelles en vitellogenèse ;
- un profil composé des grands agglutinats et des agglutinats diffus, caractéristique des carpes traitées ;
- et un profil composé des trois agglutinats : caractéristique des carpes femelles, à la fois, en vitellogenèse et traitées, et des complexes billes-F4/8/1 et billes-F4/9/1.

Ces résultats nous laissent envisager l'existence de deux molécules de VTG chez la carpe : une molécule qui serait plutôt caractéristique des femelles en vitellogenèse et l'autre molécule plutôt des carpes traitées.

Les 6 espèces de cyprinidés pêchés dans la Moselle et le percidé traité avec de l'œstradiol, ont été aussi reconnues par les Acms produits. De plus, différents profils d'agglutinations ont également été observés. Les profils obtenus avec la vandoise, le hotu, le gardon, le rotengle et la perche rappellent ceux obtenus avec les carpes. Ainsi ces profils confirment les résultats histologiques montrant que la vandoise, le hotu et le gardon étaient des femelles en vitellogenèse et que le rotengle et la perche étaient des mâles. De plus, le profil des animaux pêchés dans la Moselle indiquerait une possible contamination par des ŒMs. Concernant, la perche, l'influence des ŒMs sur la présence de grands agglutinats est démontrée car cet animal a été traité avec de l'œstradiol.

Le test d'agglutination développé avec les billes de 1  $\mu\text{m}$  (avec le G10/5/1, le F4/8/1, le F4/9/1 et le mélange) permet de détecter la production anormale de VTG par des animaux contaminés de manière simple, très rapide (en moins de 2 min) et spécifique. De plus, il permet de différencier chez plusieurs espèces de poissons, les femelles saines en vitellogenèse des animaux contaminés, mâle ou femelle. Ce test est idéal pour effectuer le suivi régulier, *in situ*, de la pollution des écosystèmes aquatiques par les ŒMs.

Une validation de son utilisation en conditions réelles, sur le terrain est actuellement en cours de réalisation : en France, pour la surveillance de l'état de la Moselle, en collaboration avec le CSP ; et au Portugal, pour la surveillance de la pollution par des effluents en sortie de STEP, en collaboration avec le département d'Ingénierie de l'Environnement de l'Université Nouvelle de Lisbonne.

D'autre part, des études plus fondamentales sont envisagées pour une meilleure compréhension des phénomènes révélés par les tests d'immunoagglutination. Ainsi, la présence de deux molécules de VTG de carpe doit être vérifiée par la confirmation de l'existence de deux épitopes correspondant à chacune des molécules de VTG. De plus, le séquençage de ces deux protéines permettra de déterminer si la différence entre ces deux molécules résulte d'une

différence de composition en acides aminés et/ou d'une différence de transformation post-traductionnelle. Une étude sera également réalisée pour comprendre le processus d'activation de la synthèse des deux molécules de VTG de carpe et leur transformation en comparant l'effet, de différents ŒMs et une stimulation normale par l'œstrogène naturel au cours de la phase de vitellogenèse. Ces différentes études pourront être réalisées en culture cellulaire.

De même, ces différentes études pourront être effectuées sur les autres espèces de poissons étudiés, de manière à comprendre les différents profils d'agglutination obtenus. De plus, la recherche d'un épitope commun aux différentes molécules de VTG provenant de ces espèces de poisson et d'autres espèces permettra la production d'un Acm reconnaissant la plupart des espèces.





# ***Références Bibliographiques***



## Références Bibliographiques

**Ackermann, G. E., Schwaiger, J., Negele, R. D. et Fent, K., 2002.**

Effects of long-term nonylphenol exposure on gonadal development and biomarkers of estrogenicity in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **60**, 203-221.

**Adhoum, N. et Monser, L., 2004.**

Removal of phthalate on modified activated carbon: application to the treatment of industrial wastewater. *Separation and Purification Technology*, **In press**.

**Albertazzi, P. et Purdie, D. W., 2002.**

The nature and utility of the phytoestrogens: a review of the evidence. *Maturitas*, **42**, 173-185.

**Allner, B., Wegener, G., Knacker, T. et Stahlschmidt-Allner, P., 1999.**

Electrophoretic determination of estrogen-induced protein in fish exposed to synthetic and naturally occurring chemicals. *Science of The Total Environment*, **233** (1-3), 21-31.

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaeffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. et Lipman, D. J., 1997.**

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3389-3402.

**Amuy, E., Alape-Giron, A., Lomonte, B., Thelestam, M. et Gutierrez, J. M., 1997.**

Development of immunoassays for determination of circulating venom antigens during envenomations by coral snakes (*Micrurus* species). *Toxicon*, **35** (11), 1605-1616.

**Andersen, H. R., Andersson, A. M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., Bjerregaard, P., Christiansen, L. B., Gissel, B., Hummel, R., Jorgensen, E. B., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Nielsen, J. B., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K. L., Perez, P., Skakkeboek, N. E., Sonnenschein, C., Soto, A. M. et al., 1999.**

Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environmental Health Perspectives*, **107 Suppl 1**, 89-108.

**Andersen, L., Holbech, H., Gessbo, A., Norrgren, L. et Petersen, G. I., 2003.**

Effects of exposure to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol during early development on sexual differentiation and induction of vitellogenin in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **134** (3), 365-374.

**Andreassen, T. K. et Korsgaard, B., 2000.**

Characterization of a cytosolic estrogen receptor and its up-regulation by 17 $\beta$ -estradiol and the xenoestrogen 4-*tert*-octylphenol in the liver of eelpout (*Zoarces viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Molecular & Integrative Physiology*, **125**, 299-313.

**Arukwe, A., Celius, T., Walther, B. T. et Goksoyr, A., 2000.**

Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, **49** (3), 159-170.

**Arukwe, A. et Goksoyr, A., 1998.**

Xenobiotics, xenoestrogens and reproduction disturbances in fish. *Sarsia*, **83**, 225-241.

- Attar, Z. J., Chance, M. L., El-Safi, S., Carney, J., Azazy, A., El-Hadi, M., Dourado, C. et Hommel, M., 2001.**  
Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica*, **78**, 11-16.
- Babin, P. J., Bogerd, J., Kooiman, F. P., Van Marrewijk, W. J. A. et Van der Horst, D. J., 1999.**  
Apolipoprotein II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. *Journal of Molecular Evolution*, **49**, 150-160.
- Belfroid, A. C., Van der Horst, A., Vethaak, A. D., Schäfer, A. J., Rijs, G. B. J., Wegner, J. et Cofino, W. P., 1999.**  
Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in the Netherlands. *Science of The Total Environment*, **225**, 101-108.
- Bennetau-Pelissero, C., Arnal-Schnebel, B., Sauvant, P., Sagne, J. L., Verbruggen, M. A., Mathey, J. et Lavialle, O., 2003.**  
ELISA as a new method to measure genistein and diadzein in food and human fluids. *Food Chemistry*, **82**, 645-658.
- Bennetau-Pelissero, C., Breton, B. B., Bennetau, B., Corraze, G., Le Menn, F., Davail-Cuisset, B., Helou, C. et Kaushik, S. J., 2001.**  
Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, **121**, 173-187.
- Bennetau-Pelissero, C., Kaushik, S. J., Sumpter, J. P., Fostier, A., Le Gac, F., Valotaire, Y., Davail-Cuisset, B. et Le Menn, F., 1998.**  
Effets du soja et des phytoestrogènes sur la vitellogénèse et l'endocrinologie stéroïdienne de la truite arc-en-ciel et de l'esturgeon sibérien. Approches in vivo et in vitro. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, **350-351**, 571-583.
- Bennie, D. T., 1999.**  
Review of the environmental occurrence of alkylphenols and alkylphenols ethoxylates. *Water Quality Research Journal of Canada*, **34** (1), 79-122.
- Bhaskar, S., Banavaliker, J. N. et Hanif, N., 2003.**  
Large-scale validation of a latex agglutination test for diagnosis of tuberculosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **1613**, 1-5.
- Blackburn, M. A. et Waldock, M. J., 1995.**  
Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Water Research*, **29** (7), 1623-1629.
- Blázquez, M., Zanuy, S., Carrillo, M. et Piferrer, F., 1998.**  
Structural and functional effects of early exposure to estradiol-17 $\beta$  and 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the gonads of the gonochoristic teleost *Dicentrarchus labrax*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **18**, 37-47.
- Bolz, U., Hagenmaier, H. et Körner, W., 2001.**

Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. *Environmental Pollution*, **115**, 291-301.

**Bordajandi, L. R., Gómez, G., Fernández, M. A., Abad, E., Rivera, J. et González, M. J., 2003.**

Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). *Chemosphere*, **53**, 163-171.

**Bowman, C. J., Kroll, K. J., Gross, T. G. et Denslow, N. D., 2002.**

Estradiol-induced gene expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Molecular and Cellular Endocrinology*, **196**, 67-77.

**Bowman, C. J., Kroll, K. J., Hemmer, M. J., Folmar, L. C. et Denslow, N. D., 2000.**

Estrogen-induced vitellogenin mRNA and protein in sheaphead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *General and Comparative Endocrinology*, **120**, 300-313.

**Brambilla, G., Cherubini, G., De Filippis, S., Magliuolo, M. et Di Domenico, A., 2004.**

Review of aspects pertaining to food contamination by polychlorinated dibenzodioxins, dibenzofurans, and biphenyls at the farm level. *Analytica Chimica Acta*, **514**, 1-7.

**Brion, F., Rogerieux, F., Noury, P., Migeon, B., Flammarion, P., Thybaud, E. et Porcher, J. M., 2000.**

Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **737** (1-2), 3-12.

**Brossa, L., Marcé, R. M., Borrull, F. et Pocurull, E., 2003.**

Determination of endocrine-disrupting compounds in water samples by on-line solid-phase extraction-programmed-temperature vaporisation-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **998**, 41-50.

**Brown, M. J. et Lester, J. N., 1982.**

Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge-I Effects of metal concentration. *Water Research*, **16**, 1539-1548.

**Büscher, P., Lejon, V., Magnus, E. et Van Meirvenne, N., 1999.**

Improved latex agglutination test for detection of antibodies in serum and cerebrospinal fluid of *Trypanosoma brucei gambiense* infected patients. *Acta Tropica*, **73**, 11-20.

**Calafat, A. M., Slakman, A. R., Silva, M. J., Herbert, A. R. et Needham, L. L., 2004.**

Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **805**, 49-56.

**Canapa, A., Barucca, M., Celeste, A., Olmo, E. et Regoli, F., 2002.**

Preliminary investigations on vitellogenin m-RNA induction in some bioindicator mediterranean fish species. *Marine Environmental Research*, **54**, 673-677.

**Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S. et Levi, Y., 2004.**

Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of The Total Environment*, **In press**.

**Castro, R. R., Prieto, E. S., Santo, I., Azevedo, J. et F., E., 2001.**

Evaluation of the passive particle agglutination test in the serodiagnosis and follow-up of syphilis. *American Society of Clinical Pathologists*, **116**, 581-585.

**Centner, T. J., 2004.**

New regulations to minimize water impairment from animals rely on management practices. *Environmental International*, **30**, 539-545.

**Chandrakesan, S. D. et Parija, S. C., 2003.**

Latex agglutination test (LAT) for antigen detection in the cystic fluid for the diagnosis of cystic echinococcosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **45**, 123-126.

**Chikae, M., Ikeda, R., Hatano, Y., Hasan, Q., Morita, Y. et Tamiya, E., 2004.**

Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate,  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane, and 17 $\beta$ -estradiol on the fry stage of medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **In press**.

**Christiansen, L. B., Pedersen, K. L., Korsgaard, B. et Bjerregaard, P., 1998a.**

Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using *in vivo* synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Marine Environmental Research*, **46** (1-5), 137-140.

**Christiansen, T., Korsgaard, B. et Jespersen, A., 1998b.**

Induction of vitellogenin synthesis by nonylphenol and 17 $\beta$ -estradiol and effects on the testicular structure in eelpout *Zoarces viviparus*. *Marine Environmental Research*, **46** (1-5), 141-144.

**Contreras López, M. C., 2003.**

Determination of potentially bioaccumulating complex mixtures of organochlorine compounds in wastewater: a review. *Environmental International*, **28**, 751-759.

**Coyle, Y. M., 2004.**

The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*, **84**, 273-288.

**Curry, R. D. et Mincher, B. J., 1999.**

The status of PCB radiation chemistry research; prospects for waste treatment in nonpolar solvents and soils. *Radiation Physics and Chemistry*, **56**, 493-502.

**Cutting, J. A. et Roth, T. F., 1973.**

Staining of phospho-proteins on acrylamide gels electropherograms. *Analytical Biochemistry*, **54**, 386-394.

**Dabrowski, J. M., Peall, S. K. C., Van Niekerk, A., Reinecke, A. J., Day, J. A. et Schulz, R., 2002.**

Predicting runoff-induced pesticide input in agricultural sub-catchment surface waters: linking catchment variables and contamination. *Water Research*, **36**, 4975-4984.

**Dávalos-Pantoja, L., Ortega-Vinuesa, J. L., Bastos-González, D. et Hidalgo-Álvarez, R., 2001.**

Colloidal stability of IgG- and IgY-coated latex microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **20**, 165-175.

- Denslow, N. D., Bowman, C. J., Ferguson, R. J., Lee, H. S., Hemmer, M. J. et Folmar, L. C., 2001.**  
Induction of gene expression in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) treated with 17 $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol, or ethinyloestradiol: the use of mRNA fingerprints as an indicator of gene regulation.
- Denslow, N. D., Chow, M. C., Kroll, K. J. et Green, L., 1999.**  
Vitellogenin as a biomarker of exposure for estrogens and estrogen mimics. *Ecotoxicology*, **8**, 285-398.
- Dias, A. C. P., Fernandes, P., Cabral, J. M. S. et Pinheiro, H. M., 2002.**  
Isolation of a biodegradable sterol-rich fraction from industrial wastes. *Bioresource Technology*, **82**, 253-260.
- Diniz, M. S., Peres, I., Magalhães-Antoine, I., Falla, J. et Pihan, J.-C., 2004.**  
Estrogenic effects in crucian carp (*Carassius carassius*) exposed to treated sewage effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **In press**.
- Edman, P. et Cooper, A. G., 1968.**  
Amino acid sequence at the N-terminal end of a cold agglutinin Kappa chain. *FEBS Letters*, **2** (1), 33-35.
- Epler, P., Galas, J. et Stoklosowa, S., 1997.**  
Steroidogenic activity of carp ovarian follicular and intersticiel cells at the pre-spawning and resting time: A tissue culture approach. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Molecular & Integrative Physiology*, **116** (2), 167-170.
- Erbe, R. E., Chew, B. P. et Keller, H. F., 1997.**  
Relative concentration of estrogen and progesterone in milk and bold, and excretion of estrogen in urine. *Journal of Animal Science*, **46**, 617-626.
- Falandysz, J., Wyrzykowska, B., Warzocha, J., Barska, I., Garbacik-Wesolowska, A. et Szefer, P., 2004.**  
Organochlorine pesticides and PCBs in perch *Perca fluviatilis* from the Odra/Oder river estuary, Baltic Sea. *Food Chemistry*, **87**, 17-23.
- Falla, J., 1990.**  
Rôle des enveloppes bactériennes dans l'accumulation des métaux (Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>). Thèse de Doctorat. Université de Metz, Metz, France, 200 Pages.
- Falla, J. et Block, J.-C., 1993.**  
Binding of Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> by isolated enveloppes of *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology Letters*, **108**, 347-352.
- Fawell, J. K., Sheahan, D., James, H. A., Hurst, M. et Scott, S., 2001.**  
Oestrogens and oestrogenic activity in raw and treated water in severn trent water. *Water Research*, **35** (5), 1240-1244.
- Feng, K., Yu, B. Y., Ge, D. M., Wong, M. H., Wang, X. C. et Cao, Z. H., 2003.**  
Organo-chlorine pesticide (DDT and HCH) residues in the Taihu Lake Region and its movement in soil-water system. I. Field survey of DDT and HCH residues in ecosystem of the region. *Chemosphere*, **50**, 683-687.

- Fenske, M., Van Aerle, R., Brack, S., Tyler, C. R. et Segner, H., 2001.**  
Development and validation of a homologous zebrafish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) vitellogenin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its application for studies on estrogenic chemicals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Toxicology and Pharmacology*, **129**, 217-232.
- Flammarion, P., Brion, F., Babut, M., Garric, J., Migeon, B., Noury, P., Thybaud, E., Tyler, C. R. et Palazzi, X., 2000.**  
Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*). *Ecotoxicology*, **9**, 127-135.
- Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret, B. et Valotaire, Y., 1995.**  
Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Journal of Molecular Endocrinology*, **15**, 143-151.
- Flouriot, G., Pakdel, F. et Valotaire, Y., 1996.**  
Transcriptional and post-transcriptional regulation of rainbow trout estrogen receptor and vitellogenin gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **124**, 173-183.
- Folmar, L. C., Gardner, G. R., Schreiber, M. P., Haebler, R., Horowitz, D. B. et Denslow, N. D., 2001.**  
Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology*, **51** (4), 431-441.
- Folmar, L. C., Hemmer, M. J., Denslow, N. D., Kroll, K., Chen, J., Cheek, A., Richman, H., Meredith, H. et Grau, E. G., 2002.**  
A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylloestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor *in vivo* and *in vitro*. *Aquatic Toxicology*, **60**, 101-110.
- Folmar, L. C., Hemmer, M. J., Hemmer, R., Bowman, C., Kroll, K. et Denslow, N. D., 2000.**  
Comparative estrogenicity of estradiol, ethynyl estradiol and diethylstilbestrol in an *in vivo*, male sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), vitellogenin bioassay. *Aquatic Toxicology*, **49**, 77-88.
- Font, G., Mañes, J., Moltó, J. C. et Picó, Y., 1996.**  
Current developments in the analysis of water pollution by polychlorinated biphenyls. *Journal of Chromatography A*, **733**, 449-471.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J. et Wenzel, A., 2002.**  
Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, **36**, 1429-1438.
- Fukada, H., Fujiwara, Y., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V. et Hara, A., 2003.**  
Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **134** (3), 615-623.
- Fukada, H., Haga, A., Fujita, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V. et Hara, A., 2001.**  
Development and validation of chemiluminescent immunoassays for vitellogenin in five salmonid species. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, **130**, 163-170.



- Fukada, H., Hiramatsu, N., Kitamura, M., Shimizu, M. et Hara, A., 2000.**  
Changes of serum growth hormone and vitellogenin levels during vitellogenesis in female masu salmon *Oncorhynchus masou*. *Fisheries Science*, **66**, 789-791.
- Funkenstein, B., Bowman, C. J., Denslow, N. D., Cardinali, M. et Carnevali, O., 2000.**  
Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **167**, 33-41.
- Fyhn, H. J., Finn, R. N., Reith, M. et Norberg, B., 1999.**  
Yolk protein hydrolysis and oocyte free amino acids as a key features in the adaptative evolution of teleost fishes to sea water. *Sarsia*, **84**, 451-456.
- Gagné, F. et Blaise, C., 1998.**  
Estrogenic properties of municipal and industrial wastewaters evaluated with a rapid and sensitive chemoluminescent *in situ* hybridization assay (CISH) in rainbow trout hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, **33**, 125-132.
- Gagné, F. et Blaise, C., 2000.**  
Evaluation of environmental estrogens with a fish cell line. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **65**, 494-500.
- Gagné, F., Pardos, M. et Blaise, C., 1999.**  
Estrogenic effects of organic environmental extracts with the trout hepatocyte vitellogenin assay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **62**, 723-730.
- Galas, J., Epler, P. et Stoklosowa, S., 1999.**  
Seasonal response of carp (*Cyprinus carpio*) ovarian cells to stimulation by various hormones as measured by steroid secretion: tissue culture approach. *Endocrine regulations*, **7**, 125-132.
- Galfré, G. et Milstein, C., 1981.**  
Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods of Enzymology*, **73 (Part B)**, 3-46.
- Galisteo, F., Martín, A. et Hidalgo-Álvarez, R., 1994.**  
*Colloid and Polymer Science*, **272**, 352.
- Garey, J. et Wolff, M. S., 1998.**  
Estrogenic and antiprogesteragenic activities of pyrethroids insecticides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **251**, 855-859.
- Gavala, H. N., Alatrisme-Mondragon, F., Iranpour, R. et Ahring, B. K., 2003.**  
Biodegradation of phthalate esters during the mesophilic anaerobic digestion of sludge. *Chemosphere*, **52**, 673-682.
- Giam, C. S., Chan, H. S., Neff, G. S. et Atlas, E. L., 1998.**  
Phthalates esters plasticizers: a new class of marine pollutant. *Science*, **27**, 419-421.
- Gill, M. E., Spiropoulos, J. et Moss, C., 2002.**  
Testicular structure and sperm production in flounders from polluted estuary: a preliminary study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **281**, 41-51.

- Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, G. M. et Bowmer, T., 1998a.**  
Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during sexual differentiation. *Aquatic Toxicology*, **43**, 77-92.
- Gimeno, S., Komen, H., Jobling, S., Sumpter, J. P. et Bowmer, T., 1998b.**  
Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis. *Aquatic Toxicology*, **43** (2-3), 93-109.
- Gormley, K. L. et Teather, K. L., 2003.**  
Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **54**, 330-338.
- Grace, P. B., Taylor, J. I., Botting, N. P., Fryatt, T., Oldfield, M. F. et Bingham, S. A., 2003.**  
Quantification of isoflavones and lignans in urine using gas chromatography/mass spectrophotometry. *Analytical Biochemistry*, **315**, 114-121.
- Gray, S. J., Sobanski, M. A., Kaczmariski, E. B., Guiver, M., Marsh, W. J., Borrow, R., Barnes, R. A. et Coakley, W. T., 1999.**  
Ultrasound-enhanced latex immunoagglutination and PCR as complementary methods for non-culture-based confirmation of meningococcal disease. *Journal of Clinical Microbiology*, **37** (6), 1797-1801.
- Gronen, S., Denslow, N. D., Manning, S., Barnes, S., Barnes, D. et Brouwer, M., 1999.**  
Serum vitellogenin levels and reproductive impairment of male japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 4-tert-Octylphenol. *Environmental Health Perspectives*, **107** (5), 385-390.
- Gupta, S., 1975.**  
The development of carp gonads in warm water aquaria. *Journal of Fish Biology*, **7**, 775-782.
- Harries, J. E., Janbakhsh, A., Jobling, S., Matthiessen, P., Sumpter, J. P. et Tyler, C. R., 1999.**  
Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18** (5), 932-937.
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. et Fujita, K., 2000.**  
Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo bay, Japan. *Marine Environmental Research*, **49**, 37-53.
- Hawkins, M. B., Thornton, J. W., Crews, D., Skipper, J. K., Dotte, A. et Thomas, P., 2000.**  
Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **97**, 10751-10756.
- Heemken, O. P., Reincke, H., Stachel, B. et Theobald, N., 2001.**  
The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea. *Chemosphere*, **45**, 245-259.

- Hemmer, M. J., Bowman, C. J., Hemmer, B. L., Friedman, S. D., Marcovich, D., Kroll, K. J. et Denslow, N. D., 2002.**  
Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (*Cyprinodon variegatus*) after cessation of exposure to 17 $\beta$ -estradiol and *p*-nonylphenol. *Aquatic Toxicology*, **58**, 99-112.
- Hemming, J. M., Allen, H. J., Thuesen, K. A., Turner, P. K., Waller, W. T., Lazorchak, J. M., Lattier, D., Chow, M., Denslow, N. et Venables, B., 2004.**  
Temporal and spatial variability in the estrogenicity of a municipal wastewater effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **In press**.
- Hennies, M., Wiesmann, M., Allner, B. et Sauerwein, H., 2003.**  
Vitellogenin in carp (*Cyprinus carpio*) and perch (*Perca fluviatilis*): purification, characterization and development of an ELISA for the detection of estrogenic effects. *Science of The Total Environment*, **309** (1-3), 93-103.
- Heppell, S. A., Jackson, L. F., Weber, G. M. et Sullivan, C. V., 1999.**  
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of vitellogenin in Temperate Bass (Genus *Morone*): Plasma and *in vitro* analyses. *Transactions of American Fisheries Society*, **128**, 531-541.
- Heppell, S. A. et Sullivan, C. V., 1999.**  
Gag (*Mycteroperca microlepis*) vitellogenin: purification, characterization and use for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of female maturity in three species of grouper. *Fish Physiology and Biochemistry*, **20**, 361-374.
- Hewitt, M. et Servos, M., 2001.**  
An overview of substances present in canadian aquatic environments associated with endocrine disruption. *Water Quality Research Journal of Canada*, **36** (2), 191-223.
- Hill, R. L. et Janz, D. M., 2003.**  
Developmental estrogenic exposure in zebrafish (*Danio rerio*): I. Effects on sex ratio and breeding success. *Aquatic Toxicology*, **63**, 417-429.
- Holbech, H., Andersen, L., Petersen, G. I., Korsgaard, B., Pedersen, K. L. et Bjerregaard, P., 2001.**  
Development of an ELISA for vitellogenin in whole body homogenate of zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C : Toxicology and Pharmacology*, **130** (1), 119-131.
- Hurst, M. et Sheahan, D. A., 2003.**  
The potential for oestrogenic effects of pesticides in headwater streams in the UK. *Science of The Total Environment*, **301**, 87-96.
- Hutabarat, 2001.**  
Isoflavones and coumestrol in soybeans and soybeans products from Australia and Indonesia. *Journal of Food Composition and Analysis*, **14**, 43-58.
- Ingelse, B. A., Van Dam, R. C. J., Vreeken, R. J., Mol, H. G. J. et Steijler, O. M., 2001.**  
Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous samples by direct injection using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **918**, 67-78.

- Inoue, K., Yoshie, Y., Kondo, S., Yoshimura, Y. et Nakazawa, H., 2002.**  
Determination of phenolic xenoestrogens in water by liquid chromatographic with coulometric-array detection. *Journal of Chromatography A*, **946**, 291-294.
- Ishida, T., Takao, S., Settheetham-Ishida, W. et Tiwawech, D., 2002.**  
Prevalence of hepatitis B and C virus infection in rural ethnic populations of Northern Thailand. *Journal of Clinical Virology*, **24**, 31-35.
- Ishii, K., Kurnagai, T., Tozuka, M., Ota, H. et Katsuyama, T., 2001.**  
A new diagnostic method for adenoma malignum and related lesions: latex agglutination test with a new monoclonal antibody, HIK1083. *Clinica Chimica Acta*, **312**, 231-233.
- Islinger, M., Willimski, D., Völkl, A. et Braunbeck, T., 2003.**  
Effects of 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testes in male zebrafish. *Aquatic Toxicology*, **62**, 85-103.
- Jackson, C.-J. C., Dini, J. P., Lavandier, C., Rupasinghe, H. P. V., Faulkner, H., Poysa, V., Buzzel, D. et De Grandis, S., 2002.**  
Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry*, **37**, 1117-1123.
- Jandera, P., 1999.**  
Simultaneous optimisation of gradient time, gradient shape and initial composition of the mobile phase in the high performance liquid chromatography of homologous and oligomeric series. *Journal of Chromatography A*, **845**, 133-144.
- Johnsen, H. K., Tveiten, H., Willassen, N. P. et Arnesen, A. M., 1999.**  
Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) vitellogenin: development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **124** (3), 355-362.
- Johnson, A. C., Belfroid, A. C. et Di Corcia, A., 2000.**  
Estimating steroids oestrogens inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Science of The Total Environment*, **256**, 81-90.
- Johnson, A. C., White, C., Besien, T. J. et Jürgens, M. D., 1998.**  
The sorption potential of octylphenol, a xenobiotic oestrogen, to suspended and bed-sediments collected from industrial and rural reaches of three English rivers. *Science of The Total Environment*, **210/211**, 271-282.
- Johnson, A. C., Williams, R. J. et Ulahannan, T., 1999.**  
Comment on "Identification of Estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening". *Environmental Science and Technology*, **33** (2), 369-370.
- Kang, I. J., Yokota, H., Oshimata, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokora, H. et Honjo, T., 2002.**  
Effects of 17 $\beta$ -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, **47**, 71-80.

- Kashiwada, S., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Ohnishi, Y. et Magara, Y., 2002.**  
Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Research*, **36**, 2161-2166.
- Kawaguchi, M., Inoue, K., Yoshimura, M., Ito, R., Sakui, N., Okanouchi, N. et Nakazawa, H., 2004.**  
Determination of bisphenol A in river water and body fluid samples by stir bar sorption extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **805**, 41-48.
- Kim, E.-J., Kim, J.-W. et Lee, S. K., 2002.**  
Inhibition of oocyte development in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Environmental International*, **28**, 359-365.
- Kim, J. M., Song, Y. G., Park, H. C., Kwon, K. H., Kim, E., Lee, S. H. et Kim, K. H., 1999.**  
Antibodies to human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) by particle agglutination (PA) test in Korean blood donors. *Yonsei Medical Journal*, **40** (2), 173-177.
- Kime, D. E., Nash, J. P. et Scott, A. P., 1999.**  
Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture*, **177**, 345-352.
- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. et Jespersen, A., 2000.**  
Effects of nonylphenol and 17 $\beta$ -estradiol on vitellogenin synthesis and testi morphology in male playtyfish *Xyphophorus maculus*. *Journal of Experimental Biology*, **203**, 171-181.
- Kloas, W., Schrag, B., Ehnes, C. et Segner, H., 2000.**  
Binding od xenobiotics to hepatic estrogen receptor and plasma sex steroid binding protein in the teleost fish, the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *General and Comparative Endocrinology*, **119**, 287-299.
- Köhler, G. et Milstein, C., 1975.**  
Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**, 495-497.
- Kordes, C., Rieber, E. P. et Gutzeit, H. O., 2002.**  
An *in vitro* vitellogenin bioassay for estrogenic substances in the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, **58**, 151-164.
- Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., W., S., Hanf, V. et Hagenmaier, H., 2000.**  
Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*, **40**, 1131-1142.
- Kuch, H. M. et Ballschmiter, K., 2001.**  
Determination of endocrine-disrupting phenolic coumpounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environmental Science and Technology*, **35**, 3201-3206.
- Kuiper, G. G. J. M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. et Gustafsson, J.-A., 1996.**  
Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **93**, 5925-5930.

- Laemmli, U. K., 1970.**  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Laganà, A., Bacaloni, A., De Leva, I., Faberi, A., Fago, G. et Marino, A., 2004.**  
Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Analytical Chimica Acta*, **501**, 79-88.
- Lai, K. M., Scrimshaw, M. D. et Lester, J. N., 2002.**  
Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems. *Science of The Total Environment*, **289**, 159-168.
- Lambropoulou, D. A. et Albanis, T. A., 2001.**  
Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters. *Journal of Chromatography A*, **922**, 243-255.
- Lamoyi, E. et Nisonoff, A., 1983.**  
Preparation of F(ab')<sub>2</sub> fragments from mouse IgG of various subclasses. *Journal of Immunological Methods*, **56**, 235-243.
- Larsson, D. G. L., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, J., Berg, A. H., Olsson, P.-E. et Förlin, L., 1999.**  
Ethinylestradiol - an undesired fish contraceptive ? *Aquatic Toxicology*, **45**, 91-97.
- Latonnelle, K., Fostier, A., Le Menn, F. et Bennetau-Pelissero, C., 2002a.**  
Binding affinities of hepatic nuclear estrogen receptors for phytoestrogens in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). *General and Comparative Endocrinology*, **129** (2), 69-79.
- Latonnelle, K., Le Menn, F. et Bennetau-Pelissero, C., 2000.**  
*In vitro* estrogenic effects of phytoestrogens in Rainbow trout and Siberian sturgeon. *Ecotoxicology*, **9**, 115-125.
- Latonnelle, K., Le Menn, F., Kaushik, S. J. et Bennetau-Pelissero, C., 2002b.**  
Effects of dietary phytoestrogens in vivo and in vitro in rainbow trout and Siberian sturgeon: interests and limits of the in vitro studies of interspecies differences. *General and Comparative Endocrinology*, **126** (1), 39-51.
- Le Gac, F., Thomas, J. L., Mourot, B. et Loir, M., 2001.**  
*In Vivo* and *In vitro* effects of prochloraz and nonylphenol ethoxylates on trout spermatogenesis. *Aquatic Toxicology*, **53**, 187-200.
- Lee, B.-C., Kamata, M., Akatsuka, Y., Takeda, M., Ohno, K., Kamei, T. et Magara, Y., 2004.**  
Effects of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Research*, **38**, 733-739.
- Lim, E. H., Teo, B. Y., Lam, T. J. et Ding, J. L., 2001.**  
Sequence analysis of a fish vitellogenin cDNA with a large phosphotyrosine domain. *Gene*, **277**, 175-186.

- Lindholst, C., Pedersen, K. L. et Pedersen, S. N., 2000.**  
Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **48**, 87-94.
- Lindholst, C., Pedersen, S. N. et Bjerregaard, P., 2001.**  
Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **55**, 75-84.
- Lomax, D. P., Roubal, W. T., Moore, J. D. et Johnson, L. L., 1998.**  
An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for measuring vitellogenin in English sole (*Pleuronectes vetulus*): development, validation and cross-reactivity with other pleuronectids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **121** (4), 425-436.
- Louisy, P., Maitre-Allain, T. et Magnan, D., 1990.**  
Les poissons d'Europe. Editeur Solar, E., Guide Vert, Espagne.
- Madigou, T., Le Goff, P., Salbert, G., Cravedi, J. P., Segner, H., Pakdel, F. et Valotaire, Y., 2001.**  
Effects of nonylphenol on estrogen receptor conformation, transcriptional activity and sexual reversion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **53**, 173-186.
- Madsen, L. L., Korsgaard, B. et Bjerregaard, P., 2002.**  
4-tert-octylphenol and 17 $\beta$ -estradiol applied by feeding to flounder *Platichthys flexus*: induction of vitellogenin and accumulation in tissues. *Marine Environmental Research*, **54**, 729-733.
- Magalhães, I., Laval-Gilly, P., Pihan, J.-C. et Falla, J., 2004a.**  
Optimization of vitellogenin latex agglutination (VTG-LAT), for field determination of male fish contamination by estrogen mimics: Study of adsorption kinetics and agglutination profiles. *Colloids and Surfaces A: Biochemistry and Engineering*, *Soumise*.
- Magalhães, I., Ledrich, M.-L., Pihan, J.-C. et Falla, J., 2004b.**  
One-step, non-denaturing purification method of carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **799** (1), 87-93.
- Magalhães, I., Pihan, J.-C. et Falla, J., 2004c.**  
A latex agglutination test for the field determination of abnormal vitellogenin production in male fishes contaminated by estrogen mimics. *Journal of Physics: Condensed Matter*, **16**, S2167-S2175.
- Maguire, M. A., 1999.**  
Review of the persistence of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in aquatic environments. *Water Quality Research Journal of Canada*, **34** (1), 37-78.
- Mañanós, E., Nuñez, J., Zanuy, S., Carrillo, M. et Le Menn, F., 1994a.**  
Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. II--Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **107** (2), 217-223.

- Mañanós, E., Nuñez Rodríguez, J., Le Menn, F., Zanuy, S. et Carrillo, M., 1997.**  
Identification of vitellogenin receptors in the ovary of a teleost fish, the Mediterranean sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Reproduction and Nutritional Development*, **37**, 51-61.
- Mananos, E., Zanuy, S., Le Menn, F., Carrillo, M. et Nunez, J., 1994.**  
Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I--Induction, purification and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **107** (2), 205-216.
- Mañanós, E., Zanuy, S., Le Menn, F., Carrillo, M. et Nuñez, J., 1994b.**  
Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) vitellogenin. I--Induction, purification and partial characterization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **107** (2), 205-216.
- Martoja, R. et Martoja-Pierson, M., 1967.**  
Initiation aux techniques de l'histologie animale. Editeur C<sup>ie</sup>, M. e., Paris VI<sup>e</sup>, France.
- Marttinen, S. K., Kettunen, R. H., Sormunen, K. M. et Rintala, J. A., 2003.**  
Removal of bis(2-ethylhexyl) phthalate at a sewage treatment plant. *Water Research*, **37**, 1385-1393.
- Marx, A., Sherry, J., Hansen, P.-D. et Hock, B., 2001.**  
A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Chemosphere*, **44**, 393-399.
- Massaad, C., Entezami, F., Massade, L., Benahmed, M., Olivennes, F., Barouki, R. et Hamamah, S., 2002.**  
How can chemical compounds alter human fertility? *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, **100**, 127-137.
- Matsubara, T., Ohkubo, N., Andoh, T., Sullivan, C. V. et Hara, A., 1999.**  
Two forms of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Developmental Biology*, **213**, 18-32.
- Matthiessen, P., Allen, Y., Bamber, S., Craft, J., Hurst, M., Hutchinson, T., Feist, S., Katsiadaki, I., Kirby, M., Robinson, C., Scott, S., Thain, J. et Thomas, K., 2002.**  
The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom - summary of the EDMAR programme. *Marine Environmental Research*, **54**, 645-649.
- Mazur, W. M., Buke, J. A., Wähälä, K., Rasku, S. et Adlercreutz, H., 1998.**  
Isoflavones and lignans in legumes : nutritional and health aspects in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, **9**, 193-200.
- Melchior, F., 1998.**  
Obtention et production d'anticorps monoclonaux pour la détection directe d'*Alcaligenes eutrophus* CH34. Thèse de Doctorat. Université de Metz, Metz, 162 Pages.
- Melchior, F., Ledrich, M.-L., Foucaud, L. et Falla, J., 2001.**  
Rapid identification of *Rastolnia eutropha* strain CH34 using monoclonal antibodies. *Hybridoma and hybridomics*, **20** (5), 325-331.



**Mhiri, C. et Tandeau de Marsac, N., 1997.**

Réhabilitation par les microorganismes de sites contenant du pyralène : problématique et perspectives d'étude. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, **95**, 3-28.

**Mills, L. J., Gutjahr-Gobelle, R. E., Haebler, R. A., Borsay Horowitz, D. J., Jayaraman, S., Pruell, R. J., McKinney, R. A., Gardner, G. R. et Zaroogian, G. E., 2001.**

Effects of estrogenic (*o,p'*-DDT; octylphenol) and anti-androgenic (*p,p'*-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenil male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology*, **52**, 157-176.

**Molina-Bolívar, J. A., 1999.**

Mecanismo de estabilidad coloidal : Teoría y aplicación a immunoensayos. Thèse de Doctorat. Université de Grenade, Grenade, Espagne, 419 Pages.

**Molina-Bolívar, J. A. et Galisteo-González, F., 2003.**

Latex Immunoagglutination assays, **Chap. 18**, *Colloidal Biomolecules, Biomaterials, and Biomedical Applications*. Elaïssari, A., editeur. Mercel Dekker INC, USA, 491-539 Pages.

**Molina-Bolívar, J. A., Galisteo-González, F. et Hidalgo-Álvarez, R., 1998a.**

Particle enhanced immunoassays stabilized by hydration forces: a comparative study between IgG and F(ab')<sub>2</sub> immunoreactivity. *Journal of Immunological Methods*, **211**, 87-95.

**Molina-Bolívar, J. A., Galisteo-González, F. et Hidalgo-Álvarez, R., 1998b.**

Latex immunoassays: Comparative studies on covalent and physical immobilization of antibodies. I. F(ab')<sub>2</sub> fragments. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **9**, 1089-1101.

**Molina-Bolívar, J. A., Galisteo-González, F. et Hidalgo-Álvarez, R., 1998c.**

Latex immunoassays: Comparative studies on covalent and physical immobilization of antibodies. II. IgG. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **9**, 1103-1113.

**Moncaut, N., Lo Nostro, F. et Maggese, M. C., 2003.**

Vitellogenin detection in surface mucus of the South American cichlid fish *Cichlasoma dimerus* (Heckel, 1840) induced by estradiol-17β. Effects on liver and gonads. *Aquatic Toxicology*, **63**, 127-137.

**Mormede, S. et Davies, I. M., 2003.**

Horizontal and vertical distribution of organics contaminants in deep-sea fish specie. *Chemosphere*, **50**, 563-574.

**Mosselman, S., Polman, J. et Dijkema, R., 1996.**

ERβ: Identification and characterization of a novel human receptor. *FEBS Letters*, **392**, 49-53.

**Muir, D., Savinova, T., Savinova, V., Alexeeva, L., Potelov, V. et Svetochev, V., 2003.**

Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals fishes and invertebrates from White Sea, Russia. *Science of The Total Environment*, **306**, 111-131.

- Mylchreest, E., Snajdr, S., Korte, J. J. et Ankley, G. T., 2003.**  
Comparison of ELISAs for detecting vitellogenin in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Molecular & Integrative Physiology*, **134**, 251-257.
- Nakari, T. et Erkomaa, K., 2003.**  
Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in multigeneration. *Environmental Pollution*, **123**, 267-273.
- Nath, P. et Maitra, S., 2001.**  
Role of two plasma vitellogenins from indian major carp (*Cirrhinus mrigala*) in catfish (*Clarias batrachus*) vitellogenesis. *General and Comparative Endocrinology*, **124**, 30-44.
- Nilsen, B. M., Berg, K., Arukwe, A. et Goksoyr, A., 1998.**  
Monoclonal and polyclonal antibodies against fish vitellogenin for use in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, **46** (1-5), 153-157.
- Nishi, K., Chikae, M., Hatano, Y., Mizukami, H., Yamashita, M., Sakakibara, R. et Tamiya, E., 2002.**  
Development and application of a monoclonal antibody-based sandwich ELISA for quantification of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, **132**, 161-169.
- Ohkubo, N., Mochida, K., Adachi, S., Hara, A., Hotta, K., Nakamura, M. et Matsubara, T., 2003.**  
Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *General and Comparative Endocrinology*, **131**, 353-364.
- Ohlson, C.-G. et Hardell, L., 2000.**  
Testicular cancer and occupational exposures with a faocus on xenoestrogens in polyvinyl plastics. *Chemosphere*, **40**, 1277-1282.
- Okoumassoun, L.-E., Brochu, C., Deblois, C., Akponan, S., Marion, M., Averill-Bates, D. et Denizeau, F., 2002.**  
Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. *Science of The Total Environment*, **299**, 163-172.
- Olopoenia, L. A. et King, A. L., 2000.**  
Widal agglutination test - 100 years later: still plagued by controversy. *Postgraduate Medicine Journal*, **76**, 80-84.
- Ortega-Vinuesa, J. L. et Bastos-González, D., 2001.**  
A review of factors affecting the performances of latex agglutination tests. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, **12** (4), 379-408.
- Ortega-Vinuesa, J. L., Hidalgo-Álvarez, R., de las Nieves, F. J., Davey, C. L., Newman, D. J. et Price, C. P., 1998.**  
Charaterization of immunoglobulin G bound to latex particles using surface plasmon resonance and electrophoretic mobility. *Journal of Colloids and Interface Science*, **204**, 300-311.

- Ortega-Vinuesa, J. L., Molina-Bolívar, J. A. et Hidalgo-Álvarez, R., 1996.**  
Particle enhanced immunoaggregation of F(ab')<sub>2</sub> molecules. *Journal of Immunological Methods*, **190**, 29.
- Ososki, A. L. et Kennelly, E. J., 2003.**  
Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytotherapy Research*, **17**, 845-869.
- Ota, M., Saito, T., Yoshizaki, G. et Otsuki, A., 2000.**  
Vitellogenin-like gene expression in liver of male zebrafish (*Danio rerio*) by 1 µM 3-Methylcholanthrene treatment: the possibility of rapid and sensitivity *in vivo* bioassay. *Water Research*, **34** (8), 2400-2403.
- Öztürk, A., Artan, T. et Ayar, A., 2004.**  
Biosorption of nickel (II) and copper (II) ions from aqueous solution by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **34**, 105-111.
- Pakdel, F., Féon, S., Le Gac, F., Le Menn, F. et Valotaire, Y., 1991.**  
*In vivo* estrogen induction of hepatic estrogen receptor mRNA and correlation with vitellogenin mRNA in rainbow trout. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **75**, 205-212.
- Panter, G. H., Thompson, R. S., Beresford, N. et Sumpter, J. P., 1999.**  
Transformation of a non-oestrogenic steroid metabolite to an oestrogenically active substance by minimal bacterial activity. *Chemosphere*, **38** (15), 3579-3596.
- Patyna, P. et Cooper, K. R., 2000.**  
Multigeneration reproductive effects of three phthalate esters in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Environmental Research*, **50**, 191-199.
- Pawlowski, S., Ternes, T. A., Bonerz, M., Rastall, A. C., Erdinger, L. et Braunbeck, T., 2004a.**  
Estrogenicity of solid phase-extracted water samples from two municipal sewage plant effluents and river Rhine water using the yeast estrogen screen. *Toxicology in Vitro*, **18**, 12-18.
- Pawlowski, S., Van Aerle, R., Tyler, C. R. et Braunbeck, T., 2004b.**  
Effects of 17α-ethinylestradiol in fathead minnow (*Pimephales promelas*) gonadonal recrudescence assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **In press**.
- Peakell, D. W., 1994.**  
Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News*, **1**, 55-60.
- Pedersen, K. H., Pedersen, N. S., Pedersen, K. L., Korsgaard, B. et Bjerregaard, P., 2003.**  
Estrogenic effect of dietary 4-tert-octylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **62**, 295-303.
- Perez-Amodio, S., Holownia, P., Davey, C. L. et Price, C. P., 2001.**  
Effects of the ionic environment, charge, and particle surface chemistry for enhancing a latex homogeneous immunoassay of C-reactive protein. *Analytical Chemistry*, **73**, 3417-3425.

- Peterson, E. W., Davis, R. K. et Orndorff, H. A., 2001.**  
17- $\beta$  estradiol as an indicator of animal waste contamination in mantled karst aquifers. *Journal of Environmental Quality*, **29**, 826-834.
- Prat, J. P., Lamy, J. N. et Weill, J. D., 1969.**  
Coloration des lipoprotéines après électrophorèses en gel de polyacrylamide. *Bulletin de la Société de Chimie et de Biologie*, **51** (9), 1.
- Quesada, M., Puig, J., Delgado, J. M., Peula, J. M., Molina, J. A. et Hidalgo-Álvarez, R., 1997.**  
A simple kinetic model of antigen-antibody reactions in particle-enhanced light scattering immunoassays. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **8**, 303-309.
- Radice, S., Ferraris, M., Marabini, L. et Chiesara, E., 2002.**  
Estrogenic activity of procymidone in primary cultured rainbow trout hepatocytes (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology in Vitro*, **16**, 475-480.
- Ramadass, P., Samuel, B. et Nachimuthu, K., 1999.**  
A rapid latex agglutination test for detection of leptospiral antibodies. *Veterinary Microbiology*, **70**, 137-140.
- Reber, G., Bounameaux, H., Perrier, A. et De Moerloose, P., 2001.**  
Performances of a new, automated latex assay for the exclusion of venous thromboembolism. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, **12**, 217-220.
- Reis-Henriques, M. A., Ferreira, M., Silva, L. et Dias, A., 2000.**  
Evidence for an involvement of vitellogenin in the steroidogenic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) vitellogenic oocytes. *General and Comparative Endocrinology*, **117**, 260-267.
- Roitt, I., Brostoff, J. et Male, D., 1997.**  
Immunologie. Editeur De Boeck, 4<sup>ème</sup> édition, Larcier, Paris, France.
- Rollerová, E. et Urbanciková, M., 1999.**  
Estrogenic potential of environmental compound. *Biologia*, **54**, 625-634.
- Roubal, W. T., Lomax, D. P., Willis, M. L. et Johnson, L. L., 1997.**  
Purification and Partial Characterization of English Sole (*Pleuronectes vetulus*) Vitellogenin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **118** (3), 613-622.
- Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M. et Sumpter, J. P., 1998.**  
Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*, **32**, 1559-1565.
- Safe, S. H., 2000.**  
Endocrine disruptors and human health-Is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives*, **108** (6), 487-493.

- Safe, S. H. et Gaido, K., 1998.**  
Phytoestrogens and anthropogenic estrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17** (1), 119-126.
- Salama, A., Schwind, P., Schönhage, K., Genth, R., Cotting, C., Hustinx, H., Krieg, R., Nydegger, U. et Aebischer, I., 2001.**  
Rapid detection of antibodies to immunoglobulin A molecules by using the particle gel immunoassay. *Vox Sanguinis*, **81**, 45-48.
- Sapozhnikova, Y., Bawardi, O. et Schlenk, D., 2004.**  
Pesticides and PCBs in sediments and fish from the Salton Sea, California, USA. *Chemosphere*, **55**, 797-809.
- Schmieder, P., Tapper, M., Linnun, A., Denny, J., Kolanczyk, R. et Johnson, R., 2000.**  
Optimization of a precison-cut trout liver tissue slice assay as a screen for vitellogenin induction: comparison of slice incubation techniques. *Aquatic Toxicology*, **49**, 251-268.
- Schnaak, W., Küchler, T., Kujawa, M., Henschel, K.-P., Süßenback, D. et Donau, R., 1997.**  
Organic contaminants in sewage sludge and their ecotoxicological significance in the agricultural utilization of sewage sludge. *Chemosphere*, **35** (1/2), 5-11.
- Schwaiger, J., Mallow, U., Ferling, H., Knoerr, S., Braunbeck, T., Kalbfus, W. et Negele, R. D., 2002.**  
How estrogenic is nonylphenol ? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquatic Toxicology*, **59**, 177-189.
- Schwaiger, J. et Negele, R. D., 1998.**  
Plasma vitellogenin - A blood parameter to evaluate exposure of fish to xenoestrogens. *Acta Veterinaria*, **67**, 257-264.
- Schwaiger, J., Spieser, O. H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W. et Negele, R. D., 2000.**  
Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Toxicology*, **51**, 69-78.
- Serra, J., Puig, J., Martín, J., Galisteo, F., Gálvez, M. J. et Hidalgo-Álvarez, R., 1992.**  
On the adsorption of IgG onto polystyrene particles: electrophoretic mobility and critical coagulation concentration. *Colloid and Polymer Science*, **270**, 574-583.
- Shemesh, M. et Shore, L. S., 1994.**  
Effect of hormones in the environment on reproduction in cattle. Sand, R. S., editeur. FL: CRC Press, Boca Raton 287-297 Pages.
- Sherry, J., Gamble, A., Fielden, M., Hodson, P., Burnison, B. et Solomon, K., 1999.**  
An ELISA for brown trout (*Salmo trutta*) vitellogenin and its use in bioassays for environmental estrogens. *Science of The Total Environment*, **225** (1-2), 13-31.
- Shi, G., Shao, J., Wang, Q., Lu, Y., Liu, J. et Liu, J., 2003.**  
Membrane chromatographic method for the rapid purification of vitellogenin from fish plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **785**, 361-368.

- Shore, L. S., Correll, D. L. et Chakraborty, P. K., 1995.**  
Relationship of fertilization with chick manure and concentrations of estrogens in small streams, *Animal waste and the land-water interface*. Steel, K., éditeur. FL: CRC Press, Boca Raton. 155-162 Pages.
- Shore, L. S., Shemesh, M. et Cohen, R., 1998.**  
The role of œstradiol and œstrone in chicken manure silage in hyperœstrogen in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 65-67.
- Silva, M. J., Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., Malek, N. A., Hodge, C. C., Hurtz III, D., Calafat, A. M., Needham, L. L. et W., B. J., 2003.**  
Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Archives of Toxicology*, 77, 561-567.
- Silva, M. J., Slakman, A. R., Reidy, J. A., Preau, J. L., Herbert, A. R., Samandar, E., Needham, L. L. et Calafat, A. M., 2004.**  
Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 805, 161-167.
- Simpson, M. G., Parry, M., Kleinkauf, A., Swarbreck, D., Walker, P. et Leah, R. T., 2000.**  
Pathology of the liver, kidney, and gonad of flounder (*Platichthys flexus*) from a UK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research*, 50, 283-287.
- Singh, P. B. et Canario, A. V. M., 2004.**  
Reproductive endocrine disruption in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*, in response to the pesticide g-hexachlorocyclohexane. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58, 77-83.
- Smith, A. G. et Gangolli, S. D., 2002.**  
Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 767-779.
- Smith, T., 1993.**  
Purification of mouse antibodies and Fab fragments. *Methods in Cell Biology*, 37, 75-93.
- Solé, M., Porte, D. et Barcelo, D., 2000.**  
Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38, 494-500.
- Solé, M., Raldúa, D., Piferrer, F., Barceló, D. et Porte, C., 2003.**  
Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 136, 145-156.
- Sonnenschein, C. et Soto, A. M., 1998.**  
An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65 (1-6), 143-150.

- Soto, A. M., Chung, K. L. et Sonnenschein, C., 1994.**  
The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environmental Health Perspectives*, **102** (4), 380-383.
- Soto, A. M., Sonnenschein, C., Chung, K. L., Fernandez, M. F., Olea, N. et Serrano, F. O., 1995.**  
The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, **103 Suppl 7**, 113-122.
- Specker, J. L. et Chandlee, M. K., 2003.**  
Methodology for estradiol treatment in marine larval and juvenile fish: uptake and clearance in summer flounder. *Aquaculture*, **217**, 663-672.
- Sultan, C., Balaguer, P., Terouanne, B., Georget, V., Paris, F., Jeandel, C., Lumbroso, S. et Nicolas, J., 2001.**  
Environmental xenoestrogens, antiandrogens and disorders of male sexual differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **178** (1-2), 99-105.
- Tao, Y., Hara, A., Hodson, R. G., Curry Woods, L. et Sullivan, C. V., 1993.**  
Purification, characterization and immunoassay of striped bass (*Morone saxatilis*) vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry*, **12** (1), 31-46.
- Tchoudakova, A., Pathak, S. et Callard, G. V., 1999.**  
Molecular cloning of an estrogen receptor  $\beta$  subtype from goldfish, *Carassius auratus*. *General and Comparative Endocrinology*, **113**, 388-400.
- Ternes, T. A., Krechel, P. et Mueller, J., 1999a.**  
Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Science of The Total Environment*, **225**, 91-99.
- Ternes, T. A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D. et Servos, M., 1999b.**  
Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigation in Germany, Canada, and Brazil. *Science of The Total Environment*, **225**, 81-90.
- Thomas, N. E., Sobanski, M. A. et Coakley, W. T., 1999.**  
Ultrasonic enhancement of coated particle agglutination immunoassays: influence of particle density and compressibility. *Ultrasound in Medicine and Biology*, **25** (3), 443-450.
- Tilton, F., Benson, W. H. et Schlenk, D., 2002.**  
Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. *Aquatic Toxicology*, **61**, 211-224.
- Todorov, J. R., Elskus, A. A., Schlenk, D., Ferguson, P. L., Brownawell, B. J. et Mc Elroy, A. E., 2002.**  
Estrogenic responses of larval sunshine bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) exposed to New York city sewage effluent. *Marine Environmental Research*, **54**, 691-695.

- Tollesfen, K.-E., Mathisen, R. et Stenersen, J., 2002.**  
Estrogen mimics bind with similar affinity and specificity to the hepatic estrogen receptor in Atlantic Salmon (*Salmo salar*) and Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, **126**, 14-22.
- Tremblay, G. B., Tremblay, A., Copeland, N., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Labrie, F. et Giguere, V., 1997.**  
Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor  $\beta$ . *Molecular Endocrinology*, **11**, 353-365.
- Tyler, C. R. et Sumpter, J. P., 1990a.**  
The purification and partial characterization of carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry*, **8** (2), 111-120.
- Tyler, C. R. et Sumpter, J. P., 1990b.**  
The development of radioimmunoassay for carp, *Cyprinus carpio*, vitellogenin. *Fish Physiology and Biochemistry*, **8** (2), 129-140.
- Tyler, C. R. et Sumpter, J. P., 1996.**  
Oocyte growth and development in teleosts. *Fish biology and fisheries*, **6**, 287-318.
- Tyler, C. R., Van Aerle, R., Hutchinson, T. H. et Maddix, S., 1999.**  
An *in vivo* testing system for endocrine disruptors in fish early life stages using induction of vitellogenin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8** (2), 337-347.
- Tyler, C. R., Van der Eerden, B., Jobling, S., Panter, G. et Sumpter, J. P., 1996.**  
Measurement of vitellogenin, a biomarker for exposure to oestrogenic chemicals, in a wide variety of cyprinid fish. *Journal of Comparative Physiology B*, **166**, 418-426.
- Van der Belt, K., Verheyen, R. et Witters, H., 2003.**  
Effects of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*) : effects on growth, gonads and female reproductive success. *Science of The Total Environment*, **309**, 127-137.
- Van der Oost, R., Beyer, J. et Vermeulen, N. P. E., 2003.**  
Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **13**, 57-149.
- Vander, A. J., Sherman, J. H., Luciano, D. S. et Brière, R., 1995.**  
La reproduction, **Chap. 19**, 621-670 in *Physiologie Humaine*. La Chenélière et McGraw-Hill, éditeurs. Montréal, Canada, 814 Pages.
- Verweij, F., Booij, K., Satumalay, K., Van der Monlen, N. et Van der Oost, R., 2004.**  
Assessment bioavailable PAH, PCB and OCP concentrations in water, using semipermeable membrane devices (SPMDs), sediments and caged carp . *Chemosphere*, **54**, 1675-1689.
- Vethaak, A. D., Lahr, J., Kuiper, R. V., Grinwis, G. C. M., Rankouhi, T. R., Giesy, J. P. et Gerritsen, A., 2002.**  
Estrogenic effects in fish in The Netherlands: some preliminary results. *Toxicology*, **181-182**, 147-150.



- Villeneuve, D. L., Villalobos, S. A., Keith, T. L., Snyder, E. M., Fitzgerald, S. D. et Giesy, J. P., 2002.**  
Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenine concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, **47**, 15-28.
- Vitali, M., Guidotti, M., Macilenti, G. et Cremisimi, C., 1997.**  
Phthalate esters in freshwater as markers of contamination sources-A site study in Italy. *Environmental International*, **23** (3), 337-347.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Maervoet, J., De Meester, I. et Schepens, P., 2004.**  
Levels and profiles of PCBs and OCPs in marine benthic species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary. *Marine Pollution Bulletin*, **In press**.
- Wahl, H. G., Hoffman, A., Häring, H.-U. et Liebich, H. M., 1999.**  
Identification of plastizers in medical products by a combined direct thermodesorption-cooled injection system and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **847**, 1-7.
- Walter, P., Green, S., Green, G., Krust, A., Bornert, J.-M., Jeltsch, J.-M., Staub, A., Jensen, E., Scrace, G., Waterfield, M. et Chambon, P., 1985.**  
Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **82**, 7889-7893.
- Wang, C., Wang, Y., Kiefer, F., Yediler, A., Wang, Z. et Kettup, A., 2003.**  
Ecotoxicological and chemical characterization of selected treatment process effluents of municipal sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**, 211-217.
- Wang, J., Liu, P., Shi, H. et Qian, Y., 1997.**  
Kinetics of phthalic acid ester degradation by acclimated activated sludge. *Process Biochemistry*, **32** (7), 567-571.
- Wang, J., Xuan, Z. et Weigzhong, W., 2004.**  
Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated sludge. *Process Biochemistry*, **In press**.
- Webb, S., Ternes, T. A., Gibert, M. et Olejniczak, K., 2003.**  
Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicology letters*, **142**, 157-167.
- Werner, I., Geist, J., Okihiro, M., Rosenkranz, P. et Hinton, D. E., 2002.**  
Effects of dietary exposure to the pyrethroid pesticide esfenvalerate on medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Environmental Research*, **54**, 609-614.
- Williams, R. J., Johnson, A. C., Smith, J. J. L. et Kanda, R., 2003.**  
Steroid Estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works discharges. *Environmental Science and Technology*, **37** (9), 1744-1750.
- Williams, R. J., Jürgens, M. D. et Johnson, A. C., 1999.**  
Initial prediction of the concentrations and distribution of 17 $\beta$ - $\alpha$ estradiol,  $\alpha$ estrone and ethinyl $\alpha$ estradiol in 3 english rivers. *Water Research*, **33** (7), 1663-1671.

- Xia, Z., Patino, R., Gale, W. L., Maule, A. G. et Densmore, L. D., 1999.**  
Cloning, *in vitro* expression, and novel phylogenetic classification of channel catfish estrogen receptor. *General and Comparative Endocrinology*, **113**, 360-368.
- Yamaguchi, N., Gazzard, D., Scholey, G. et MacDonald, D. W., 2003.**  
Concentrations and hazard assessment of PCBs, organochlorine pesticides and mercury in fish species from the upper Thames: River pollution and its potential effects on top predators. *Chemosphere*, **50**, 265-273.
- Yaron, Z., 1995.**  
Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, **129**, 49-73.
- Yeo, I.-K. et Mugiya, Y., 1997.**  
Effects of extracellular calcium concentrations and calcium antagonists on vitellogenin induction by estradiol-17 $\beta$  in primary hepatocyte culture in the Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, **105**, 294-301.
- Yilmaz, M., Gül, A. et Erbasli, K., 2004.**  
Acute toxicity of alpha-cypermethrin to guppy (*Poecilia reticula*, Pallas, 1859). *Chemosphere*, **56**, 381-385.
- Ying, G.-G., Kookana, R. S. et Ru, Y.-J., 2002.**  
Occurrence and fate of hormone steroids in the environment (Review article). *Environmental International*, **28**, 545-551.
- Zaroogian, G. E., Gardner, G. R., Borsay Horowitz, D. J., Gutjahr-Gobell, R. E., Haebler, R. et Mills, L. J., 2001.**  
Effect of 17 $\beta$ -estradiol, *o,p'*-DDT, octylphenol and *p,p'*-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology*, **54**.
- Zhang, J., Khan, I. A. et Foran, C. M., 2002.**  
Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, **132**, 203-211.

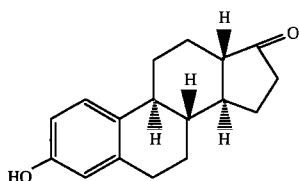
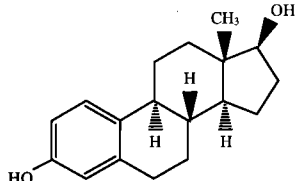
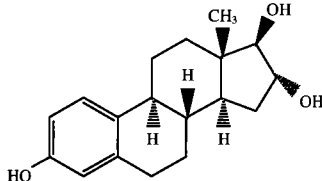
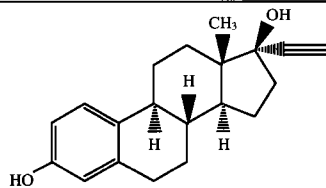
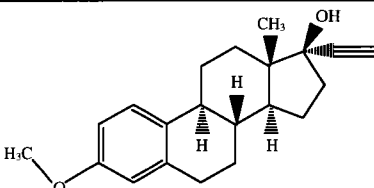
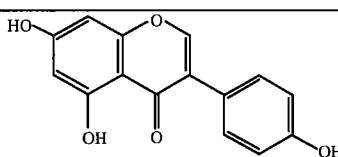
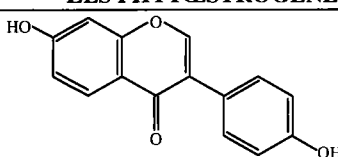
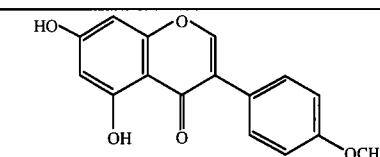
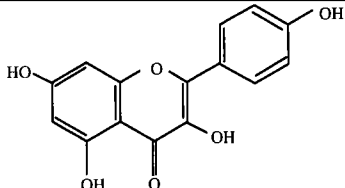
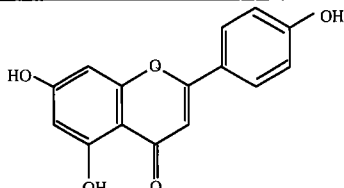
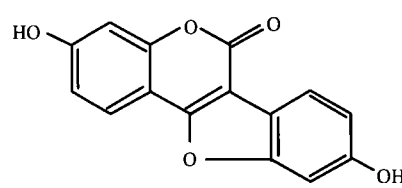
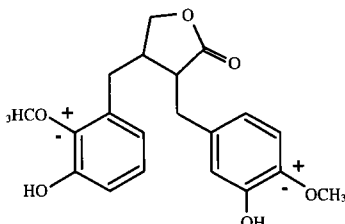
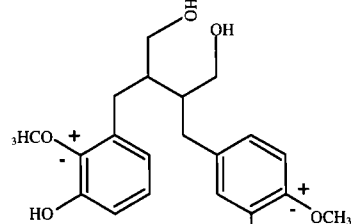
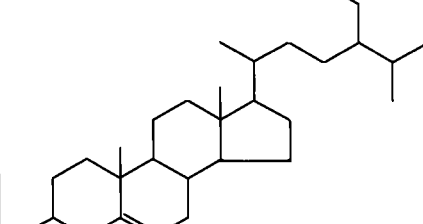
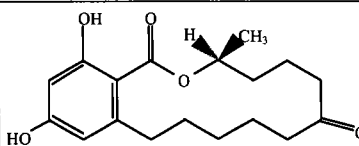
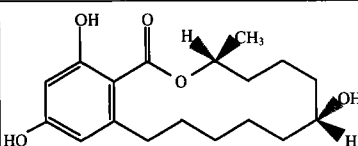
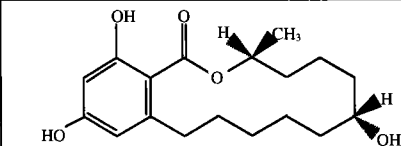




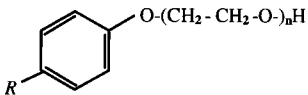
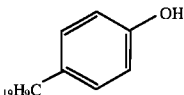
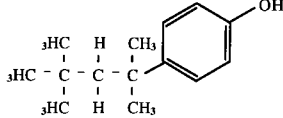
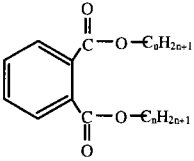
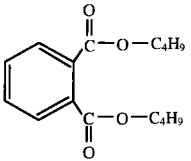
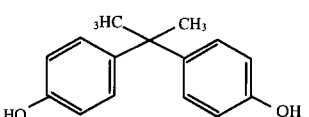
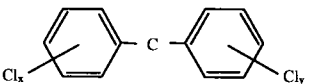
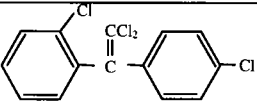
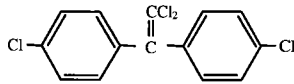
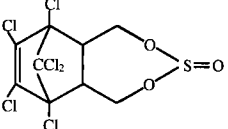
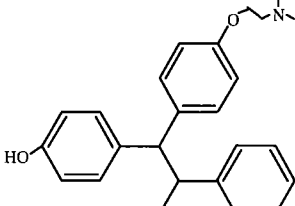
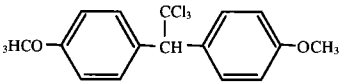
# *Annexes*



# **Annexes 1. : Différentes structures chimiques des œstrogènes mimétiques : Les stéroïdes.**

| LES ŒSTROGENES HUMAINS ET ANIMAUX                                                   |                                                                                     |                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
|    |    |    |
| Œstrone (E1)                                                                        |                                                                                     |                                                                                      |
| 17β-œstradiol (E2)                                                                  |                                                                                     |                                                                                      |
| Œstriol (E3)                                                                        |                                                                                     |                                                                                      |
| LES ŒSTROGENES DE SYNTHESE                                                          |                                                                                     |                                                                                      |
|    |   |                                                                                      |
| 17α-éthynylœstradiol (EE2)                                                          |                                                                                     |                                                                                      |
| Mestranol (MeEE2)                                                                   |                                                                                     |                                                                                      |
| LES PHYTŒSTROGENES                                                                  |                                                                                     |                                                                                      |
|   |   |   |
| Génistéine (GEN)                                                                    |                                                                                     |                                                                                      |
| Daidzéine (DAID)                                                                    |                                                                                     |                                                                                      |
| Biochanine-A (BIOA-A)                                                               |                                                                                     |                                                                                      |
|  |  |  |
| Kaempferol                                                                          |                                                                                     |                                                                                      |
| Naringénine                                                                         |                                                                                     |                                                                                      |
| Coumestrol (COU)                                                                    |                                                                                     |                                                                                      |
|  |  |  |
| Matairesinol (+)<br>Entérolactone (-)                                               |                                                                                     |                                                                                      |
| Secoisolariciresinol (+)<br>Entérodiol (-)                                          |                                                                                     |                                                                                      |
| β-sitostérol                                                                        |                                                                                     |                                                                                      |
| LES MYCŒSTROGENES                                                                   |                                                                                     |                                                                                      |
|  |  |  |
| Zéaralénone (ZON)                                                                   |                                                                                     |                                                                                      |
| α-Zéaralénol (α-Z)                                                                  |                                                                                     |                                                                                      |
| β-Zéaralénol (β-Z)                                                                  |                                                                                     |                                                                                      |

**Annexes 1. (suite) : Différentes structures chimiques des œstrogènes mimétiques : Les substances d'origine industrielle**

| LES ALKYLPHENOLS                                                                                                          |                                                                                                                      |                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p>alkylphénols<br/>polyéthoxylates</p> |  <p>4-nonylphénol (4-NP)</p>        |  <p>4-<i>tert</i>-octylphénol (4<i>t</i>-OP)</p> |
| LES PHTALATES et LE BISPHENOL A                                                                                           |                                                                                                                      |                                                                                                                                     |
|  <p>Phtalates (PAEs)</p>                |  <p>Dibutylphthalate (DBP)</p>     |  <p>Bisphénol A (BPA)</p>                        |
| LES PCBs et leurs métabolites                                                                                             |                                                                                                                      |                                                                                                                                     |
|  <p>PCBs</p>                           |  <p><i>o,p'</i>-DDE (DDT)</p>     |  <p><i>p,p'</i>-DDE (DDE)</p>                   |
| LES PESTICIDES                                                                                                            |                                                                                                                      |                                                                                                                                     |
|  <p>Méthoxychlore (MC)</p>             |  <p>4-hydroxytamoxifene (TAM)</p> |  <p>Endosulfane (ES)</p>                        |



**Annexe 2. : Concentrations d'œstrone (en ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEPs et dans diverses eaux de surface.**

| Composés | Effluent brut         | Effluent Traité        | % d'élimination    | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est.    | Nb de sites : STEPs \ a               | Pays       | Années    | Références                        |
|----------|-----------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------|-----------|-----------------------------------|
| E1       | -                     | 1-76 <sup>b</sup>      | -                  | -                                 | 7 <sup>d</sup>                        | Angleterre | 1996      | (Routledge <i>et al.</i> , 1998)  |
|          | 11-140 <sup>b</sup>   | <0,4-47 <sup>b</sup>   | 64-98 <sup>c</sup> | -                                 | 3 <sup>d,h</sup>                      | Allemagne  | 1997      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)    |
|          | -                     | n.d.-70 <sup>b</sup>   | -                  | n.d.-1,6 <sup>b</sup>             | 16 <sup>d</sup> / 15 <sup>e</sup>     | Allemagne  | 1997      | (Ternes <i>et al.</i> , 1999b)    |
|          | 40                    | 7-13 <sup>c</sup>      | 67-83 <sup>c</sup> | -                                 | 1 <sup>h</sup>                        | Brésil     |           |                                   |
|          | -                     | n.d.-48 <sup>b</sup>   | -                  | -                                 | 10 <sup>d</sup>                       | Canada     |           |                                   |
|          | -                     | 0,4-47 <sup>b</sup>    | -                  | <0,1-3,4 <sup>b</sup>             | 3 <sup>d,h</sup> / 11 <sup>e,h</sup>  | Pays-Bas   | 1997      | (Belfroid <i>et al.</i> , 1999)   |
|          | -                     | 5,8                    | -                  | -                                 | 1                                     | Suisse     | 1997      | (Larsson <i>et al.</i> , 1999)    |
|          | -                     | -                      | -                  | n.d.-7,1 <sup>b</sup>             | 7 <sup>e,h</sup>                      | Angleterre | 1998      | (Fawell <i>et al.</i> , 2001)     |
|          | <0,5-75 <sup>b</sup>  | n.d.-54 <sup>b</sup>   | -                  | -                                 | 5 <sup>d,h</sup>                      | Italie     | 1999      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)    |
|          | -                     | <0,4-12,2 <sup>b</sup> | -                  | n.d.-1,8 ▶ 0,4-2,5 <sup>b,f</sup> | 3 <sup>d</sup> / 21 <sup>e,f,h</sup>  | Angleterre | 2000      | (Williams <i>et al.</i> , 2003)   |
|          | -                     | n.d.                   | -                  | -                                 | 5 <sup>d,h</sup>                      | USA        | 2000      | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)    |
|          | -                     | 3,1-7,4 <sup>b</sup>   | -                  | -                                 | 3 <sup>d</sup>                        | USA        | 2000      | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)    |
|          | -                     | 1,2-19 <sup>b</sup>    | -                  | < 1                               | 2 <sup>d,h</sup> / 1 <sup>h</sup>     | Allemagne  | 2000/2001 | (Pawlowski <i>et al.</i> , 2004a) |
|          | 9,6-17,6 <sup>b</sup> | 4,3-7,2 <sup>b</sup>   | 44-59 <sup>c</sup> | 1,1-1,4 ▶ 2,2-3 <sup>b,f</sup>    | 4 <sup>d,h</sup> / 6 <sup>f,g,h</sup> | France     | 2001/2002 | (Cargouët <i>et al.</i> , 2004)   |
|          | 15-60 <sup>b</sup>    | 5-30 <sup>b</sup>      | 54 <sup>c</sup>    | 5-12 <sup>b</sup>                 | 1 <sup>h</sup> / 1 <sup>h</sup>       | Italie     | 2002      | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)     |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEPs

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP ( ▶ )

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un Fl / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année

**Annexe 3 : Concentrations en 17 -œstradiol (en ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEP s et dans diverses eaux de surface.**

| Composé | Effluent brut          | Effluent Traité        | % d'élimination      | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est.  | Nb de sites : STEP s \ a                    | Pays       | Années    | Références                        |
|---------|------------------------|------------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------------------------|------------|-----------|-----------------------------------|
| E2      | -                      | 4-48 <sup>b</sup>      | -                    | -                               | 7 <sup>d</sup>                              | Angleterre | 1996      | (Routledge <i>et al.</i> , 1998)  |
|         | n.d.-48 <sup>b</sup>   | n.d.-12 <sup>b</sup>   | 75-98 <sup>c</sup>   | -                               | 3 <sup>d, h</sup>                           | Allemagne  | 1997      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)    |
|         | -                      | n.d.-3 <sup>b</sup>    | 64 <sup>c</sup>      | n.d.                            | 16 <sup>d</sup> / 15 <sup>e</sup>           | Allemagne  |           |                                   |
|         | 21                     | 0-2 <sup>c</sup>       | 92-99,9 <sup>c</sup> | -                               | 1 <sup>h</sup>                              | Brésil     | 1997      | (Ternes <i>et al.</i> , 1999b)    |
|         | -                      | n.d.-64 <sup>b</sup>   | -                    | -                               | 10 <sup>d</sup>                             | Canada     |           |                                   |
|         | -                      | <0,6-12 <sup>b</sup>   | -                    | <0,3-5,5 <sup>b</sup>           | 3 <sup>d, h</sup> / 11 <sup>e, h</sup>      | Pays-Bas   | 1997      | (Belfroid <i>et al.</i> , 1999)   |
|         | -                      | 1,1 <sup>b</sup>       | -                    | -                               | 1                                           | Suisse     | 1997      | (Larsson <i>et al.</i> , 1999)    |
|         | -                      | -                      | -                    | n.d.-25 <sup>b</sup>            | 7 <sup>e, h</sup>                           | Angleterre | 1998      | (Fawell <i>et al.</i> , 2001)     |
|         | 13,6-24 <sup>c</sup>   | 2,7-12 <sup>b</sup>    | 33-81 <sup>c</sup>   | -                               | 6 <sup>d</sup>                              | Angleterre | 1998      | (Johnson <i>et al.</i> , 1999)    |
|         | -                      | 2,8-55 <sup>b</sup>    | -                    | n.d.-27 <sup>b</sup>            | 10 <sup>d, i</sup> / 109 <sup>e, g, i</sup> | Japon      | 1998      | (Kashiwada <i>et al.</i> , 2002)  |
|         | <0,5-20 <sup>b</sup>   | n.d.-7 <sup>b</sup>    | -                    | -                               | 5 <sup>d, h</sup>                           | Italie     | 1999      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)    |
|         | -                      | <0,4-4,3 <sup>b</sup>  | -                    | -                               | 3 <sup>d</sup>                              | Angleterre | 2000      | (Williams <i>et al.</i> , 2003)   |
|         | -                      | n.d.                   | -                    | -                               | 9 <sup>d, h</sup>                           | USA        | 2000      | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)    |
|         | -                      | 1,39-5,78 <sup>b</sup> | -                    | -                               | 3 <sup>d</sup>                              | USA        | 2000      | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)    |
|         | -                      | 1-5,6 <sup>b</sup>     | -                    | 3,9                             | 2 <sup>d, h</sup> / 1 <sup>h</sup>          | Allemagne  | 2001      | (Pawlowski <i>et al.</i> , 2004a) |
|         | 11,1-17,1 <sup>b</sup> | 4,5-8,6 <sup>b</sup>   | 49-60 <sup>c</sup>   | 1,4-2,1 ▶ 3-3,2 <sup>b, f</sup> | 4 <sup>d, h</sup> / 6 <sup>g, f, h</sup>    | France     | 2001/2002 | (Cargouët <i>et al.</i> , 2004)   |
|         | 10-31 <sup>b</sup>     | 3-8 <sup>b</sup>       | 76 <sup>c</sup>      | 2-6 <sup>b</sup>                | 1 <sup>h</sup> / 1 <sup>h</sup>             | Italie     | 2002      | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)     |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEP s

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP ( ▶ )

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un Fl / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année

**Annexe 4 : Concentrations d’œstriol (en ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEP’s et dans diverses eaux de surface.**

| Composé | Effluent brut          | Effluent Traité      | % d'élimination    | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est.  | Nb de sites : STEP's \ a                 | Pays      | Années    | Références                      |
|---------|------------------------|----------------------|--------------------|---------------------------------|------------------------------------------|-----------|-----------|---------------------------------|
| E3      | n.d.                   | n.d.                 | -                  | -                               | 3 <sup>d, h</sup>                        | Allemagne | 1997      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)  |
|         | -                      | <0,1-5 <sup>b</sup>  | -                  | n.d.-3 <sup>b</sup>             | 3 <sup>d, h</sup> / 11 <sup>e, h</sup>   | Pays-Bas  | 1997      | (Belfroid <i>et al.</i> , 1999) |
|         | 2-120 <sup>b</sup>     | n.d.-28 <sup>b</sup> | -                  | -                               | 5 <sup>d, h</sup>                        | Italie    | 1999      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)  |
|         | 11,4-15,2 <sup>b</sup> | 5-7,3 <sup>b</sup>   | 40-67 <sup>c</sup> | 1-2,2 ▶ 2,1-2,5 <sup>b, f</sup> | 4 <sup>d, h</sup> / 6 <sup>g, f, h</sup> | France    | 2001/2002 | (Cargouët <i>et al.</i> , 2004) |
|         | 23-48 <sup>b</sup>     | n.d.-1 <sup>b</sup>  | >97 <sup>c</sup>   | 2-5 <sup>b</sup>                | 1 <sup>h</sup> / 1 <sup>h</sup>          | Italie    | 2002      | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)   |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEP's

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP ( ▶ )

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un Fl / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année

**Annexe 5 : Concentrations en 17 -ethinyloestradiol (en ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEP s et dans diverses eaux de surface.**

| Composé | Effluent brut         | Effluent Traité        | % d'élimination     | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est.    | Nb de sites : STEP s \ a                 | Pays       | Années    | Références                        |
|---------|-----------------------|------------------------|---------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|------------|-----------|-----------------------------------|
| EE2     |                       | n.d.-7 <sup>b</sup>    |                     |                                   | 7 <sup>d</sup>                           | Angleterre | 1996      | (Routledge <i>et al.</i> , 1998)  |
|         | <0,2-8,8 <sup>b</sup> | <0,2-<1,8 <sup>b</sup> | 77->98 <sup>c</sup> | -                                 | 3 <sup>d, h</sup>                        | Allemagne  | 1997      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)    |
|         | -                     | n.d.-15 <sup>b</sup>   | -                   | n.d.                              | 16 <sup>d</sup> / 15 <sup>e</sup>        | Allemagne  | 1997      | (Ternes <i>et al.</i> , 1999b)    |
|         | ≅ 5,5 <sup>e</sup>    | 1-2 <sup>e</sup>       | 64-78 <sup>c</sup>  | -                                 | 1 <sup>h</sup>                           | Brésil     |           |                                   |
|         | -                     | n.d.-42 <sup>b</sup>   | -                   | -                                 | 10 <sup>d</sup>                          | Canada     |           |                                   |
|         | -                     | n.d.-7,5 <sup>b</sup>  | -                   | n.d.-4,3 <sup>b</sup>             | 3 <sup>d, h</sup> / 11 <sup>e, h</sup>   | Pays-Bas   | 1997      | (Belfroid <i>et al.</i> , 1999)   |
|         | -                     | 4,5                    | -                   | -                                 | 1                                        | Suisse     | 1997      | (Larsson <i>et al.</i> , 1999)    |
|         | -                     | -                      | -                   | n.d.                              | 7 <sup>e, h</sup>                        | Angleterre | 1998      | (Fawell <i>et al.</i> , 2001)     |
|         | <0,5-10 <sup>b</sup>  | n.d.-2,2 <sup>b</sup>  | -                   | -                                 | 5 <sup>d, h</sup>                        | Italie     | 1999      | (Johnson <i>et al.</i> , 2000)    |
|         | -                     | <0,4-3,4 <sup>b</sup>  | -                   | -                                 | 3 <sup>d</sup>                           | Angleterre | 2000      | (Williams <i>et al.</i> , 2003)   |
|         | -                     | n.d.-500 <sup>b</sup>  | -                   | -                                 | 7 <sup>d, h</sup>                        | USA        | 2000      | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)    |
|         | -                     | <1-1,5 <sup>b</sup>    | -                   | <1                                | 2 <sup>d, h</sup> / 1 <sup>h</sup>       | Allemagne  | 2001      | (Pawlowski <i>et al.</i> , 2004a) |
|         | 5,4-7,1 <sup>b</sup>  | 2,7-4,5 <sup>b</sup>   | 34-45 <sup>c</sup>  | 1,1-1,5 ▶ 1,8-2,9 <sup>b, f</sup> | 4 <sup>d, h</sup> / 6 <sup>g, f, h</sup> | France     | 2001/2002 | (Cargouët <i>et al.</i> , 2004)   |
|         | n.d.                  | n.d.                   | -                   | n.d.-1 <sup>b</sup>               | 1 <sup>h</sup> / 1 <sup>h</sup>          | Italie     | 2002      | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)     |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEP s

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP ( ▶ )

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un FI / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année

**Annexe 6 : Concentrations en phyto- et en mycœstrogènes (ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEP s et dans diverses eaux de surface.**

| Composés     | Effluent brut          | Effluent Traité        | % d'élimination | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. | Nb de sites : STEP s \ a          | Pays      | Années | Références                        |
|--------------|------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------|--------|-----------------------------------|
| Daidzéine    | -                      | < 10 - 10 <sup>b</sup> | -               | < 10                           | 2 <sup>d,h</sup> \ 1 <sup>h</sup> | Allemagne | 2001   | (Pawlowski <i>et al.</i> , 2004a) |
|              | 75 - 120 <sup>b</sup>  | 7 - 16 <sup>b</sup>    | 88 <sup>c</sup> | 2 - 3 <sup>b</sup>             | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>   | Italie    | 2002   | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)     |
| Biochanine A | 8 - 18 <sup>b</sup>    | 3 - 5 <sup>b</sup>     | 73 <sup>c</sup> | 1 - 2 <sup>b</sup>             | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>   | Italie    | 2002   |                                   |
| Génistéine   | 195 - 384 <sup>b</sup> | 15 - 83 <sup>b</sup>   | 81 <sup>c</sup> | 4 - 7 <sup>b</sup>             | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>   | Italie    | 2002   |                                   |
| β-Sitosterol | -                      | 60 - 90 <sup>b</sup>   | -               | < 50                           | 2 <sup>d,h</sup> \ 1 <sup>h</sup> | Allemagne | 2001   | (Pawlowski <i>et al.</i> , 2004a) |
| Zéaralénone  | 3 - 18 <sup>b</sup>    | 3 - 10 <sup>b</sup>    | 53 <sup>c</sup> | 2 - 5 <sup>b</sup>             | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>   | Italie    | 2002   | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)     |
| α-Zéaralénol | -                      | 20 - 30 <sup>b</sup>   | -               | < 10                           | 2 <sup>d,h</sup> \ 1 <sup>h</sup> | Allemagne | 2001   | (Pawlowski <i>et al.</i> , 2004a) |
|              | n.d. - 10 <sup>b</sup> | n.d. - 7 <sup>b</sup>  | 30 <sup>c</sup> | n.d. - 3 <sup>b</sup>          | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>   | Italie    | 2002   | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)     |
| β-Zéaralénol | n.d. - 8 <sup>b</sup>  | n.d. - 5 <sup>b</sup>  | 38 <sup>c</sup> | n.d. - 5 <sup>b</sup>          | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>   | Italie    | 2002   |                                   |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEP s

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un Fl / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année

**Annexe 7 : Concentrations en alkylphénols (ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEP s et dans diverses eaux de surface.**

| Composés | Effluent brut            | Effluent Traité            | % d'élimination       | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est.         | Nb de sites : STEP s \ a                    | Pays       | Années    | Références                       |
|----------|--------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|------------|-----------|----------------------------------|
| Σ NPs    | -                        | <200 - 330000 <sup>b</sup> | -                     | 200-180000 / <30-320 <sup>b</sup>      | 12 <sup>d</sup> \ 5 / 7 <sup>a, e, g</sup>  | Angleterre | 1994      | (Blackburn et Waldock, 1995)     |
| 4-NP     | -                        | 840                        | -                     | -                                      | 1                                           | Suisse     | 1997      | (Larsson <i>et al.</i> , 1999)   |
|          | 2130-2600 <sup>b</sup>   | 320-1570 <sup>b</sup>      | 40-85 <sup>b, c</sup> | -                                      | 1 <sup>h</sup>                              | Allemagne  | 1998      | (Körner <i>et al.</i> , 2000)    |
|          | -                        | 470-500 <sup>b</sup>       | -                     | 150-250 <sup>b</sup>                   | 10 <sup>d, i</sup> \ 109 <sup>e, g, i</sup> | Japon      | 1998      | (Kashiwada <i>et al.</i> , 2002) |
|          | -                        | -                          | -                     | n.d.- 485                              | 5 <sup>e, g</sup>                           | Allemagne  | 1998-1999 | (Bolz <i>et al.</i> , 2001)      |
|          | -                        | -                          | -                     | 7,3-84 / 1-221 / 0,3-63 <sup>b</sup>   | 12 / 4 / 9 <sup>a, e, g, h</sup>            | Allemagne  | 1998-1999 | (Heemken <i>et al.</i> , 2001)   |
|          | -                        | -                          | -                     | 40-130 <sup>b</sup>                    | 3 <sup>e</sup>                              | Japon      | 2000      | (Inoue <i>et al.</i> , 2002)     |
|          | -                        | 11300-22800 <sup>b</sup>   | -                     | -                                      | 3 <sup>d</sup>                              | USA        | 2000      | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)   |
|          | -                        | 1000-2500 <sup>b</sup>     | -                     | -                                      | 9 <sup>d, h</sup>                           | USA        | 2000      | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)   |
|          | 4194 - 8768 <sup>b</sup> | 1120 - 2235 <sup>b</sup>   | 75 <sup>c</sup>       | 1289 - 1466                            | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>             | Italie     | 2002      | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)    |
| NP1EO    | -                        | -                          | -                     | 10-205 / 13-115 / 0,7-57 <sup>b</sup>  | 12 / 4 / 9 <sup>a, e, g, h</sup>            | Allemagne  | 1998-1999 | (Heemken <i>et al.</i> , 2001)   |
|          | -                        | 37600-100000 <sup>b</sup>  | -                     | -                                      | 3 <sup>d</sup>                              | USA        | 2000      | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)   |
| NP2EO    | -                        | -                          | -                     | 3,6-84 / 4,3-68 / 0,1-12 <sup>b</sup>  | 12 / 4 / 9 <sup>a, e, g, h</sup>            | Allemagne  | 1998-1999 | (Heemken <i>et al.</i> , 2001)   |
|          | -                        | 45500-329000 <sup>b</sup>  | -                     | -                                      | 3 <sup>d</sup>                              | USA        | 2000      | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)   |
| NP3EO    | -                        | 20300-30700 <sup>b</sup>   | -                     | -                                      | 3 <sup>d</sup>                              | USA        | 2000      |                                  |
| 4-OP     | 180-320 <sup>b</sup>     | 280-357 <sup>b</sup>       | < 13 <sup>e</sup>     | -                                      | 1 <sup>h</sup>                              | Allemagne  | 1998      | (Körner <i>et al.</i> , 2000)    |
|          | -                        | -                          | -                     | n.d.- 189 <sup>b</sup>                 | 5 <sup>e, g</sup>                           | Allemagne  | 1998-1999 | (Bolz <i>et al.</i> , 2001)      |
|          | -                        | -                          | -                     | 0,4-18 / 1-6 / 0,1-16 <sup>b</sup>     | 12 / 4 / 9 <sup>a, e, g, h</sup>            | Allemagne  | 1998-1999 |                                  |
| OP1EO    | -                        | -                          | -                     | 0,8-12 / 0,9-6,2 / 0,3-63 <sup>b</sup> | 12 / 4 / 9 <sup>a, e, g, h</sup>            | Allemagne  | 1998-1999 | (Heemken <i>et al.</i> , 2001)   |
| OP2EO    | -                        | -                          | -                     | 0,6-21 / 0,8-4,1 / 0,1-21 <sup>b</sup> | 12 / 4 / 9 <sup>a, e, g, h</sup>            | Allemagne  | 1998-1999 |                                  |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEP s

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un Fl / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année

**Annexe 8 : Concentrations en bisphénol A (ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEPs et dans diverses eaux de surface.**

| Composés | Effluent brut         | Effluent Traité        | % d'élimination    | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est.          | Nb de sites :<br>STEPs \ <sup>a</sup>       | Pays      | Années    | Références                       |
|----------|-----------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------|-----------|-----------|----------------------------------|
| BPA      | -                     | 18-702 <sup>b</sup>    | -                  | 0,5-410 <sup>b</sup>                    | 39 \ 115 <sup>d, e, g, h</sup>              | Allemagne | 1997      | (Fromme <i>et al.</i> , 2002)    |
|          | -                     | 490                    | -                  | -                                       | 1                                           | Suisse    | 1997      | (Larsson <i>et al.</i> , 1999)   |
|          | 542-3010 <sup>b</sup> | 258-320 <sup>b</sup>   | 85-91 <sup>c</sup> | -                                       | 1 <sup>h</sup>                              | Allemagne | 1998      | (Körner <i>et al.</i> , 2000)    |
|          | -                     | 73-140 <sup>a, g</sup> | -                  | 47-58 <sup>b</sup>                      | 10 <sup>d, i</sup> \ 109 <sup>e, g, i</sup> | Japon     | 1998      | (Kashiwada <i>et al.</i> , 2002) |
|          | -                     | -                      | -                  | <50-272 <sup>b</sup>                    | 5 <sup>e, g</sup>                           | Allemagne | 1998-1999 | (Bolz <i>et al.</i> , 2001)      |
|          | -                     | -                      | -                  | 17-776 / 8,9-125 / n.d.-20 <sup>b</sup> | 12 / 4 / 9 <sup>a, e, g, h</sup>            | Allemagne | 1998-1999 | (Heemken <i>et al.</i> , 2001)   |
|          | -                     | -                      | -                  | n.d.-130 <sup>b</sup>                   | 3 <sup>e</sup>                              | Japon     | 2000      | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)   |
|          | -                     | n.d.-200 <sup>b</sup>  | -                  | -                                       | 7 <sup>d, h</sup>                           | USA       | 2000      | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)   |
|          | 332-339 <sup>b</sup>  | 13-36 <sup>b</sup>     | 90 <sup>c</sup>    | 15-29 <sup>b</sup>                      | 1 <sup>h</sup> \ 1 <sup>h</sup>             | Italie    | 2002      | (Laganà <i>et al.</i> , 2004)    |
|          | -                     | -                      | -                  | 39-47 <sup>b</sup>                      | 2 <sup>a, g</sup>                           | Japon     | 2003      | (Kawaguchi <i>et al.</i> , 2004) |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEPs

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un Fl / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année

**Annexe 9 : Concentrations en phtalates (ng/l) présentes dans différents effluents bruts et traités de STEP s et dans diverses eaux de surface.**

| Composés                    | Effluent brut | Effluent Traité       | % d'élimination | <sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. | Nb de sites : STEP s \ a       | Pays      | Années | Références                       |
|-----------------------------|---------------|-----------------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|--------|----------------------------------|
| Diméthylphtalate            | -             | n.d.                  | -               | -                              | 7 <sup>d, h</sup>              | USA       | 2000   | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)   |
| Diéthylphtalate             | -             | -                     | -               | n.d.-3200 <sup>b</sup>         | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
|                             | -             | n.d.-200 <sup>b</sup> | -               | -                              | 7 <sup>d, h</sup>              | USA       | 2000   | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)   |
|                             | -             | -                     | -               | n.d.-31200 <sup>b</sup>        | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
| Bis-éthylhexylphtalate      | -             | -                     | -               | n.d.-31200 <sup>b</sup>        | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
|                             | -             | 1740-182000           | -               | 330-97800 <sup>b</sup>         | 39 \ 115 <sup>d, e, g, h</sup> | Allemagne | 1997   | (Fromme <i>et al.</i> , 2002)    |
|                             | 209000        | 6000                  | 97 <sup>c</sup> | -                              | 1                              | Finland   | 1999   | (Marttinen <i>et al.</i> , 2003) |
|                             | -             | 3970                  | -               | 2100 / 8100                    | 1 \ 1 / 1 <sup>a</sup>         | Espagne   | 2002   | (Brossa <i>et al.</i> , 2003)    |
| Di-isopropylphtalate        | -             | -                     | -               | n.d.                           | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
| Di-propylphtalate           | -             | -                     | -               | 3000                           | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
| Di- <i>n</i> -butylphtalate | -             | 2100                  | -               | 800 / 2090                     | 1 \ 1 / 1 <sup>a</sup>         | Espagne   | 2002   | (Brossa <i>et al.</i> , 2003)    |
| Di--isobutylphtalate        | -             | -                     | -               | n.d.-5700 <sup>b</sup>         | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
| Dibutylhtalate              | -             | -                     | -               | n.d.-44300 <sup>b</sup>        | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
|                             | -             | 200-10400             | -               | 120-8800 <sup>b</sup>          | 39 \ 115 <sup>d, e, g, h</sup> | Allemagne | 1997   | (Fromme <i>et al.</i> , 2002)    |
| Butylbenzylphtalate         | -             | -                     | -               | n.d.-6600 <sup>b</sup>         | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
|                             | -             | n.d.-200 <sup>b</sup> | -               | -                              | 7 <sup>d, h</sup>              | USA       | 2000   | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)   |
|                             | -             | n.d.                  | -               | n.d. / 150                     | 1 \ 1 / 1 <sup>a</sup>         | Espagne   | 2002   | (Brossa <i>et al.</i> , 2003)    |
| Di- <i>n</i> -octylphtalate | -             | -                     | -               | n.d.-11300 <sup>b</sup>        | 4 <sup>e, g, h</sup>           | Italie    | 1994   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997)    |
|                             | -             | n.d.                  | -               | -                              | 7 <sup>d, h</sup>              | USA       | 2000   | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)   |

<sup>a</sup> Fl. / Riv. / Est. : Fleuves, Rivières et Estuaires

<sup>b</sup> intervalle des valeurs mesurées

<sup>c</sup> valeurs estimées

<sup>d</sup> études réalisées sur plusieurs STEP s

<sup>e</sup> études réalisées sur plusieurs rivières

<sup>f</sup> concentrations mesurées en amont et en aval de la STEP

<sup>g</sup> valeurs mesurées sur plusieurs sites d'un Fl / Riv / Est

<sup>h</sup> valeurs mesurées sur plusieurs mois différents durant l'année

<sup>i</sup> valeurs mesurées sur deux saisons différentes de l'année



**Annexe 10 : Adsorption de phtalates sur le sédiment provenant d'un fleuve italien <sup>a</sup> (Vitali *et al.*, 1997) et de plusieurs fleuves, rivières et lacs d'Allemagne <sup>b</sup> (Rhin, Moselle, Ruhr...) (Gavala *et al.*, 2003).**

| Composés               | Effluent brut | Références                    |
|------------------------|---------------|-------------------------------|
| Dimethylphtalate       | non étudié    | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
| Diethylphtalate        | n.d. - 2      | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
| Bis-ethylhexylphtalate | n.d. – 487,3  | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
|                        | 210 - 8444    | (Gavala <i>et al.</i> , 2003) |
| Di-isopropylphtalate   | n.d. – 0,9    | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
| Di-propylphtalate      | n.d. – 4,4    | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
| Di-n-butylphtalate     | n.d. – 25,4   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
| Di-isobutylphtalate    | n.d. - 76     | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
| Dibutylphtalate        | n.d. - 13     | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
|                        | 60 - 2080     | (Gavala <i>et al.</i> , 2003) |
| Butylbenzylphtalate    | n.d. – 18,2   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |
| Di-n-octylphtalate     | n.d. – 16,7   | (Vitali <i>et al.</i> , 1997) |

**Annexe 11 : Concentrations de PCBs présents dans différents effluents de STEP s et dans diverses eaux de surfaces en ng/l (Font et al., 1996).**

| Composés         | Effluents de STEP s | Fleuves et Rivières | Estuaires et Océans | Mers      | Pays      | Années    |
|------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|
| isomères de PCBs | -                   | 0,06-0,38           | -                   | -         | Canada    | 1980      |
|                  | -                   | 1-164               | -                   | -         | Canada    | 1985-1986 |
|                  | -                   | -                   | -                   | 0,08-0,79 | Pays-Bas  | 1988      |
|                  | -                   | 2-42                | -                   | -         | Espagne   | 1990      |
| Σ PCBs           | -                   | -                   | -                   | 5,5-46    | Allemagne | 1980-84   |
|                  | -                   | 8                   | -                   | -         | Canada    | 1986-1990 |
|                  | -                   | -                   | -                   | 1,3-8,8   | Espagne   | 1987      |
|                  | -                   | -                   | -                   | 2-6,3     | Canada    | 1988      |
|                  | 500-3200            | -                   | -                   | -         | Suisse    | 1988      |
|                  | -                   | 85-222              | -                   | -         | Espagne   | 1989      |
|                  | -                   | -                   | 0,07-0,6            | -         | Pays-Bas  | 1989      |
|                  | -                   | -                   | -                   | 0,07-0,19 | Pays-Bas  | 1992      |
|                  | -                   | -                   | -                   | -         | Espagne   | 1990      |
| Aroclore 1016    | -                   | 129                 | -                   | -         | Espagne   | 1990      |
| Aroclore 1242    | -                   | 84-354              | -                   | -         | Espagne   | 1990      |
| Aroclore 1248    | -                   | 10-313              | -                   | -         | Espagne   | 1992      |
| Aroclore 1254    | -                   | <1-3                | -                   | -         | Croatie   | 1988-1989 |
|                  | -                   | 212                 | -                   | -         | Espagne   | 1990      |
|                  | 3,4-1547            | -                   | -                   | -         | Espagne   | 1992      |
| Aroclore 1260    | -                   | 420-620             | -                   | -         | Belgique  | 1985      |
|                  | -                   | <1-3                | -                   | -         | Croatie   | 1988-1989 |
|                  | 100-600             | -                   | -                   | -         | USA       | 1992      |

## Annexe 12 : Bioaccumulation des PCBs et PCDD/Fs chez les poissons.

| Poissons                                                                                                                                                        | Σ PCBs                    | Σ PCDD / Fs | Pays               | Années    | Références                        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------|--------------------|-----------|-----------------------------------|
| Anguille <sup>a</sup>                                                                                                                                           | >9,81 - < 12,54           | -           | Angleterre         | 1995-1996 | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)  |
| <sup>b</sup>                                                                                                                                                    | 9,22 - 126                | 1,62 - 4,39 | Espagne            | 2000      | (Bordajandi <i>et al.</i> , 2003) |
| Brochet <sup>a</sup>                                                                                                                                            | 1,85                      | -           | Angleterre         | 1995-1996 | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)  |
| Carpe <sup>b</sup>                                                                                                                                              | 1,6 - 7,6                 | -           | Pays-Bas           | 2000      | (Verweij <i>et al.</i> , 2004)    |
| Gardon <sup>a</sup>                                                                                                                                             | <0,77 - 3,32              | -           | Angleterre         | 1995-1996 | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)  |
| Gobie <sup>c</sup>                                                                                                                                              | 23 - 120                  | -           | Belgique           | 2001      | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004) |
| Grenadier de roche <sup>d</sup>                                                                                                                                 | 664 - 921 / 876 – 2790    | -           | Europe Cotes Ouest | 1999      | (Mormede et Davies, 2003)         |
| Hoplostete rouge <sup>d</sup>                                                                                                                                   | 875 - 938 / 758 – 1130    | -           | Europe Cotes Ouest | 1999      | (Mormede et Davies, 2003)         |
| Limande <sup>d</sup>                                                                                                                                            | 89 - 310                  | -           | Belgique           | 2001      | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004) |
| Merlan <sup>d</sup>                                                                                                                                             | 230 - 3100                | -           | Belgique           | 2001      | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004) |
| Perche <sup>a</sup>                                                                                                                                             | 1,83                      | -           | Angleterre         | 1995-1996 | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)  |
| <sup>c</sup>                                                                                                                                                    | 21 - 5000                 | -           | Pologne            | 1996-97   | (Falandysz <i>et al.</i> , 2004)  |
| Plie <sup>d</sup>                                                                                                                                               | 96 - 1400                 | -           | Belgique           | 2001      | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004) |
| Scarfish noir <sup>d</sup>                                                                                                                                      | 18,50 - 1370 / 364 – 9880 | -           | Europe Cotes Ouest | 1999      | (Mormede et Davies, 2003)         |
| Sole anglaise <sup>d</sup>                                                                                                                                      | 20 - 800                  | -           | Belgique           | 2001      | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004) |
| Tacaud <sup>d</sup>                                                                                                                                             | 650 - 3200                | -           | Belgique           | 2001      | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004) |
| Truite arc-en-ciel <sup>b</sup>                                                                                                                                 | 5,14 - 9,16               | 1,22 - 1,69 | Espagne            | 2000      | (Bordajandi <i>et al.</i> , 2003) |
| Vandoise <sup>a</sup>                                                                                                                                           | <0,77                     | -           | Angleterre         | 1995-1996 | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)  |
| <sup>a</sup> ng/g de muscle (Poids secs) <sup>b</sup> ng/g de muscle (Poids frais) <sup>c</sup> ng/g de lipide musculaire <sup>d</sup> ng/g de lipide hépatique |                           |             |                    |           |                                   |

### Annexe 13 : Bioaccumulation des pesticides chez diverses espèces de poissons.

| Poissons                        | Aldrine     | Dieldrine     | Chlordanes  | Σ DDTs      | α HCH       | β HCH       | Heptachlore | Lindane      | Σ        | Pays               | Références                         |
|---------------------------------|-------------|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|----------|--------------------|------------------------------------|
| Anguille <sup>a</sup>           | -           | 15,82 - 36,81 | -           | -           | -           | -           | -           | 1,62 - 4,94  | -        | Angleterre         | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)   |
| <sup>b</sup>                    | -           | -             | -           | 7,02 - 136  | -           | -           | -           | -            | -        | Espagne            | (Bordajandi <i>et al.</i> , 2003)  |
| Brochet <sup>a</sup>            | -           | <0,09         | -           | -           | -           | -           | -           | <0,08        | -        | Angleterre         | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)   |
| Carpe <sup>b</sup>              | <0,4 - 1,1  |               |             | 1,3 - 24    | 0,25 - 19   |             |             |              |          | Pays-Bas           | (Verweij <i>et al.</i> , 2004)     |
| Gardon <sup>a</sup>             | -           | 0,47 - 0,96   | -           | -           | -           | -           | -           | <0,08 - 0,29 | -        | Angleterre         | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)   |
| Gobie <sup>d</sup>              | -           | -             | -           | -           | -           | -           | -           | -            | 1,8 - 16 | Belgique           | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004)  |
| Grenadier de roche <sup>d</sup> | 1,8 - 1,9   | 30,1 - 30,7   | 63,9 - 88,9 | 1010 - 1460 | 5,8 - 6     | 1,3 - 2     | 0,9 - 2,9   | -            | -        | Europe Cotes Ouest | (Mormede et Davies, 2003)          |
|                                 | 1,1 - 1,4   | 28,2 - 32,8   | 103 - 128   | 1500 - 3260 | 4,7 - 7,5   | 1 - 2,5     | 0,3 - 0,5   |              |          |                    |                                    |
| Hoplostete rouge <sup>d</sup>   | 2,4 - 3,8   | 33 - 48,9     | 82,7 - 139  | 666 - 933   | 6,8 - 11,9  | 4,6 - 5     | 4,6         |              |          | Europe Cotes Ouest | (Mormede et Davies, 2003)          |
|                                 | 3,7 - 5,3   | 44,2 - 55,7   | 164 - 165   | 831 - 884   | 10,2 - 11   | 10,4 - 11,8 | 4,1 - 6,2   | -            | -        |                    |                                    |
| Mafou bleu <sup>d</sup>         | 2,8         | 42,2 /        | 270         | 852         | 4,2         | 2           | 2,3         |              |          | Europe Cotes Ouest | (Mormede et Davies, 2003)          |
|                                 | 1           | 42,4          | 356         | 991         | 4,2         | 2           | 1,5         | -            | -        |                    |                                    |
| Limande <sup>d</sup>            | -           | -             | -           | -           | -           | -           | -           | -            | 14 - 63  | Belgique           | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004)  |
| Perche <sup>a</sup>             | -           | 0,65          | -           | -           | -           | -           | -           | 0,17         | -        | Angleterre         | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)   |
| <sup>c</sup>                    | -           | -             | -           | 34 - 4000   | 1 - 280     |             |             | -            | -        | Pologne            | (Falandysz <i>et al.</i> , 2004)   |
| Scardfish noir <sup>d</sup>     | <0,03 - 2,1 | 22,9 - 32,4   | 111 - 221   | 384 - 1310  | <0,03 - 3,8 | <0,03 - 0,9 | <0,03 - 1,6 |              |          | Europe Cotes Ouest | (Mormede et Davies, 2003)          |
|                                 | <0,03 - 2,9 | 22 - 36,4     | 110 - 855   | 410 - 4350  | <0,03 - 0,7 | <0,03       | <0,03 - 8,8 | -            | -        |                    |                                    |
| Sole anglaise <sup>d</sup>      | -           | -             | -           | -           | -           | -           | -           | -            | 6,4 - 61 | Belgique           | (Voorspoels <i>et al.</i> , 2004)  |
| Tilapia <sup>a</sup>            | < 30 000    | < 80 000      | -           | -           | -           | -           | < 30 000    | < 100 000    | -        | Bénin              | (Okoumassoun <i>et al.</i> , 2002) |
| Truite arc-en-ciel <sup>b</sup> | -           | -             | -           | 2,39 - 8,37 | -           | -           | -           | -            | -        | Espagne            | (Bordajandi <i>et al.</i> , 2003)  |
| Vandoise <sup>a</sup>           | -           | 0,65          | -           | -           | -           | -           | -           | 0,23         | -        | Angleterre         | (Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)   |

<sup>a</sup> ng/g de muscle (poids secs)

<sup>b</sup> ng/g de muscle (poids frais)

<sup>c</sup> ng/g de lipide musculaire

<sup>d</sup> ng/g de lipide hépatique

**Annexe 14 : Modification du sex-ratio, effets de la période et de la concentration d'exposition.**

| Toxiques        | Poissons | Période d'exposition                                                    | Concentration                                                             | Résultats          | Références                          |
|-----------------|----------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| E2              | Medaka   | 1 - 30 j après l'éclosion                                               | 0,01 et 0,1µg/l                                                           | RAS                | (Chikae <i>et al.</i> , 2004)       |
|                 |          |                                                                         | 1 µg/l <sup>a</sup>                                                       | 3 ; 14             |                                     |
|                 |          |                                                                         | 10 µg/l <sup>a</sup>                                                      | 0 ; 11             |                                     |
|                 | Bar      | 60 - 260 j après la fertilisation<br>224 - 426 j après la fertilisation | 5 mg/kg <sup>b</sup><br>et 10 mg/kg <sup>b</sup>                          | RAS                | (Blázquez <i>et al.</i> , 1998)     |
|                 | Truite   | 10 j avant l'éclosion<br>jusqu'à l'éclosion                             | 2.10 <sup>-7</sup> M <sup>a</sup>                                         | RAS                | (Madigou <i>et al.</i> , 2001)      |
| EE2             | Zèbre    | 2 - 60 j après l'éclosion                                               | 1 ng/l <sup>a</sup>                                                       | 20 % ; 75 %        | (Hill et Janz, 2003)                |
|                 |          | 1 j - 90 j après l'éclosion                                             | 10 ng/l <sup>a</sup>                                                      | 30 % ; 70 %        | (Van der Belt <i>et al.</i> , 2003) |
|                 |          | 20 - 40 j après l'éclosion                                              | 15,4 ng/l <sup>a</sup>                                                    | 10% ; 30 %         | (Andersen <i>et al.</i> , 2003)     |
|                 |          | 20 - 60 j                                                               |                                                                           | 100 %              |                                     |
|                 |          | 1 - 60 j                                                                |                                                                           | 100 %              |                                     |
|                 | Bar      | 48 - 88 j après la fertilisation<br>60 - 260 j                          | 10 mg/kg <sup>b</sup>                                                     | 62 %<br>80 %       | (Blázquez <i>et al.</i> , 1998)     |
| 4-NP            | Zèbre    | 2 - 60 j après l'éclosion                                               | 10 et 30 µg/l <sup>a</sup><br>100 µg/l <sup>a</sup>                       | RAS<br>10 % ; 70 % | (Hill et Janz, 2003)                |
|                 | Truite   | 10 j avant l'éclosion<br>jusqu'à l'éclosion                             | 2.10 <sup>-6</sup> M <sup>a</sup><br>et 2.10 <sup>-5</sup> M <sup>a</sup> | RAS                | (Madigou <i>et al.</i> , 2001)      |
|                 |          | pendant les stades : embryonnaire,<br>larvaire et immature              | 1,05 µg/l <sup>a</sup><br>et 10,17 µg/l <sup>a</sup>                      | RAS                | (Ackermann <i>et al.</i> , 2002)    |
| DEHP            | Médaka   | 1 j - 21 j après l'éclosion                                             | 0,01, 0,1, 1 et<br>10 µg/l <sup>a</sup>                                   | RAS                | (Chikae <i>et al.</i> , 2004)       |
| HCH             | Médaka   | 1 j - 21 j après l'éclosion                                             | 0,01, 0,1, 1 et<br>10 µg/l <sup>a</sup>                                   | RAS                | (Chikae <i>et al.</i> , 2004)       |
| Cotes anglaises | Anguille | -                                                                       | -                                                                         | 52 – 60 %          | (Matthiessen <i>et al.</i> , 2002)  |

j : jours

<sup>a</sup> exposition via l'eau, <sup>b</sup> exposition via l'alimentation

RAS : rien à signaler

**Annexe 15 : Apparition d’intersexes, effets de la période et de la concentration d’exposition.**

| Toxiques        | Poissons | Période d’exposition        | Concentration                   | Résultats                              | Références                         |
|-----------------|----------|-----------------------------|---------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------|
| E2              | Carpe    | 50 - 70 j                   | 9 et 23 µg/l <sup>a</sup>       | 100 %<br>de testicule avec un oviducte | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998a)     |
|                 |          | 50 - 80 j                   |                                 |                                        |                                    |
|                 |          | 50 - 110 j                  |                                 |                                        |                                    |
|                 |          | 50 - 140 j après l’éclosion |                                 |                                        |                                    |
|                 | Gobie    | pendant 13 jours            | 10 ng/l <sup>a</sup>            | 14 % de MIPS                           | (Matthiessen <i>et al.</i> , 2002) |
|                 |          |                             | 100 ng/l <sup>a</sup>           | 29 %                                   |                                    |
|                 |          |                             | 1000 ng/l <sup>a</sup>          | 57 %                                   |                                    |
| 4-TPP           | Carpe    | 50 - 70 j                   | 36, 90 ou 256 µg/l <sup>a</sup> | 0 %                                    | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998a)     |
|                 |          | 50 - 80 j                   |                                 | 30, 70 ou 100 %                        |                                    |
|                 |          | 50 - 110 j                  |                                 | 30, 100 ou 100 %                       |                                    |
|                 |          | 50 - 140 j                  |                                 | 50, 100 ou 100 %                       |                                    |
|                 |          | après l’éclosion            |                                 | de testicule avec un oviducte          |                                    |
| Cotes anglaises | Gobie    | -                           | -                               | 33 - 75 % de MIPS                      | (Matthiessen <i>et al.</i> , 2002) |

j : jours

<sup>a</sup> exposition via l’eau

**Annexe 16 : Apparition d’ovotestis, effets de la période et de la concentration d’exposition.**

| Toxiques                                | Poissons | Période d’exposition                  | Concentration              | Résultats                      | Références                         |
|-----------------------------------------|----------|---------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| E2                                      | Bar      | 60 - 260 jaf                          | 10 mg/kg <sup>b</sup>      | 57 %                           | (Blázquez <i>et al.</i> , 1998)    |
|                                         |          | 226 - 426 j<br>après la fertilisation |                            | RAS                            |                                    |
|                                         | Carpe    | 210 - 270 jaé                         | 0,1 µg/l <sup>a</sup>      | RAS                            | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998b)     |
|                                         |          | 210 - 300 jaé                         | 1 µg/l <sup>a</sup>        | 25 % , 50 %                    |                                    |
|                                         | Médaka   | Mâles matures<br>pendant 25 j         | 29 ng/l <sup>a</sup>       | 5 ax sur 8                     | (Kang <i>et al.</i> , 2002)        |
|                                         |          |                                       | 56 - 463 ng/l <sup>a</sup> | 100 %                          |                                    |
| EE2                                     | Zèbre    | Fertilisation à éclosion              | 15,4 ng/l <sup>a</sup>     | 20 %                           | (Andersen <i>et al.</i> , 2003)    |
|                                         |          | Eclosion à 30 jaé                     |                            | 20 %                           |                                    |
|                                         |          | > 30 jaé                              |                            | RAS                            |                                    |
| 4-NP                                    | Zèbre    | 2 - 60 jaé                            | 10 µg/l <sup>a</sup>       | RAS                            | (Hill et Janz, 2003)               |
|                                         |          |                                       | 30 µg/l <sup>a</sup>       | 5 %                            |                                    |
|                                         |          |                                       | 100 µg/l <sup>a</sup>      | 10 %                           |                                    |
| 4-TPP                                   | Carpe    | 50 - 80 jaé                           | 36 µg/l <sup>a</sup>       | RAS                            | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998a)     |
|                                         |          | 50 - 110 jaé                          | 90 µg/l <sup>a</sup>       | quelques ax                    |                                    |
|                                         |          | 50 - 140 jaé                          | 256 µg/l <sup>a</sup>      | quelques ax                    |                                    |
| 4-OP                                    | Médaka   | Mâles matures<br>pendant 21 j         | 20 et 41 ppb <sup>a</sup>  | RAS                            | (Gronen <i>et al.</i> , 1999)      |
|                                         |          |                                       | 74 et 230 ppb <sup>a</sup> | 1 ax sur 25                    |                                    |
| Effluents domestiques<br>et industriels | Brême    | Mâles matures                         | -                          | 43 % printemps<br>33 % automne | (Vethaak <i>et al.</i> , 2002)     |
|                                         | Carrelet | Mâles matures                         | -                          | RAS                            | (Vethaak <i>et al.</i> , 2002)     |
| Baie de Tokyo                           | Carrelet | Mâles matures<br>(1-6 ans)            | -                          | 15 %                           | (Hashimoto <i>et al.</i> , 2000)   |
| Fleuve Anioia, en aval<br>d’une STEP    | Carpe    | Mâles matures                         | -                          | 6 ax sur 21                    | (Solé <i>et al.</i> , 2003)        |
| Cotes anglaises                         | Anguille | Mâles matures                         | Mersey, Thyne              | 14 %                           | (Matthiessen <i>et al.</i> , 2002) |
|                                         |          |                                       | Thames, Clyde              | quelques ax                    |                                    |
|                                         | Carrelet | Mâles matures                         | Forth, Clyde<br>et Thyne   | 17 %                           | (Matthiessen <i>et al.</i> , 2002) |
|                                         | Gobie    | Mâles matures                         | 21 sites                   | RAS                            | (Matthiessen <i>et al.</i> , 2002) |
| Estuaire de<br>Mersey (UK)              | Flet     | Mâles matures                         | -                          | 4 ax sur 25                    | (Simpson <i>et al.</i> , 2000)     |

j : jours ; jaé : jour après l’éclosion ; <sup>a</sup> exposition via l’eau ; <sup>b</sup> via l’alimentation ; RAS : rien à signaler ; ax : animaux

**Annexe 17 : Démasculinisation des mâles adultes exposés à des œstrogènes mimétiques, effets de la concentration d'exposition.**

| Toxiques  | Poissons      | Exposition                                                   | GSI                                   | Cystes                | Lobules              | Tissu épithélial                  | Tissu interstitiel  | Spermatogenèse                            | Références                                |
|-----------|---------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------------------|---------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| E2        | Médaka        | 29-227 ng/l <sup>a</sup>                                     | RAS                                   |                       |                      | RAS                               |                     | RAS                                       | (Kang <i>et al.</i> , 2002)               |
|           |               | 463 ng/l <sup>a</sup>                                        | Diminution avec atrophie              | -                     | -                    | Hypertrophie                      | -                   | Inhibition totale                         |                                           |
|           | Carpe         | 0,1 µg/l <sup>a</sup>                                        | RAS                                   |                       | RAS                  | RAS                               |                     | RAS                                       | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998b)            |
|           |               | 1 µg/l <sup>a</sup>                                          | Diminution                            | -                     | Réduction des parois | Fibrose, vacuolisation, atrophie  | -                   | Blocage Spg A                             |                                           |
|           | Anguille      | 0,5 µg/g <sup>c</sup>                                        | Diminution                            | -                     | -                    | € de Sertoli desquamées           | -                   | € germinales phagocytés                   | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998b)      |
|           | Carrelet      | 0,1 mg/kg <sup>c</sup>                                       | RAS                                   |                       |                      |                                   | RAS                 | RAS                                       | (Folmar <i>et al.</i> , 2001)             |
|           |               | 1 et 10 mg/kg <sup>c</sup>                                   | Diminution avec atrophie              | -                     | -                    | -                                 | Hypertrophie        | Blocage Spg A<br>Cellules mortes          |                                           |
|           | Carrelet      | 0,1 et 1 mg/kg <sup>c</sup>                                  | RAS                                   | RAS                   |                      |                                   | RAS                 | RAS                                       | (Zaroogian <i>et al.</i> , 2001)          |
|           |               | 10 mg/kg <sup>c</sup>                                        | Diminution                            | Disparition           | -                    | -                                 | Hypertrophie        | Blocage Spg A/B<br>Cellules mortes        |                                           |
|           | Cichlide      | 10 µg/g <sup>c</sup>                                         | -                                     | Disparition           | -                    | -                                 | Hypertrophie        | Blocage Spg A/B                           | (Moncaut <i>et al.</i> , 2003)            |
| EE2       | Zèbre         | 25 ng/l <sup>a</sup>                                         |                                       | Déstructuration       |                      | € de Sertoli avec corps résiduels | -                   | -                                         | (Islinger <i>et al.</i> , 2003)           |
|           | Tête de boule | 0,1, 1 et 3 ng/l <sup>a</sup><br>10 et 100 ng/l <sup>a</sup> | -                                     | -                     | -                    | -                                 | -                   | RAS<br>Spg nécrotiques<br>Blocage Spg A/B | (Pawlowski <i>et al.</i> , 2004b)         |
| GEN       | Truite        | 500 et 1000 ppm <sup>a</sup>                                 | -                                     | -                     | -                    | -                                 | -                   | Accélération                              | (Bennetau-Pelissero <i>et al.</i> , 2001) |
| 4-NP      | Carpe         | 0,05-5,36 µg/l <sup>a</sup>                                  | -                                     | -                     | RAS                  | RAS                               | RAS                 | RAS                                       | (Villeneuve <i>et al.</i> , 2002)         |
| j : jours |               | <sup>a</sup> exposition via l'eau                            | <sup>c</sup> exposition par injection | RAS : rien à signaler |                      | Spg : Spermatogonie               | Spz : Spermatozoïde | € : Cellules                              |                                           |



**Annexe 17 (suite) : Démasculinisation des mâles adultes exposés à des œstrogènes mimétiques, effets de la concentration d'exposition.**

| Toxiques         | Poissons                          | Exposition                            | GSI                      | Cystes                      | Lobules              | Tissu épithélial                          | Tissu interstitiel  | Spermatogenèse                  | Références                           |
|------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------|-------------------------------------------|---------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 4-NP             | Plat                              | 80 et 640 µg/l <sup>a</sup>           | -                        | Disparition dose dépendante | -                    | RAS                                       | -                   | Inhibition dose dépendante      | (Kinnberg <i>et al.</i> , 2000)      |
|                  |                                   | 960 µg/l <sup>a</sup>                 |                          |                             |                      | € de Sertoli hypertrophiées et desquamées |                     |                                 |                                      |
|                  | Anguille                          | 100 µg/g <sup>c</sup>                 | Diminution               | -                           | -                    | € de Sertoli desquamées                   | -                   | € germinales phagocytés         | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998b) |
| NP2E0            | Truite                            | 450 et 1800 nmol/l <sup>a</sup>       | Diminution               | -                           | -                    | -                                         | -                   | Spz diminuent<br>Spg augmentent | (Le Gac <i>et al.</i> , 2001)        |
| 4-TPP            | Carpe                             | 32 µg/l <sup>a</sup>                  | RAS                      | RAS                         | RAS                  | RAS                                       | -                   | RAS                             | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998b)       |
|                  |                                   | 100, 320 et 1000 µg/l <sup>a</sup>    | Diminution               | Disparition                 | Réduction des parois | Fibrose, vacuolisation, atrophie          |                     | Blocage Spg A                   |                                      |
| 4-OP             | Médaka                            | 24 ppb <sup>a</sup>                   | -                        | -                           | -                    | -                                         | -                   | RAS                             | (Gronen <i>et al.</i> , 1999)        |
|                  |                                   | 41, 74 et 230 ppb <sup>a</sup>        |                          |                             |                      |                                           |                     | Blocage Spg A                   |                                      |
|                  | Carrelet                          | 1 et 10 mg/kg <sup>c</sup>            | RAS                      | RAS                         | -                    | -                                         | RAS                 | RAS                             | (Zaroogian <i>et al.</i> , 2001)     |
|                  |                                   | 100 mg/kg <sup>c</sup>                | Diminution               | 0% développé                |                      |                                           | Hypertrophie        | Blocage Spg A/B                 |                                      |
| o,p'-DDT         | Carrelet                          | 15 mg/kg <sup>c</sup>                 | RAS                      | RAS                         | -                    | -                                         | RAS                 | RAS                             | (Zaroogian <i>et al.</i> , 2001)     |
|                  |                                   | 30 et 60 mg/kg <sup>c</sup>           | Diminution avec atrophie | Disparition                 |                      |                                           | Hypertrophie        | Blocage Spg A/B                 |                                      |
| p,p'-DDT         | Carrelet                          | 15, 30 et 60 mg/kg <sup>c</sup>       | RAS                      | RAS                         | -                    | -                                         | RAS                 | RAS                             | (Zaroogian <i>et al.</i> , 2001)     |
| Prochloraz       | Truite                            | 21 et 175 nmol/l <sup>a</sup>         | -                        | -                           | -                    | -                                         | -                   | Inhibition dose dépendante      | (Le Gac <i>et al.</i> , 2001)        |
| Estuaire de Tyne | Carrelet                          | -                                     | -                        | -                           | -                    | -                                         | Hypertrophie        | Asynchrone, Spz anormaux        | (Gill <i>et al.</i> , 2002)          |
| Moselle          | Chevesne                          | -                                     | -                        |                             | Déstructuration      | Hyperplasie des € de Sertoli              | -                   | € spermatiques nécrotiques      | (Flammarion <i>et al.</i> , 2000)    |
| j : jours        | <sup>a</sup> exposition via l'eau | <sup>c</sup> exposition par injection | RAS : rien à signaler    |                             |                      | Spg : Spermatogonie                       | Spz : Spermatozoïde | € : Cellules                    |                                      |

**Annexe 18 : Affinité entre les récepteurs RE issus de plusieurs espèces de poisson et différents œstrogènes mimétiques.**

| Substances       | Carpe<br>(Kloas <i>et al.</i> , 2000) |       | Saumon<br>(Tollesfen <i>et al.</i> , 2002) |       | Truite<br>(Tollesfen <i>et al.</i> , 2002) |        | Truite<br>(Latonnelle <i>et al.</i> , 2002a) |        | Esturgeon<br>(Latonnelle <i>et al.</i> , 2002a) |        | Anguille<br>(Andreassen et Korsgaard, 2000) |      |
|------------------|---------------------------------------|-------|--------------------------------------------|-------|--------------------------------------------|--------|----------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------|------|
|                  | IC <sub>50</sub><br>(nM)              | AR    | IC <sub>50</sub><br>(nM)                   | AR    | IC <sub>50</sub><br>(nM)                   | AR     | IC <sub>50</sub> (nM)                        | AR     | IC <sub>50</sub> (nM)                           | AR     | IC <sub>50</sub> (nM)                       | AR   |
| E2               | 32                                    | 100   | 2,1                                        | 100   | 6,6                                        | 100    | 7                                            | 100    | 5                                               | 100    | 6,2                                         | 100  |
| E1               | 61                                    | 52    | 48                                         | 3,9   | 190                                        | 6,1    | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| EE2              | -                                     | -     | 4,4                                        | 55    | 8,6                                        | 84     | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| Bio A            | -                                     | -     | -                                          | -     | -                                          | -      | >100000                                      | <0,007 | >100000                                         | <0,005 | -                                           | -    |
| Coumestrol       | -                                     | -     | -                                          | -     | -                                          | -      | 400                                          | 1,75   | 150                                             | 3,5    | -                                           | -    |
| Diad             | -                                     | -     | -                                          | -     | -                                          | -      | 9050                                         | 0,077  | 83000                                           | 0,006  | -                                           | -    |
| Equol            | -                                     | -     | -                                          | -     | -                                          | -      | 5300                                         | 0,13   | 8300                                            | 0,06   | -                                           | -    |
| Formononetine    | -                                     | -     | -                                          | -     | -                                          | -      | 260                                          | 2,69   | 1090                                            | 0,5    | -                                           | -    |
| Gen              | -                                     | -     | 390                                        | 0,48  | 210                                        | 3,6    | 570                                          | 1,22   | 220                                             | 2,3    | -                                           | -    |
| Zon              | -                                     | -     | 340                                        | 0,70  | 260                                        | 2,5    | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| 4-NP             | 68860                                 | 0,047 | 18000                                      | 0,012 | < 50 %                                     | -      | -                                            | -      | -                                               | -      | 3430                                        | 0,18 |
| 4-OP             | 32050                                 | 0,099 | 10000                                      | 0,02  | 40000                                      | 0,01   | -                                            | -      | -                                               | -      | 5900                                        | 0,11 |
| BPA              | 26620                                 | 0,12  | -                                          | -     | -                                          | -      | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| DEP              | 49940                                 | 0,064 | -                                          | -     | -                                          | -      | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| Aroclor          | < 50 %                                | -     | -                                          | -     | -                                          | -      | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| 3,3',4,4'-TCB    | 39700                                 | 0,081 | -                                          | -     | -                                          | -      | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| <i>p,p'</i> -DDT | 1487350                               | 0,002 | -                                          | -     | -                                          | -      | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| <i>o,p'</i> -DDT | -                                     | -     | < 50 %                                     | -     | 190000                                     | 0,0038 | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |
| Dieldrine        | -                                     | -     | 0 %                                        | -     | 0 %                                        | -      | -                                            | -      | -                                               | -      | -                                           | -    |

IC<sub>50</sub> : Concentration nécessaire pour déplacer 50 % de l'œstradiol

AR : Affinité relative = (IC50 de E2 / IC 50 de S) x 100

## Annexe 19 : Production anormale de vitellogénine induite par l'œstrone et l'œstradiol chez différentes espèces piscicoles.

| Toxiques | Poissons               | Sexe             | Exposition                             | Traitement                                           | VTG mesuré                                  | Références                           |
|----------|------------------------|------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| E1       | Truite                 | mature           | pdt 3 s                                | 0 ; 6,25 ; 12,5 ; 25 ; 50 ;<br>100 ng/l <sup>a</sup> | 0,09 ; 0,03 ; 0,06 ; 1 ; 2 ;<br>1000* µg/ml | (Routledge <i>et al.</i> , 1998)     |
| E2       | Anguille vivipare      | mature           | 1 inj/s pdt 25 j                       | 0,5 µg/g <sup>c</sup>                                | 10 mg/ml                                    | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998b) |
|          | Carpe                  | Immature         | pdt 110 j                              | 10 ; 100 µg/l <sup>a</sup>                           | > 500 * ; > 5000 * µg/ml                    | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998a)       |
|          | Carpe mâle             | mature           | pdt 2 m                                | 0,1 ; 1 µg/l <sup>a</sup>                            | 50 * ; 1000 * µg/ml                         | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998b)       |
|          | Carrelet               | mature           | 2 inj / 2 s<br>apr 4 , 6 ,<br>8 , 15 s | 0,1 mg/kg <sup>c</sup>                               | 2,15 * ; 1,62 ; n.d. '                      | (Folmar <i>et al.</i> , 2001)        |
|          |                        |                  |                                        | 1 mg/kg <sup>c</sup>                                 | 9,68 * , 4,75 * , 0,98 * , 0,09 *           |                                      |
|          |                        |                  |                                        | 10 mg/kg <sup>c</sup>                                | 9,16 * , n.d. ' '                           |                                      |
|          | Flet                   | mature           | pdt 6 , 10 j                           | 0,05 mg/kg <sup>b</sup>                              | 200 * , 1500 * µg/ml                        | (Madsen <i>et al.</i> , 2002)        |
|          | Poisson chat           | mature           | pdt 21 j                               | 10 ; 100 µg/l <sup>a</sup>                           | 64,4 ; 92,3 mg/ml                           | (Tilton <i>et al.</i> , 2002)        |
|          | Chevesne               | mature           | 2 inj / 2 s                            | 0 ; 2 mg/kg <sup>c</sup>                             | 5 ; 1000 µg/ml                              | (Flammarion <i>et al.</i> , 2000)    |
|          |                        | mature           | apr 14 j                               |                                                      | 50 ; 1000 µg/ml                             |                                      |
|          | Médaka                 | mature<br>mature | 1 inj/2 j pdt 10 j                     | 0 ; 300 ng/poisson <sup>c</sup>                      | 0,1 ; < 0,7* io<br>< 0,3 ; < 0,6* io        | (Zhang <i>et al.</i> , 2002)         |
|          | Poisson plat           | mature           | pdt 28 j                               | 96 µg/l <sup>a</sup>                                 | +                                           | (Kinnberg <i>et al.</i> , 2000)      |
|          | Saumon                 | immature         | 1 inj                                  | 5 mg/kg <sup>c</sup>                                 | 1,4* io                                     | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
|          | <i>Sparatus aurata</i> | mature           | 1 inj<br>apr 3 , 10 , 30 j             | 5 mg/kg <sup>c</sup>                                 | < 1 ; 7 ; 21 mg/ml                          | (Funkenstein <i>et al.</i> , 2000)   |
|          | Truite arc-en-ciel     | immature         | 1 inj ; apr 9 j                        | 0,5 mg/kg <sup>c</sup>                               | 5000 µg/ml                                  | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998a) |
|          | Truite arc-en-ciel     | mature           | pdt 3 s                                | 0 ; 1 ; 10 ; 25 ; 100 ng/l <sup>a</sup>              | 0,2 ; 0,3 ; 0,5 ; 3,0 ; 2000 * µg/ml        | (Routledge <i>et al.</i> , 1998)     |
|          | Esturgeon              | Hépatocyte       | pdt 4-6 j                              | 10 nM                                                | 140 ng/l                                    | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)    |
|          | Truite arc-en-ciel     | Hépatocyte       | pdt 4-6 j                              | 10 nM                                                | 562 ng/l                                    | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)    |
| E1+E2    | Truite arc-en-ciel     | mature           | pdt 3 s                                | 25 + 25 ng/l <sup>a</sup>                            | 20000 * µg/ml                               | (Routledge <i>et al.</i> , 1998)     |

j : jours      s : semaines      m : mois      <sup>a</sup> : via l'eau      <sup>b</sup> : via l'alimentation      <sup>c</sup> : par injection      i.o : intensité optique significative      \* différence significative  
inj : injection      pdt : pendant (durée d'exposition)      apr : après (tps après l'exposition)

**Annexe 20 : Production anormale de vitellogénine induite par l'éthinylœstradiol et les phytoestrogènes chez différentes espèces piscicoles.**

| Toxiques | Poissons           | Sexe        | Exposition                             | Traitement                                       | VTG mesuré                                            | Références                             |
|----------|--------------------|-------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| EE2      | Carpe              | mature      | 1 inj; apr 8 j                         | 500 µg/kg <sup>c</sup>                           | 150 io/mg de protéine                                 | (Solé <i>et al.</i> , 2000)            |
|          |                    | mature      |                                        |                                                  | 164 io/mg de protéine                                 |                                        |
|          | Tête de boule      | mature      | pdt 3 s                                | 0 ; 0,1 ; 1 ; 3 ; 10 ; 100<br>ng/l <sup>a</sup>  | 0,1 ; 0,1 ; 1 ; 50 * ; 80 * ; 90 * µg/ml              | (Pawlowski <i>et al.</i> ,<br>2004b)   |
|          |                    | mature      |                                        |                                                  | 10 ; 10 ; 50 * ; 100 * ; > 100 * ; > 100 *<br>µg/ml   |                                        |
|          | Truite arc-en-ciel | immature    | 1 inj ; apr 9 j                        | 5 mg/kg <sup>c</sup>                             | 50000 µg/ml                                           | (Christiansen <i>et al.</i> ,          |
|          | Zèbre              | immature    | fertilisat°-éclos°                     | 15,4 ng/l <sup>a</sup>                           | > 5000 * µg/g de poisson                              | (Andersen <i>et al.</i> , 2003)        |
|          |                    |             | éclos°-10 j                            |                                                  | > 500 * µg/g de poisson                               |                                        |
|          |                    |             | 10-20 j                                |                                                  | 100 * µg/g de poisson                                 |                                        |
|          |                    |             | 20-30 j                                |                                                  | 1000 * µg/g de poisson                                |                                        |
|          |                    |             | éclos°-25 j                            |                                                  | 1000 * µg/g de poisson                                |                                        |
|          | Zèbre              | immature    | éclos°-30 j                            | 15,4 ng/l <sup>a</sup>                           | 1000 * µg/g de poisson                                | (Andersen <i>et al.</i> , 2003)        |
|          |                    |             | pdt 25 j<br>apr 25 , 32 ,<br>39 , 46 j |                                                  | > 5000 * ; > 500 * ; > 50 * ; 10 *<br>µg/g de poisson |                                        |
|          | Zèbre              | immature    | pdt 3 m                                | 0,1 ; 1 ; 10 ; 25 ng/l <sup>a</sup>              | n.d. ; 200 ; 500 * ; 1200 *<br>ng/mg de poisson       | (Van der Belt <i>et al.</i> ,<br>2003) |
| DES      | Truite arc-en-ciel | immature    | 1 inj ; apr 9 j                        | 5 mg/kg <sup>c</sup>                             | 50000 µg/ml                                           | (Christiansen <i>et al.</i> ,          |
| Form     | Esturgeon          | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 180 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |
|          | Truite arc-en-ciel | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 130 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |
| Bio A    | Esturgeon          | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 120 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |
|          | Truite arc-en-ciel | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 250 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |
| Equole   | Esturgeon          | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 195 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |
| Equole   | Truite arc-en-ciel | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 250 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |
| Gén      | Médaka             | et mature   | 1 inj / 2 j pdt 10 j                   | 75 ; 750 ; 30000<br>ng/g de poisson <sup>c</sup> | non différent du contrôle                             | (Zhang <i>et al.</i> , 2002)           |
|          | Truite arc-en-ciel | mature      | pdt 10 m <sup>b</sup>                  | 0 ; 500 ; 1000 ppm <sup>b</sup>                  | 0,5 ; >1,5 ; 2,5 * µg/ml                              | (Bennetau-Pelissero <i>et</i>          |
|          | Esturgeon          | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 165 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |
|          | Truite arc-en-ciel | Hépatocytes | pdt 4-6 j                              | 10 µM                                            | 250 ng/l                                              | (Latonnelle <i>et al.</i> , 2000)      |

**Annexe 21 : Production anormale de vitellogénine induite par les alkylphénols, le bisphenol A, les phtalates, les PCBs et les pesticides chez différentes espèces piscicoles.**

| Toxiques        | Poissons                             | Sexe     | Exposition           | Traitement                                    | VTG mesuré                             | Références                           |
|-----------------|--------------------------------------|----------|----------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|
| 4-NP            | Anguille<br><i>Zoarces viviparus</i> | mature   | 1 inj/s ; pdt 25 j   | 10 ; 100 µg/g <sup>c</sup>                    | 2 ; 8 mg/ml                            | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998b) |
|                 | Carpe                                | mature   | pdt 38-31 j          | 0,1 ; 0,3 ; 1 ; 3 ; 10 µg/l <sup>a</sup>      | non différent du contrôle              | (Villeneuve <i>et al.</i> , 2002)    |
|                 | Carrelet                             | mature   | 1 inj ; apr 7 j      | 100 mg/kg                                     | 36,7 * µg/ml                           | (Hashimoto <i>et al.</i> , 2000)     |
|                 | Poisson plat                         | mature   | pdt 28 j             | 80 ; 320 ; 640 ; 960 ; 1280 µg/l <sup>a</sup> | 0 ; + ; + ; + ; +                      | (Kinnberg <i>et al.</i> , 2000)      |
|                 | Saumon                               | immature | 1 inj                | 25 mg/kg <sup>c</sup>                         | 1,5 * ua                               | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
|                 | Truite arc-en-ciel                   | immature | 1 inj ; apr 9 j      | 50 mg/kg <sup>c</sup>                         | 100 µg/ml                              | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998a) |
|                 | Truite arc-en-ciel                   | immature | pdt 1 an             | 1 ; 10 µl <sup>a</sup>                        | 0,015 * ; 0,07 * bi/µg de prot         | (Ackermann <i>et al.</i> , 2002)     |
| NPE2O           | Truite arc-en-ciel                   | mature   | pdt 9 j,             | 450 ; 1800 mM                                 | 238 * ; 2179 * ng/ml                   | (Le Gac <i>et al.</i> , 2001)        |
|                 |                                      |          | pdt 21 j             |                                               | 27 ; 4750 * ng/ml                      |                                      |
| 4- <i>t</i> -OP | Flet                                 | mature   | pdt 6 j              | 10 ; 50 ; 100 mg/kg <sup>b</sup>              | 20 * ; 1500 * ; 600 * µg/ml            | (Madsen <i>et al.</i> , 2002)        |
|                 |                                      |          | pdt 10 j             |                                               | 150 * ; 10000 * ; 2000 * µg/ml         |                                      |
|                 | Gardon                               | mature   | pdt 3 s <sup>a</sup> | 0 ; 1 ; 10 ; 100 µg/l <sup>a</sup>            | 0,02 ; 0,1 ; 0,15 ; 150 µg/ml          | (Routledge <i>et al.</i> , 1998)     |
|                 | Truite arc-en-ciel                   | mature   | pdt 6 , 11 j         | 50 mg/kg <sup>c</sup>                         | > 100 * , > 500 * µg/ml                | (Pedersen <i>et al.</i> , 2003)      |
|                 |                                      | mature   |                      |                                               | > 100 * µg/ml                          |                                      |
| BPA             | Saumon                               | immature | 1 inj                | 1 ; 5 ; 25 ; 125 mg/kg <sup>c</sup>           | < 0,05 ; < 0,05 ; 0,15 * ; 1,2 * ua    | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
|                 | Truite arc-en-ciel                   | immature | 1 inj ; apr 9 j      | 50 mg/kg <sup>c</sup>                         | 50 µg/ml                               | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998a) |
| BBP             | Truite arc-en-ciel                   | immature | 1 inj ; apr 9 j      | 500 mg/kg <sup>c</sup>                        | < 5 µg/ml                              | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998a) |
| DBP             | Truite arc-en-ciel                   | immature | 1 inj ; apr 9 j      | 500 mg/kg <sup>c</sup>                        | < 1 µg/ml                              | (Christiansen <i>et al.</i> , 1998a) |
| TPP             | Carpe                                | immature | pdt 110 j            | 0 ; 36 ; 90 ; 256 µg/l <sup>a</sup>           | 0,5 ; 1 ; 10 ; 100 * µg/ml             | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998a)       |
|                 | Carpe                                | mature   | pdt 2 m              | 0 ; 32 ; 100 ; 320 ; 1000 µg/l <sup>a</sup>   | 0,01 ; 0,01 ; 0,01 ; 0,1 ; 100 * µg/ml | (Gimeno <i>et al.</i> , 1998b)       |
| A1254           | Saumon                               | immature | 1 inj                | 5 mg/kg <sup>c</sup>                          | < 0,1 ua                               | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
| o,p'-DDT        | Saumon                               | immature | 1 inj                | 25 mg/kg <sup>c</sup>                         | < 0,1 ua                               | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
| -HCH            | Saumon                               | immature | 1 inj                | 10 mg/kg <sup>c</sup>                         | < 0,1 ua                               | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
| NP + BPA        | Saumon                               | immature | 1 inj                | 25 mg/kg + 5 mg/kg <sup>c</sup>               | 1,4 * ua                               | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
| NP + A1254      | Saumon                               | immature | 1 inj                | 25 mg/kg + 5 mg/kg <sup>c</sup>               | 1,3 * ua                               | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
| NP + o,p'-DDT   | Saumon                               | immature | 1 inj                | 25 mg/kg + 25 mg/kg <sup>c</sup>              | 1,2 * ua                               | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |
| NP + -HCH       | Saumon                               | immature | 1 inj                | 25 mg/kg + 10 mg/kg <sup>c</sup>              | 0,9 ua                                 | (Arukwe <i>et al.</i> , 2000)        |

**Annexe 22 : Production anormale de vitellogénine induite par des effluents de STEP's ou par la contamination d'eaux de surfaces chez différentes espèces piscicoles.**

| Poisson                    | Sites                                  | Pays        | Sexe      | Controles                          | Animaux contaminés                                                       | Années                          | Références                         |                            |
|----------------------------|----------------------------------------|-------------|-----------|------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------------|
| Truite arc-en-ciel         | Tame/Trent                             | Angleterre  | mature    | <100 ng/ml                         | >100 µg/ml                                                               | 1998                            | (Fawell <i>et al.</i> , 2001)      |                            |
| Chevesne                   | Drôme                                  | France      | mature    | n.d.                               | 32 ng/ml                                                                 | 1998                            | (Flammarion <i>et al.</i> , 2000)  |                            |
| Carrelet                   | Baie deTokyo                           | Japon       | mature    | n.d.                               | 100 – 1300 ng/ml                                                         | 1998                            | (Hashimoto <i>et al.</i> , 2000)   |                            |
| Brème                      | Dommel                                 | Pays bas    | mature    | 100 ng/ml                          | 50 mg/ml                                                                 | 1999                            | (Vethaak <i>et al.</i> , 2002)     |                            |
| Carrelet                   | Amsterdam<br>(canal de la mer du nord) | Pays bas    | mature    | <500 - 1000 ng/ml                  | 5000 - <10000 ng/ml                                                      | 1999                            | (Vethaak <i>et al.</i> , 2002)     |                            |
| Tilapia                    | Rivière Ouémé                          | Bénin       | mature    | n.d.                               | 38 ; 25 ; 5 ; 3 ; 1 mg/ml<br>de Calavi à Bonou                           | 2000                            | (Okoumassoun <i>et al.</i> , 2002) |                            |
| Truite arc-en-ciel         | STEP                                   | Suisse      | Immature  | n.d. (amont)                       | 1,5 mg/ml (aval)                                                         | 1997                            | (Larsson <i>et al.</i> , 1999)     |                            |
| Poisson chat               | STEP A                                 | USA         | mature    | 100 %                              | 220 % *                                                                  | Automne 1997                    | (Tilton <i>et al.</i> , 2002)      |                            |
|                            |                                        |             |           |                                    | 370 % *                                                                  | Printemps1997                   |                                    |                            |
|                            |                                        |             |           |                                    | n.d. %                                                                   | Automne 1998                    |                                    |                            |
|                            |                                        |             |           |                                    | < 190 %                                                                  | Eté1998                         |                                    |                            |
|                            | STEP B                                 | USA         | mature    | 100 %                              | <190 %                                                                   | Automne 1997                    | (Tilton <i>et al.</i> , 2002)      |                            |
|                            |                                        |             |           |                                    | 370 % *                                                                  | Printemps1997                   |                                    |                            |
|                            |                                        |             |           |                                    | 480 % *                                                                  | Automne 1998                    |                                    |                            |
|                            |                                        |             |           |                                    | 100 %                                                                    | Eté1998                         |                                    |                            |
| Truite arc-en-ciel         | STEP Harpenden                         | Angleterre  | mature    | > 10 ng/ml (amont)                 | >10 mg/ml (aval)                                                         | 1994                            | (Harries <i>et al.</i> , 1999)     |                            |
|                            | STEP Chelmsford                        | Angleterre  | +         | > 1000 ng/ml (amont)               | >10 mg/ml (aval)                                                         | 1996                            | (Harries <i>et al.</i> , 1999)     |                            |
|                            | STEP Chelmsford                        | Angleterre  | +         | (50 % dilué)<br>> 10 ng/ml (amont) | (50 % dilué)<br>>10 µg/ml (aval)                                         | 1996                            | (Harries <i>et al.</i> , 1999)     |                            |
| Bar sunshine<br>(New York) | STEP 26W                               | USA         | Larve     | 100 %                              | 290 %                                                                    | 2000                            | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)     |                            |
|                            | STEP RH                                | USA         | Larve     | 100 %                              | 320 % *                                                                  | 2000                            | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)     |                            |
|                            | STEP NC                                | USA         | Larve     | 100 %                              | 380 % *                                                                  | 2000                            | (Todorov <i>et al.</i> , 2002)     |                            |
| Tête de boule              | STEP                                   | USA         | mature    | 0 mg/ml<br>(50 m en aval)          | 80 m en amont : 100<br>150 m en amont : 150<br>8000 m en amont : 0 mg/ml | 2000                            | (Hemming <i>et al.</i> , 2004)     |                            |
| Inj : injection            | Pdt : pendant                          | Apr : après | j : jours | s : semaines                       | <sup>a</sup> via l'eau                                                   | <sup>b</sup> via l'alimentation | <sup>c</sup> par injection         | * différence significative |



int- 2004073 S



2004.0735

## **Résumé**

Les œstrogènes mimétiques sont des polluants présents dans l'environnement aquatique. Ces composés induisent des anomalies au niveau du système reproducteur des poissons mâles, aboutissant à une féminisation partielle ou totale des mâles ou bien à leur démasculinisation. Finalement, ces altérations peuvent conduire à la disparition des espèces piscicoles touchées. De plus, ces toxiques possèdent la capacité de mimer les œstrogènes endogènes et d'induire la production anormale de vitellogénine chez les poissons mâles et immatures. L'objectif de ce travail est de développer une méthode simple, spécifique et rapide, pour détecter *in situ*, la contamination des poissons mâles par les œstrogènes mimétiques, utilisant comme biomarqueur la VTG. La méthode sélectionnée est basée sur un test d'agglutination, mis au point avec des anticorps monoclonaux spécifiques de ce biomarqueur. Le développement de ce test VTG-LAT, a impliqué la mise au point d'une nouvelle méthode de purification de la VTG de carpe dans le but de produire des anticorps monoclonaux spécifiques de cette protéine. De plus, il a été nécessaire d'optimiser le processus d'adsorption des anticorps monoclonaux sur les billes de latex en terme de taille de billes, de pH et de concentrations en anticorps. L'optimisation du processus d'immunoagglutination a également été étudiée. Le test d'agglutination VTG-LAT développé possède la capacité de reconnaître les différentes molécules de VTG de plusieurs espèces de poissons (vandoise, chevesne, gardon, perche...) et il est également possible avec cette méthode de différencier les femelles en vitellogénèse des poissons contaminés par des œstrogènes mimétiques.

## **Mots clés**

Œstrogènes mimétiques ; Féminisation des poissons ; Vitellogénine ; Test d'agglutination ; Anticorps monoclonaux.

## **Abstract**

Estrogen mimics are pollutants present in aquatic environment. These compounds induce abnormalities in the reproductive system of male fishes, which lead to a total or partial male feminization, or to their demasculinization. Finally, these alterations could lead to a disappearance of the total contaminated fish populations. Moreover, these toxics possess the capacity to mimic endogenous estrogens and to induce the abnormal production of vitellogenin (VTG) in male and immature fishes. The purpose of this research was to develop an easy, specific and fast method for the field detection of male fish contamination by estrogen mimics, using VTG as biomarker. The selected method is based on a latex agglutination test (LAT), developed with monoclonal antibodies specific of this biomarker. The development of this VTG-LAT, has involved a new purification method of carp VTG in order to produce monoclonal antibodies specifics of this protein. Moreover, it was necessary the optimization of the antibodies adsorption process in terms of particle diameters, pH and antibodies concentration. The optimization of immunoagglutination process was also verified. The VTG-LAT developed possess the capacity to recognize different VTG molecules of several fish species (dace, chub, roach, perch ...) and it is possible by this method to differentiate vitellogenic females from contaminated fishes by estrogen mimics.

## **Keywords**

Estrogen mimics; Fish feminization; Vitellogenin; Latex agglutination test; Monoclonal antibodies.