



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Influence des xénobiotiques sur la reproduction du goujon *Gobio gobio* L. en rivière: recherche de biomarqueurs d'exposition

Pauporte, Dimitri

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR

Faculté des Sciences

INFLUENCE DES XENOBIOTIQUES SUR LA REPRODUCTION DU GOUJON
GOBIO GOBIO L. EN RIVIERE. RECHERCHE DE BIOMARQUEURS
D'EXPOSITION

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de licencié en Sciences biologiques**

Dimitri PAUORTE
Août 2004

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. + 32(0)81.72.44.18 - Telefax + 32(0)81/72.44.20
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be – <http://fundp.ac.be/fundp.html>

Impact des xénobiotiques sur la reproduction du goujon en rivières wallonnes : mise en place de biomarqueurs

PAUPORTE Dimitri

Résumé

Depuis une vingtaine d'années, un intérêt grandissant est apparu tant au niveau public que scientifique autour des xénobiotiques retrouvés dans l'environnement et capables d'interférer avec le système endocrinien des individus constituant la faune des écosystèmes aquatiques. Parmi les différentes réponses biologiques qu'un organisme peut présenter après une exposition à un polluant, les réponses biologiques attribuées au paramètre de la reproduction allient sensibilité et pertinence écologique. Dans le cadre de ce mémoire, nous avons donc comparé l'effet de l'impact des xénobiotiques sur la concentration en stéroïdes sexuels avec la morphologie et l'histopathologie des gonades de goujons prélevés sur des stations potentiellement polluées par des PCBs (Vaus-Sous-Chèvremont, sur la Vesdre) ainsi que par des effluents d'une usine de pâte à papier (Lamorteau, sur le Ton). Les résultats récoltés ont été comparés avec ceux obtenus sur des sites de référence (Habay-La-Vieille, sur la Rulle et Harnoncourt, sur le Ton).

Introduction

La croissance et le développement des activités humaines liées à l'industrie et l'agriculture s'accompagnent dans tous les cas de perturbations environnementales, le système aquatique représentant bien souvent le récepteur terminal des polluants émis. Au cours de ces deux dernières décennies, un intérêt public mais aussi scientifique s'est considérablement développé autour d'un type particulier de polluants retrouvé dans l'écosystème aquatique. En effet, certains de ces composés se sont révélés être capables d'interférer avec le système endocrinien (xénobiotiques).

Ces polluants peuvent causer chez les poissons une variété de réponses biologiques allant du niveau biochimique, aux niveaux des populations et des communautés. Parmi ces réponses biologiques, celles attribuées au paramètre de la reproduction ont été choisies, ce processus jouant un rôle essentiel au maintien et à la propagation d'une population. Certains xénobiotiques sont connus pour leurs effets néfastes sur la fonction reproductive de nombreux organismes. Ainsi, les pesticides organochlorés, les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les PCBs, les métaux lourds et les mélanges complexes tels que les effluents d'usines papetières ou de traitements des boues d'épuration peuvent être à l'origine de perturbations du système reproducteur chez plusieurs espèces de poissons.

Selon Kime (1999), ces perturbations peuvent altérer directement les organes sexuels par des dégradations de leur structure et/ou de leur fonctionnement. D'autre part, ils peuvent intervenir en tant que perturbateurs du système endocrinien, particulièrement sensibles à de faibles doses de polluants.

Afin de mettre en évidence ces différents effets sur la reproduction du goujon, nous avons comparé les résultats d'indicateurs biochimiques de l'exposition, tels que la concentration en stéroïdes sexuels qui intègre des effets à courts termes avec les résultats apportés par l'analyse morphologique et histopathologique des gonades, qui intègrent des effets à plus longs termes (la durée de vie de l'individu).

Pour ce faire, plusieurs stations ont été choisies, suivant de type de pollution potentielle. Ainsi, la station de Lamorteau située sur le Ton, en aval de l'usine de pâte à papier Burgo-Ardenne a été comparée avec celle d'Harnoncourt, située en amont du rejet de cette industrie. Le site de Vaux-Sous-Chèvremont sur la Vesdre a été choisi d'après les concentrations élevées en PCBs retrouvées dans les muscles des chevaines (Thomé, 2003). La station d'Habay-La-Vieille, sur la Rulle a été choisie comme site de référence.

Synthèse bibliographique

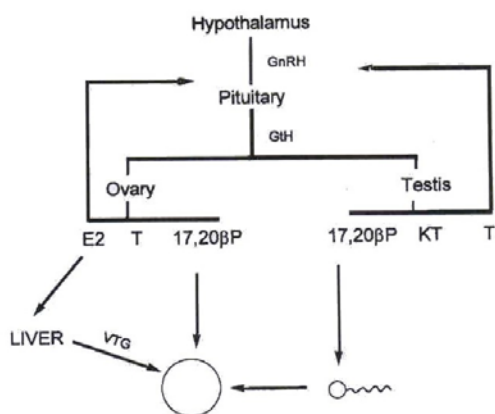


Fig.1 : Schéma simplifié de la physiologie reproductive chez les poissons. (GnRH= gonadotrophin releasing hormone ; GtH= Gonadotrophin; E2= oestradiol; T= Testostérone; 17,20βp=17,20β-dihydroxy-4-pregn-3-one; KT= 11-Ketotestosterone) (Kime, 1999)

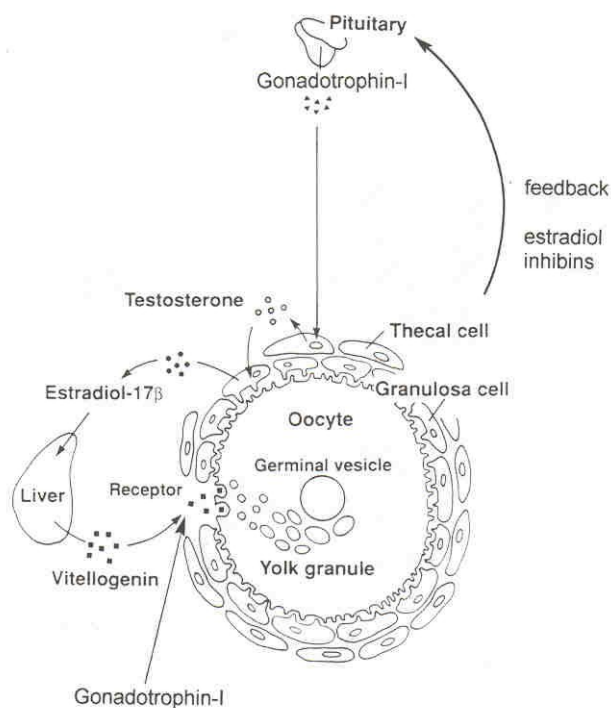


Fig.2 : Contrôle de la vitellogénèse chez les poissons (adapté de Nagahama, Y., 1994).

1) **Contrôle neuro-endocrinien de la reproduction des poissons et impact des perturbateurs endocriniens (EDCs).**

1.1) **Contrôle endocrinien de la reproduction des poissons**

Le système endocrinien des poissons englobe des relations complexes entre stimuli externes, hormones hypothalamiques et hypophysaires, hormones des glandes sexuelles et processus de dégradation des hormones par le foie (Arukwe, 2001).

L'hypothalamus, à travers l'influence de signaux environnementaux (photopériode, température, alimentation et facteurs sociaux) contrôle la synthèse et la libération d'hormones et de messagers chimiques résultant de la stimulation du système nerveux central (SNC). Les *gonadotrophin releasing hormones* (GnRH) sont libérées à partir de l'hypothalamus et stimulent à leur tour la libération de gonadotropines (GtH) par l'hypophyse (fig.1). Deux formes de GtH ont été isolées chez les téléostéens. Les GtH1 et GtH2 sont analogues, respectivement, à la FSH et LH des mammifères. La GtH1 est impliquée dans la gamétogenèse et la stéroïdogenèse, alors que la GtH2 est impliquée dans la maturation finale de la gamétogenèse. Généralement, les gonadotropines sont responsables de la stimulation de la synthèse des stéroïdes sexuels (androgènes, œstrogènes et progestagènes) lesquels agissent sur les tissus cibles pour réguler la gamétogenèse, la reproduction, les phénotypes sexuels et les comportements caractéristiques.

Chez les poissons mâles, la 11-ketotestostérone (11-KT) est l'hormone prédominante responsable pour les caractères sexuels secondaires, le comportement et le développement gonadal alors que la testostérone est sécrétée par les deux sexes, bien que ses fonctions soient encore peu claires (Kime, 1998).

L'oestradiol (E2), l'hormone majeure des poissons femelles, est produite dans les membranes folliculaires des ovocytes en développement. Cette membrane est composée de deux parties : la couche externe, la thèque, qui produit la testostérone sous l'influence de la gonadotrophine, et la couche interne, la granulosa qui convertit la testostérone en oestradiol (fig.2). Le rôle de l'oestradiol est de stimuler le foie à produire la protéine de l'œuf, la vitellogenine, qui est alors incorporée dans l'ovocyte en développement, sous l'influence de la GtH1, ce qui est responsable en grande partie de l'augmentation du poids gonadal lors de la période de recrudescence. Tout comme chez les mammifères, les stéroïdes sexuels ont un rôle de feedback envers le système hypothalamo-hypophysaire pour réguler la libération de gonadotrophine. Lorsque les organes sexuels sont matures, les sécrétions de 11-KT et de E2 cessent au profit de la synthèse d'un nouveau stéroïde : la 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P) qui va induire la maturation finale de l'ovocyte et du sperme. Les stéroïdes et surtout l'E2, seront dégradés par le foie.

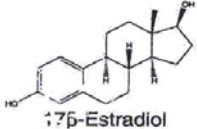
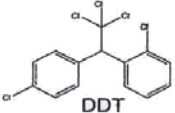
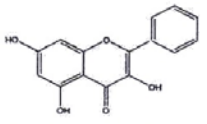
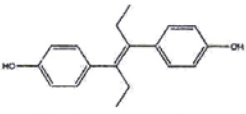
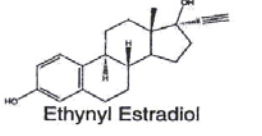
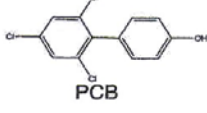
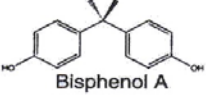
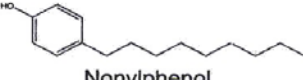
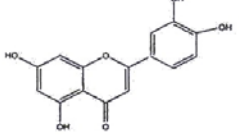
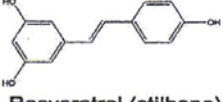
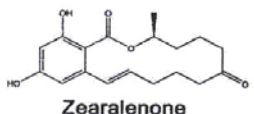
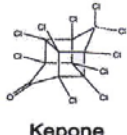
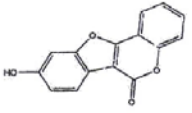
Steroids	Pollutants	Plant Products
 <p>17β-Estradiol</p>	 <p>DDT</p>	 <p>Genistein (isoflavone)</p>
<p>Pharmaceuticals</p>  <p>Diethylstilbestrol</p>  <p>Ethynyl Estradiol</p>	 <p>PCB</p>  <p>Bisphenol A</p>  <p>Nonylphenol</p>	 <p>Luteolin (flavone)</p>  <p>Resveratrol (stilbene)</p>
<p>Fungal Products</p>  <p>Zearalenone</p>	 <p>Kepone</p>	 <p>Coumestrol (coumarin)</p>

Fig.3 : Structure des principaux composés oestrogéniques provenant de différentes sources (Mclachlan, 2001).

1.2) Perturbation du contrôle neuroendocrinien

1.2.1) Notion de perturbateur endocrinien

La pollution de l'environnement aquatique se produit à partir de presque toutes les activités humaines courantes : extrait et traitement des métaux lourds, utilisation de combustibles fossiles pour le transport, chauffage et génération d'électricité, utilisation de pesticides, traitements alimentaires, production et destruction de plastiques ainsi qu'une large variété de processus industriels (Kime, 1998).

Les deux dernières décennies ont été témoins d'un intérêt scientifique grandissant, de débats publiques, et de l'attention des médias sur les effets potentiellement défavorables chez les humains et la faune sauvage d'une exposition à des substances capables d'interférer avec le système endocrinien. La liste des principales études et rapports menés sur les perturbateurs du contrôle neuroendocrinien se trouve en *annexe 1* (Damstra *et al.*, 2002).

Plusieurs termes sont utilisés dans la littérature pour définir ces substances : oestrogènes environnementaux, hormones environnementales, modulateurs endocrinien, et enfin perturbateurs endocriniens (Endocrine Disrupting Chemicals, EDCs). Cependant, Tattersfield *et al* (1997) distinguent une perturbation endocrinienne comme étant une réduction ou une augmentation du niveau en hormone au-delà d'une régulation hormonale naturelle et une modulation endocrinienne, qui correspond à un ajustement hormonal naturel. Les EDCs comprennent une large variété de classe de substances, incluant des hormones synthétiques ou naturelles, des constituants végétaux, des pesticides, des composés utilisés dans l'industrie plastique et autres polluants industriels (fig.3). Une liste plus exhaustive des substances agissant comme EDCs se trouve en *annexe 2*.

Enfin, plusieurs définitions du mot « perturbateur endocrinien » ont été proposées :

Kavlocks *et al.* (1996) définissent un perturbateur endocrinien comme étant un agent exogène qui interfère avec la production, la libération, le transport, le métabolisme, la liaison, et l'élimination des hormones naturelles dans les compartiments du corps responsables de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement.

Vos *et al.* (2000) définissent un perturbateur endocrinien comme étant une substance exogène ou un complexe de substances qui altère le fonctionnement du système endocrinien, et qui a pour conséquence de provoquer des effets néfastes sur la santé d'un organisme sain, sur la descendance ou encore sur la population d'une espèce considérée.

1.2.2) Mode d'action

De nombreuses recherches ont pu montrer que les EDCs pouvaient agir sur des sites multiples impliqués dans la régulation endocrinienne de la reproduction et ce, via différents mécanismes d'action. Une liste des différents effets observés sur la reproduction des poissons est disponible en *annexe 3* (Vos *et al.*, 2000). Les mécanismes faisant intervenir les récepteurs hormonaux ont reçu une plus grande attention, mais d'autres mécanismes comme la synthèse, le transport et le métabolisme des hormones se sont montrés également importants. Cependant les modes d'action des EDCs restent encore peu connus et cela rend difficile la distinction entre les effets directs et indirects, les effets primaires et secondaires.

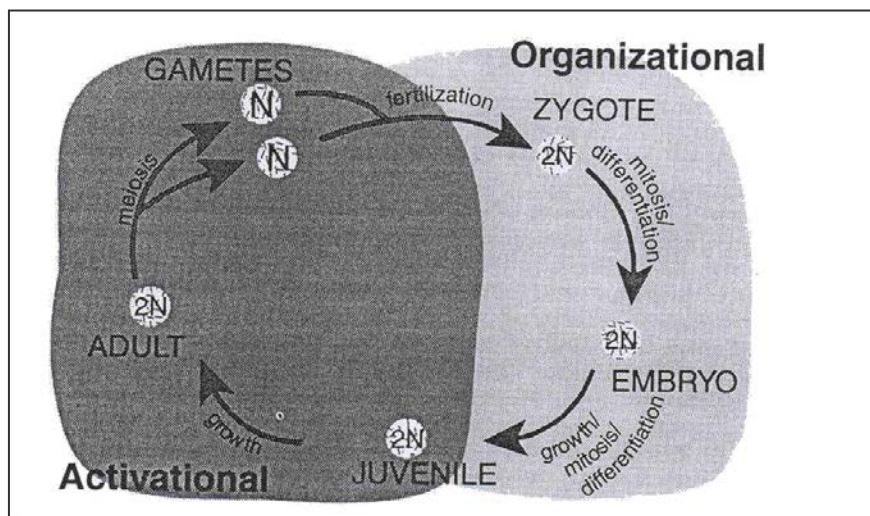


Fig.4 : Périodes typiques lors desquelles les effets organisateurs et activateurs sont induits chez un vertébré (Crain & Guillette, 1997).

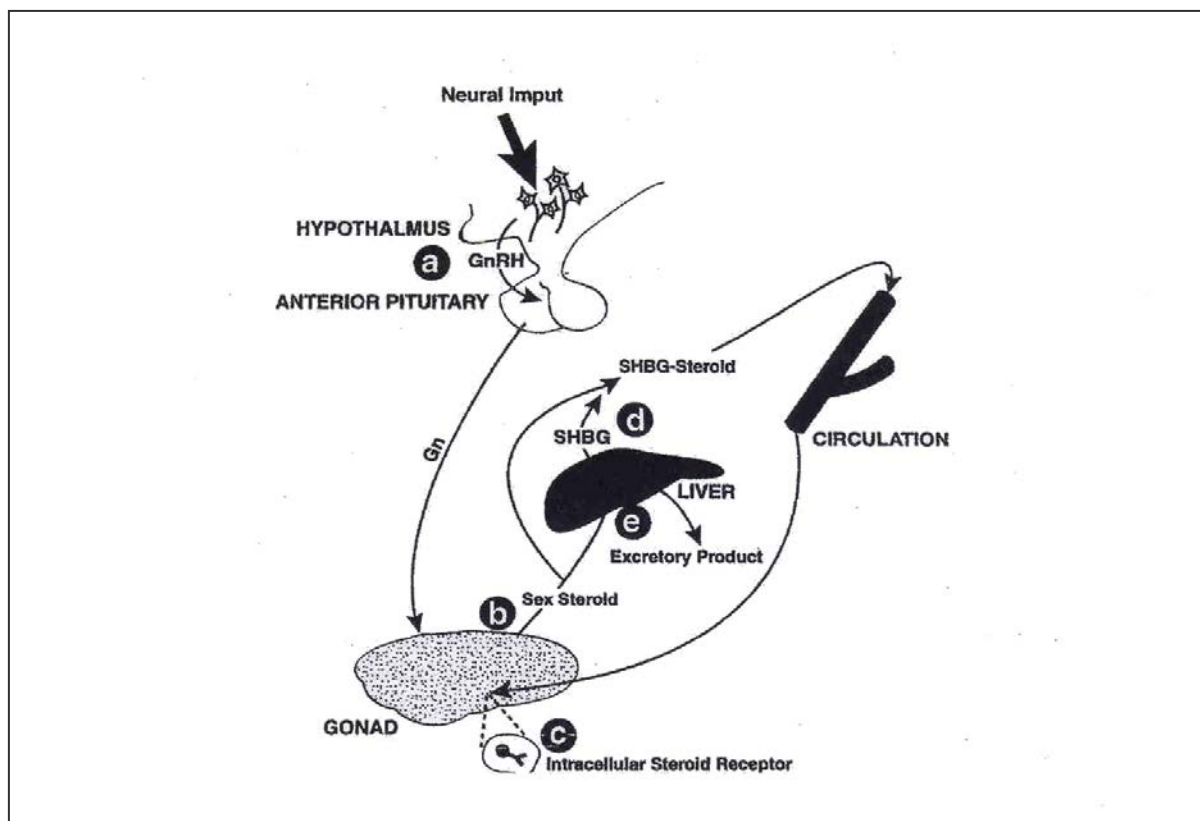


Fig.5 : Schéma général du système endocrinien indiquant les points principaux susceptibles d'être touchés par les EDC : (a) axe hypothalamo-hypophysaire, (b) stéroïdogénèse gonadale, (c) récepteurs stéroïdiens, (d) production et interaction avec les SHBGs, (e) métabolisme des stéroïdes au niveau du foie (Crain & Guillette, 1997).

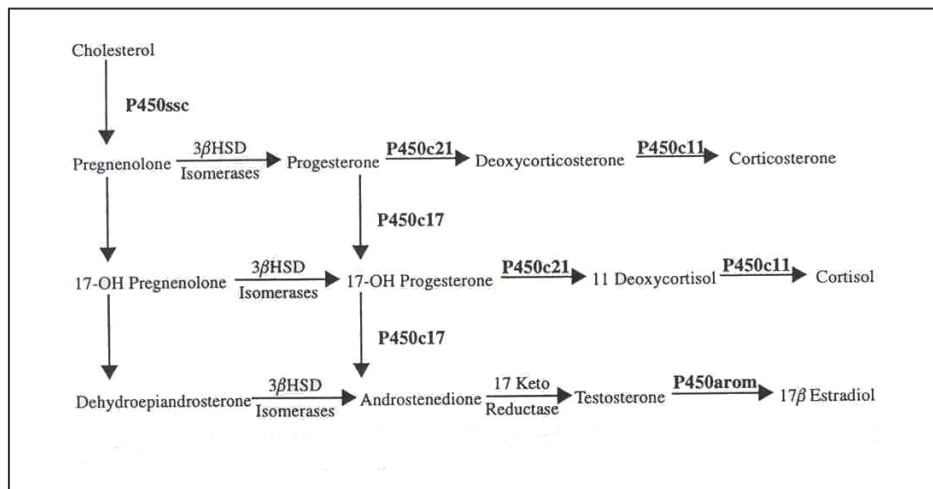


Fig.6 : Evolution de la stéroïdogénèse illustrant les enzymes de la P450 associés à la production des stéroïdes sexuels (Crain & Guillette, 1997).

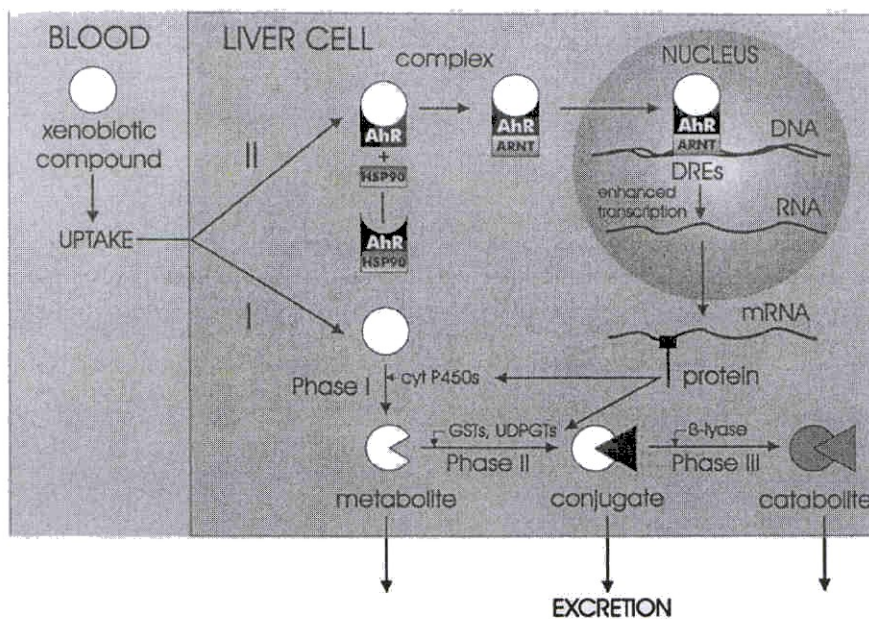


Fig.7 : Mécanisme de la transduction du signal conduisant à l'induction d'enzyme du CYP450. Un hydrocarbure polyaromatique ou un hydrocarbure polyaromatique polyhalogéné, comme les dioxines, diffusent passivement à travers la membrane plasmique et se lie au AhR cytosolique, qui devient actif. Cette activation implique la dissociation des 2 protéines de stress thermique (Hsp90) dans le cytosol et la formation d'un hétérodimère entre l'AhR et l'ARNt. Le complexe dioxine-AhR-ARNt se lie à la DRE (*dioxine response element*) dans la région du promoteur, qui initie la transcription du gène CYP1A1. Il y a ensuite métabolisation et élimination des composés toxiques en dehors de la cellule (Van Der Oost *et al.*, 2003).

Cela requiert également une certaine prudence lors de l'extrapolation des données *in vitro* à une prédiction *in vivo*.

Les effets des EDCs sur la reproduction peuvent être classés comme étant « organisateurs » ou « activateurs » (fig.4). Un contaminant qui modifie de façon permanente la morphologie ou la fonction d'un tissu suite à une exposition lors d'une période particulièrement sensible du développement, la production de gamètes lors du développement des juvéniles, est considéré comme ayant des « effets organisateurs », alors que si un EDCs altère temporairement la fonction d'un tissu normalement organisé, chez les individus matures, il aura des « effets activateurs » (Crain & Guillette, 1997).

Malgré le manque de connaissances globales sur le mode d'action des EDCs, certains mécanismes ont cependant pu être élucidés (fig.5). Ainsi les xénobiotiques peuvent altérer la fonction endocrinienne en agissant sur :

- Le contrôle endocrinien de l'axe hypothalamo-hypophysaire

L'hypothalamus et l'hypophyse régulent en amont le système endocrinien. Les polluants qui pourraient affecter leur fonction toucheront inévitablement l'intégrité de l'organisme. Peu d'études sont consacrées à cette voie de perturbation. Cependant, plusieurs substances se sont révélées être capables d'interférer avec l'axe hypothalamo-hypophysaire : les composés de BKME (*Bleached Kraft Mill Effluent*) (Van Der Kraak, 1992), le β -hexachlorocyclohexane (Wester et al., 1985 in Kime, 1998), ou encore le pesticide chlordimeform (Goldman et al., in Crain & Guillette, 1997). Par ailleurs, une étude récente permet de mettre en évidence l'impact précis des PCBs au niveau de l'hypothalamus sur une espèce de poissons (*Micropogonias undulatus*) : La teneur en GnRH est significativement plus faible dans le groupe exposé aux PCBs (Aroclor 1254 ; 1 mg/kg poisson/jour pendant 30 jours) au niveau de la POAH (aire hypothalamique préoptique antérieure), alors que la teneur en GnRH dans l'hypophyse n'est pas significativement altérée. Khan *et al.* (2001) expliquent ce phénomène par une inhibition de l'hypothalamique tryptophane hydroxylase (TPH), l'enzyme limitante dans la synthèse de la 5-HT, le neurotransmetteur monoamine sérotonine (Khan & Thomas, 2001).

-La stéroïdogénese gonadale

Les altérations dans la concentration des stéroïdes sexuels peuvent résulter de plusieurs mécanismes d'action qui incluent des effets directs sur les enzymes stéroïdogéniques ou des modifications indirectes associées à des relations de feedback altérées.

De plus, la synthèse et le métabolisme des hormones stéroïdiennes sont catalysées par une série d'étapes enzymatiques (fig.6) impliquant différentes hydroxylases de stéroïdes, réductases et d'autres enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450) qui modifient la molécule de départ, le cholestérol (Crain & Guillette, 1997). Alors qu'un nombre important d'enzyme du cytochrome P450 sont impliquées dans le processus de décontamination, d'autres sont impliquées dans la stéroïdogénèse. Selon Kime (1999), une augmentation de l'activité des monooxygénases pourrait aboutir à une dégradation plus importante des stéroïdes, mais pourrait également conduire à une diminution de leur catabolisme si les polluants sont préférentiellement utilisés comme substrat.

Tableau1 : Classification des différents EDCs suivant leur capacité à se fixer sur un type de récepteur particulier (AhRs, ER, AR).

Compound	Use	Receptor	Reference
DES	Medicine	ER α , ER β	23, 30
Bisphenol A		ER α , ER β	23, 37
Nonylphenol		ER α , ER β	23, 37
PAHs:HCB, HCH	Pesticide	AhR	25, 36
o,p'-DDT		ER α , ER β	23
p,p'-DDT		ER α , ER β	23
Methoxychlor		ER α , ER β	23
Endosulfan		ER α , ER β	23
Chlordecone		ER α , ER β	23
p,p'-DDE		AR	14, 15, 32
Linuron		AR	14, 15, 32
Vinclozolin		AR	14, 15, 32
Procymidone		AR	14, 15, 32
PCBs	Industrial waste	ER α , ER β	15, 23
Bisphenol A		ER α , ER β	23, 37
4 Tert-octylphenol		ER α , ER β	23, 37
4-Octylphenol		ER α , ER β	23, 37
TCDD		AhR	36

AhR, aryl hydrocarbon receptor; AR, androgen receptor; DES, diethylstilbesterol; ER, estrogen receptor; HCB, hexachlorobenzene; HCH, hexachlorohexane; op/pp'-DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; PCB, polychlorinated hydroxybiphenyl; p,p'-DDE, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene; TCDD, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin.

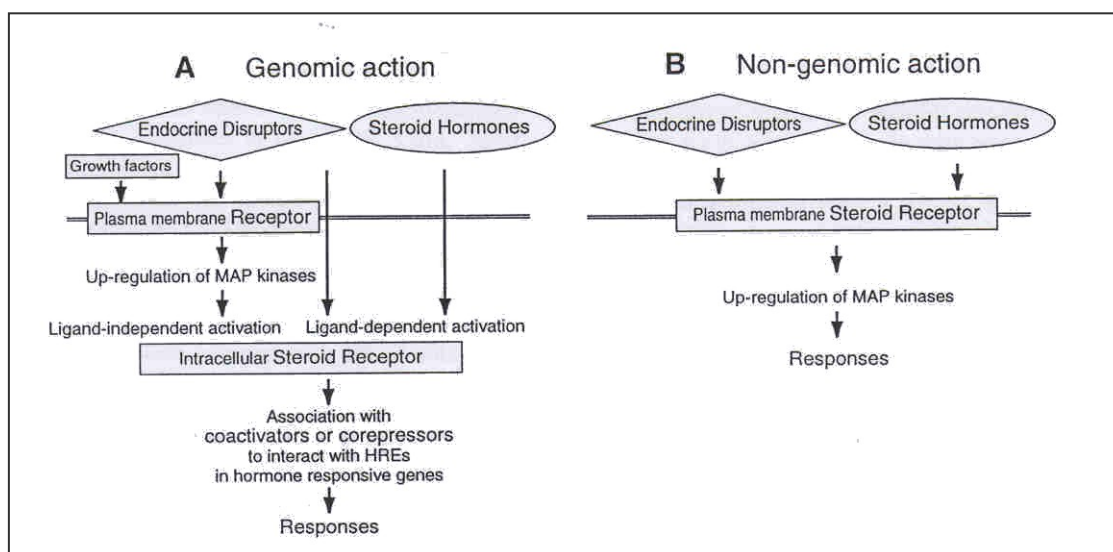


Fig.8 : Mécanisme d'action des hormones stéroïdiennes et EDCs. **A :** Action génomique. Les hormones et EDCs interagissent directement avec les récepteurs stéroïdiens intracellulaires. Cela conduit à un recrutement des co-facteurs qui vont entrer en interaction spécifique avec un élément de réponse des hormones (HREs) au niveau des gènes de réponse aux hormones. D'un autre coté les EDCs interagissent avec les récepteurs de facteurs de croissance ou de neurotransmetteurs, ce qui active le signal en cascade des protéines kinases ; cela mène à une activation ligand-indépendante des récepteurs stéroïdiens qui vont s'associer aux co-facteurs et suivre ensuite le chemin expliqué ci-dessus. **B :** Action non génomique. Les hormones et EDCs s'associent avec des récepteurs stéroïdiens situés sur la membrane cellulaire (Indarto & Izawa, 2001).

- Les protéines de transports

Une fois les hormones produites et sécrétées, elles circulent dans l'organisme, attachées à des molécules particulières, les *sex-hormon binding globulins* (SHBG) qui sont produites par le foie. Les SHBG protègent les hormones de la dégradation hépatique et aident les stéroïdes à se diriger vers le tissu cible. Une fois liés aux SHBG, ceux-ci deviennent inactifs. Peu d'études ont été réalisées sur l'interférence des SHBG avec les EDCs. Une étude récente de Tollefesen (2002) a montré que les SHBG ont plus d'affinité pour les hormones sexuelles endogènes que les EDCs (o,p'-DDT, bisphenol A, ethinyloestradiol,...) considérés lors de son étude. Néanmoins, il a été prouvé que les composés anti-oestrogéniques augmentaient la concentration plasmatique en SHBG. Cette augmentation provoque une élévation d'hormones inactives et donc, diminue la quantité d'hormones stéroïdiennes qui atteindront l'organe cible (Crain & Guillette, 1997).

- Les récepteurs hormonaux

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence la capacité qu'ont certains xénobiotiques à se lier aux récepteurs hormonaux et cela avec plus ou moins d'affinité (Loomis & Thomas, 1999; Satoh *et al.*, 2001).

Parmi les perturbateurs endocriniens identifiés jusqu'ici, les hydrocarbures arylés et les dioxines, ayant des activités oestrogéniques ou anti-oestrogéniques, se lient sur les AhRs (fig.7), alors que d'autres se lient soit sur les récepteurs oestrogéniques (ER), soit sur les récepteurs androgéniques (AR) (Indarto & Izawa, 2001). Une classification des différents EDCs suivant leurs affinités par rapport à l'un ou l'autre récepteur est représentée au tableau 1. Le mécanisme de transcription par les stéroïdes se fait par l'intermédiaire de co-facteurs, qui fonctionnent comme co-activateurs ou co-répresseurs alors que leur action non génomique dépend de récepteurs situés sur la membrane cellulaire. (Indarto & Izawa, 2001). Le mécanisme d'action général des EDCs suit ce schéma. Ils possèdent donc une « action génomique » et une « action non-génomique » (fig.8).

- L'élimination des hormones

Bien que les stéroïdes soient souvent convertis et recyclés en autres hormones, ceux-ci sont aussi excrétés après une conversion hépatique en composés hydrophiles. Une altération dans le taux d'excrétion normal des stéroïdes hormonaux pourra perturber le profil hormonal d'un animal et beaucoup de contaminants sont susceptibles d'agir comme tel : insecticides organique phosphorothionés (malathion, parathion), DDT, chlordane,... (Crain & Guillette, 1997). Des études ont montré que l'administration de malathion ou encore de parathion inhibait l'hydroxylation de la testostérone au niveau du foie chez le rat. Par contre, le DDT ainsi que le chlordane stimulent l'hydroxylation des stéroïdes (Crain, 1997).

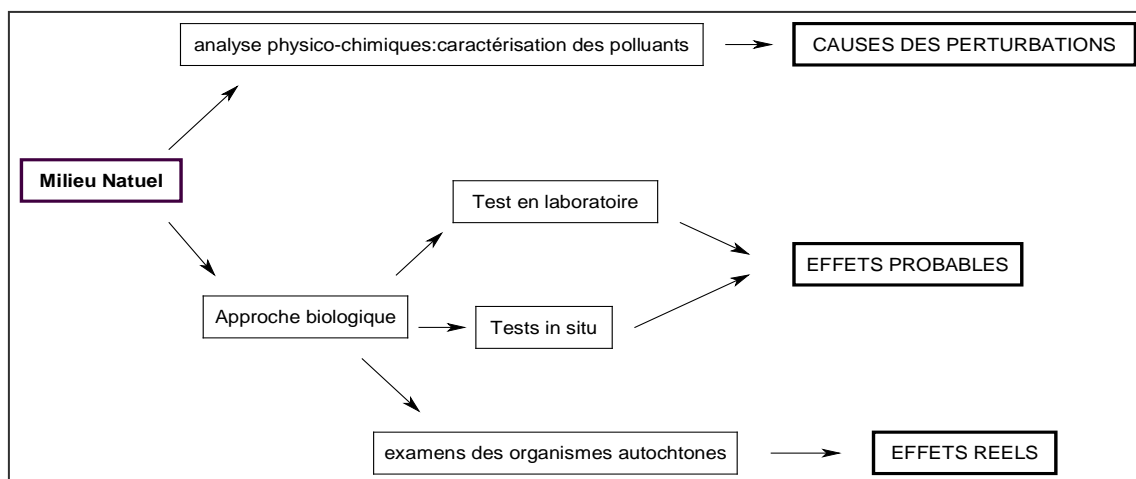


Fig.9 : Approche physico-chimique et biologique du monitoring des milieux aquatiques (Descy & Darchambeau, 1999).

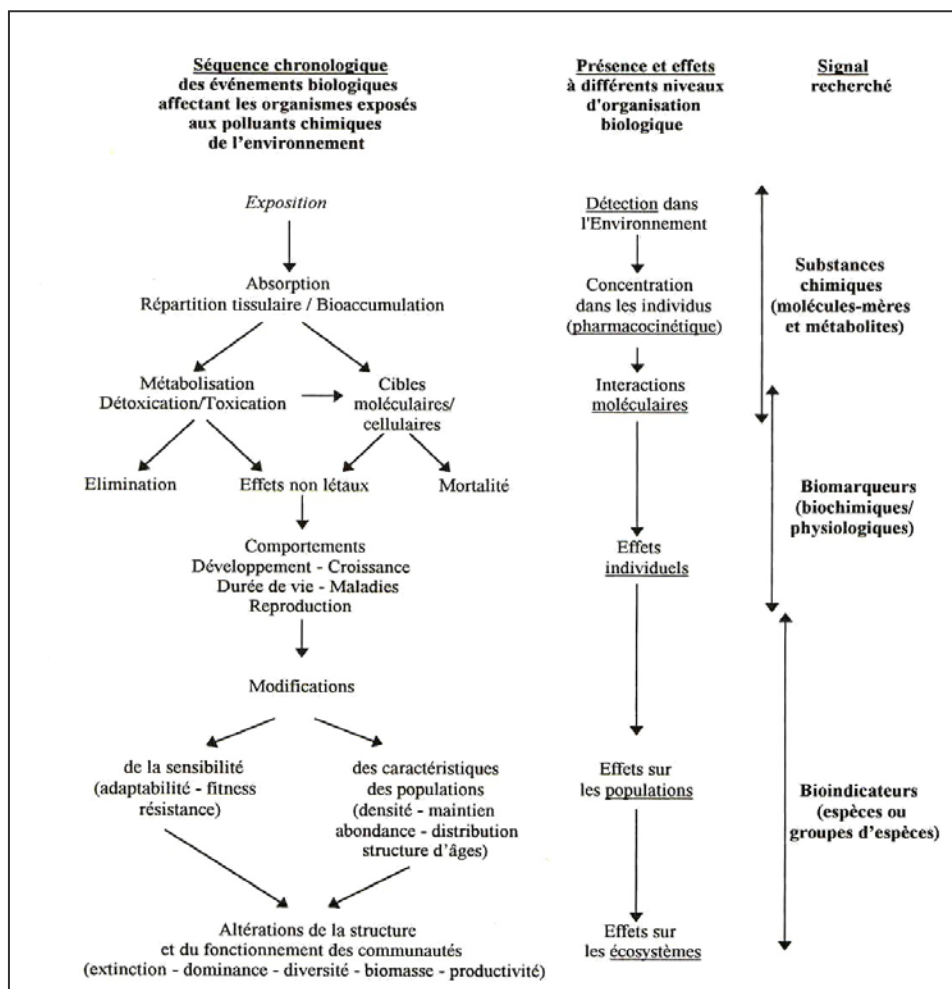


Fig.10 : Chronologie théorique des effets induits par un polluant introduit dans le milieu naturel (Craquet & Lagadic, 1998).

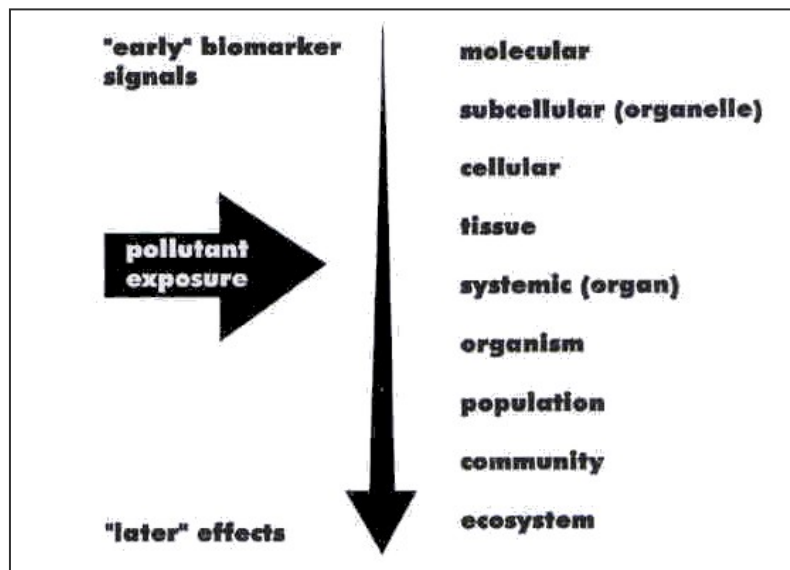


Fig.11 : Séquence chronologique de l'ordre de réponses aux polluants dans un système biologique (Van Der Oost *et al.*, 2003).

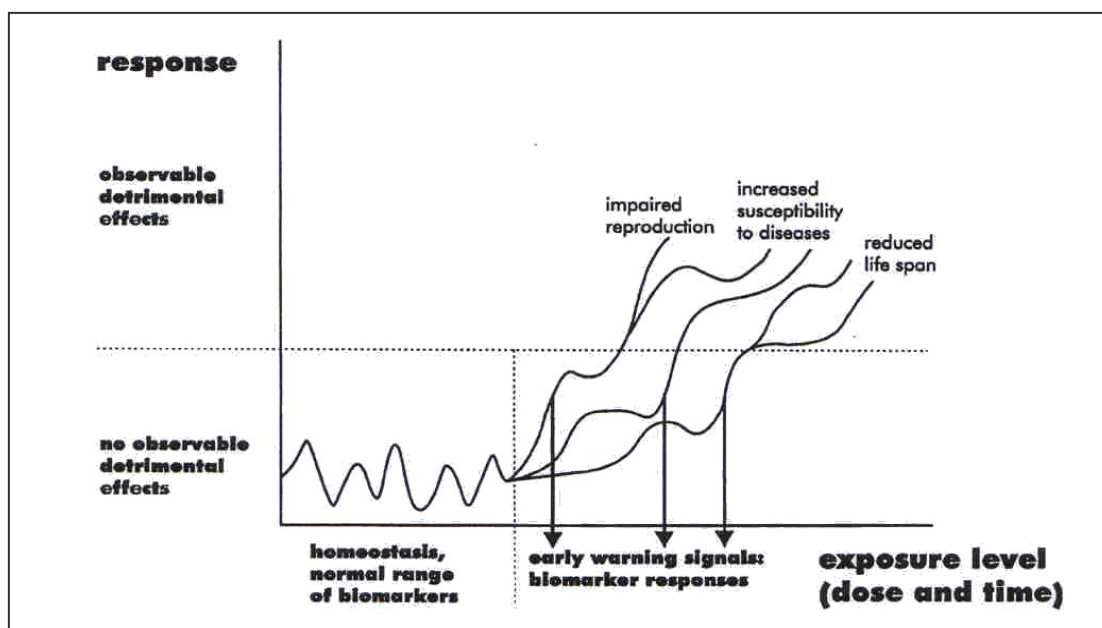


Fig.12 : Schéma générale de la réponse des organismes face à l'exposition d'un polluant (Van Der Oost *et al.*, 2003).

2) Polluants et réponses biologiques

2.1) Introduction

La surveillance de la qualité d'un milieu aquatique peut être abordée selon deux approches bien distinctes, mais complémentaires (fig.9).

L'approche physico-chimique correspond à la détection et éventuellement la quantification, dans des milieux physiques et biologiques (eau, sol, sédiments, végétaux, ...) des polluants par des méthodes d'analyses chimiques, maintenant très perfectionnées, mais coûteuses. Cependant, ces méthodes nous renseignent sur les conditions instantanées de l'état de l'environnement, alors que celles-ci sont extrêmement variables.

La seconde approche vise à évaluer les effets des altérations. Cette méthode est une approche biologique du milieu (biomonitoring) qui peut se faire à différents niveaux d'organisation. A l'heure actuelle, deux outils complémentaires basés sur l'étude des organismes vivants, sont utilisés (Amiard *et al.*, 1998) :

- les *bioindicateurs* définis comme étant des espèces ou groupes d'espèces qui, par leur présence et/ou leur abondance, sont significatifs d'une ou plusieurs propriétés de l'écosystème dont ils font partie.
- les *biomarqueurs* qui correspondent à des changements observables et/ou mesurables au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèlent l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant.

Le grand avantage de cette approche est d'intégrer dans le temps et l'espace les effets de la pollution, mais elle n'en fournit cependant qu'une mesure globale. Pour savoir quels polluants sont en cause, l'analyse physico-chimique est indispensable. Ainsi l'étude de Noaksson *et al.* (2003) qui a révélé une altération au niveau des marqueurs biochimiques et de l'indice gonadosomatique chez des perches situées en aval de rejets d'effluents publiques a également permis d'écarter les PAHs et PCBs en tant que source de polluants vu leur faible concentration dans les sédiments révélée par les analyse physico-chimiques.

2.2) Impact des polluants à différents niveaux d'organisation biologique

La structure d'un écosystème aquatique peut être définie comme une succession de niveaux d'organisation où chaque compartiment contrôle l'organisation du niveau supérieur (Atrill & Depledge, 1997). Ainsi, les effets écotoxicologiques découlant de l'introduction d'un polluant dans un écosystème peuvent se manifester à divers niveaux d'organisation biologique, depuis l'individu jusqu'à l'écosystème lui-même, en passant par les populations puis les communautés (fig.10).

Il est également important de signaler qu'il existe une séquence chronologique de réponse dans un système biologique. En effet la sensibilité de la réponse biologique face à un polluant varie à chaque niveau d'organisation (Van Der Oost *et al.*, 2003). Ainsi, les effets éprouvés à des niveaux hiérarchiques supérieurs sont toujours précédés par des changements plus rapides, aux niveaux d'organisation inférieurs (fig.11). Au-dessus d'un certain seuil (la dose du polluant ou la durée de l'exposition) le signal émis par le biomarqueur dévie du degré normal (dans une situation sans stress), ce qui va finalement aboutir à la manifestation d'effets multiples aux niveaux hiérarchiques supérieurs (fig.12). L'altération du bien-être d'un organisme dépend également de facteurs intrinsèques (âge, sexe, statut alimentaire de l'individu,...) et de facteurs extrinsèques (la dose, le temps et la voie d'administration du polluant) (Lam & Gray, 2003).

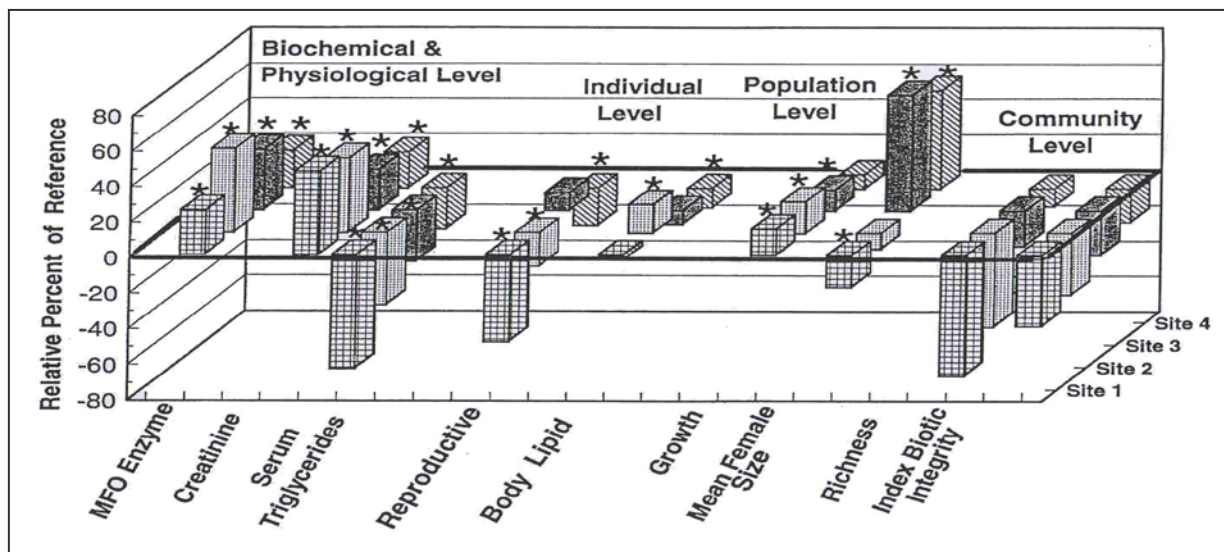


Fig.13 : Réponses à différents niveaux d'organisation biologique le long d'un gradient de contamination chez des poissons (*Lepomis auritus*) à des effluents d'usines papetières. Les sites se disposent le long d'un gradient aval, le site 1 se trouve en aval direct du rejet, suivent alors les sites 2, 3 et 4. * indique une différence significative par rapport au site de référence (Adams *et al.*, 2000).

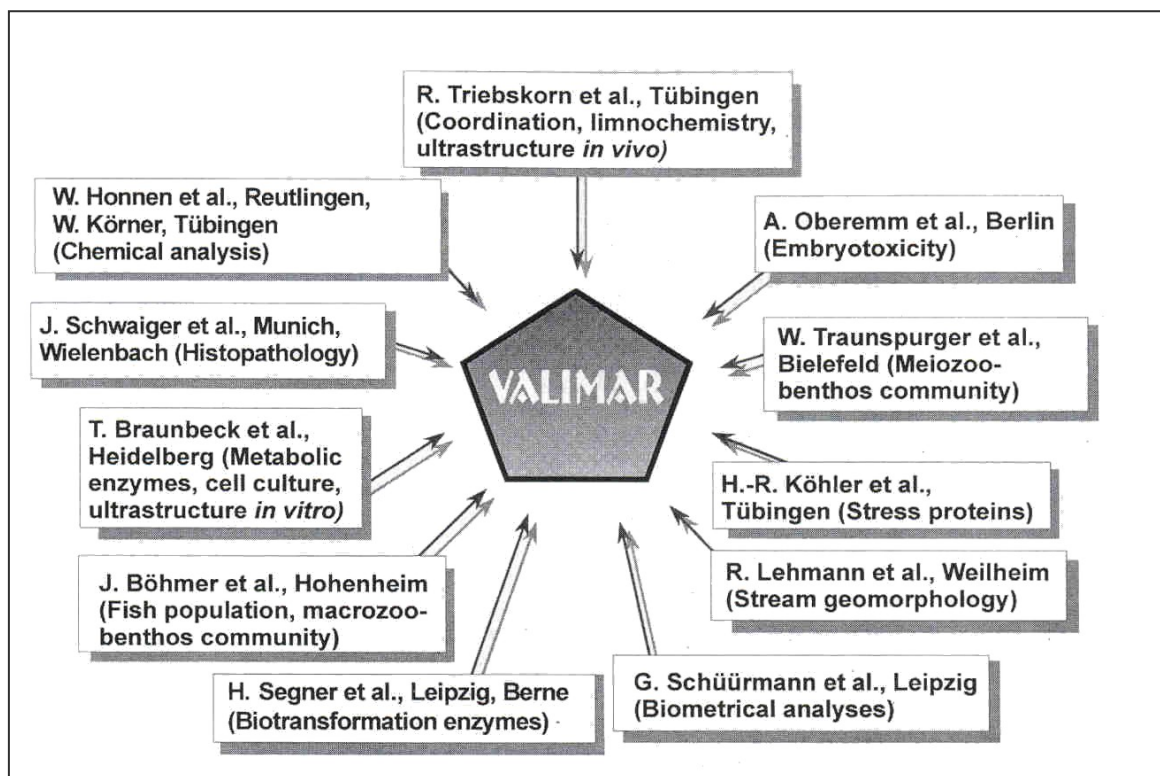


Fig.14 : Biomarqueurs utilisés lors du projet VALIMAR (Tribskorn *et al.*, 2001).

2.3) Intégration de marqueurs biologiques

Devant la complexité des écosystèmes et de l'ensemble des relations qui les structurent et qui assurent son fonctionnement, le monde scientifique s'est progressivement rendu compte de l'insuffisance d'une approche focalisée sur un seul niveau d'organisation biologique pour évaluer l'état de santé d'un milieu. Ainsi, plusieurs auteurs ont réalisé l'intérêt d'une approche holistique, c'est-à-dire basée sur plusieurs niveaux d'organisation, pour le suivi de la qualité de l'environnement (Adams *et al.*, 1992b; Adams *et al.*, 2000; Vasseur & Cossu-Leguille, 2003)

Adams *et al.* (2000) remarquaient des similitudes dans l'évolution de réponses biologiques à différents niveaux d'organisation le long d'un gradient de contamination (fig.13). Ces similitudes semblent indiquer, d'après les auteurs, l'existence de relations causales entre les réponses à différents niveaux d'organisation. L'utilisation des différents niveaux d'organisation biologique permet d'identifier les effets qui pourraient exister entre la contamination et les réponses biologiques. Cela permet d'identifier les points du système biologique les plus susceptibles d'être touchés par les contaminants et qui ont donc un impact important sur la population des poissons. Ainsi, dans une étude de Adams *et al.* (1992), les réponses obtenues à différents niveaux permettaient à l'auteur de conclure que le procédé principal par lequel des effluents d'usines papetières affectaient les populations ichtyologiques de la Pigeon River (au Tennessee) était un dysfonctionnement de la reproduction et du recrutement. En effet, les femelles de Redbreast Sunfish (*Lepomis auritus*) de la rivière polluée possédaient un nombre important d'ovocytes atrétiques ainsi que de faibles niveaux d'oestradiol. De plus un recrutement plus faible entraînait une compétition intraspécifique plus faible, permettant aux survivants de disposer de plus de ressources, ce qui se traduisait par un taux de croissance plus élevé que dans les populations du site de référence.

Un groupe de scientifiques allemands a récemment mis sur pied le projet VALIMAR (Triebkorn *et al.*, 2001) ayant pour but la validation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. Le projet s'est étalé sur 5 ans (1995-1999) et les sites étudiés étaient deux petites rivières du sud-ouest de l'Allemagne (Körsch et Krähenbach). Les expériences ont été menées aussi bien *in vivo* que *in vitro*, mais aussi en conditions semi-naturelles (encagement et rivières artificielles). Les biomarqueurs utilisés sont nombreux et couvrent tous les niveaux d'organisation susceptibles d'être touchés (fig.14). Les chercheurs se sont concentrés sur deux espèces sentinelles, la truite fario et la loche franche. Ils ont pu montrer que les réponses étaient généralement plus sensibles chez la première que la seconde. Les analyses physico-chimiques ont révélé des différences significatives en terme de concentration en PAH, PCB, perturbateurs endocriniens, températures, nutriments,... entre les deux rivières étudiées. Les sources et les niveaux de contamination ont été identifiés et la géomorphologie des rivières a été analysée pour permettre une meilleure interprétation des effets biologiques, particulièrement au niveau des populations et communautés. Généralement, les réponses des biomarqueurs indiquaient que les poissons provenant de la rivière polluée montraient des symptômes de métabolisme activé, une déficience énergétique, et une pauvre condition globale (fig.15). La combinaison d'une étude en laboratoire, *in vivo* et en condition semi-naturelle fournit également des connaissances supplémentaires pour interpréter les résultats des études sur la population des poissons. Ces études révèlent une perturbation importante des structures de populations des truites et loches, essentiellement due à un impact négatif sur les stades larvaires et juvéniles.

Enfin, de nombreuses réponses biologiques sont utilisées en tant que biomarqueurs pour la surveillance de l'environnement. Le tableau 2, ci-dessous, reprend quelques études proposant une liste non exhaustive de biomarqueurs utilisés à chaque niveau d'organisation biologique.

Tableau 2 : Liste des principaux niveaux d'organisation étudiés dans le biomonitoring.

Paramètres Biochimiques (Vasseur & Cossu-Leguille, 2003)				
	Biomarkers	Effects	Class of pollutants	References
Biomarkers of exposure	CYP1A1 expression and activity (EROD activity)	Induction	Organochlorine pesticides, polychlorobiphenyls, dioxins, polycyclic aromatic hydrocarbons	Livingstone et al. (1995); Stegeman and Kloepper-Sams (1987); Stegeman et al. (1992); Vindimian and Garric (1989)
	Benzopyrene hydroxylase	Induction	Benzo(a)pyrene	Baturo and Lagadic (1996)
	Glutathione-S-transferase	Induction	Electrophilic substances	Fitzpatrick et al. (1995, 1997)
	Acetylcholinesterase activity	Inhibition	Organophosphate and carbamate insecticides	O'Brien (1967); Grue et al. (1983)
	Metallothionein synthesis	Induction	Metals	Cosson (2000); Geffard et al. (2001); Hamer (1986)
Biomarkers of toxic effects	Stress proteins	Induction	Metals, other xenobiotics?	Caltabiano et al. (1986); Lindquist (1986); Sanders (1990); Shugart (1990)
	DNA damage, DNA adducts	Occurrence	Clastogens, mutagens, genotoxic xenobiotics	
	Acetylcholinesterase activity	Inhibition	Organophosphate and carbamate insecticides	O'Brien (1967); Grue et al. (1983)
	Lipid peroxydation	Induction	non-specific ^a	Thomas and Wofford (1993); Viarengo et al. (1988); Wenning et al. (1988); Doyotte et al. (1997)
	Antioxidant systems (glutathione and related enzymes activity)	Inhibition and decrease	non-specific ^a	Di Giulio et al. (1989); Hasspieler et al. (1994); Ribera et al. (1991); Rodriguez-Ariza et al. (1993); Cossu et al. (1997, 2000); Cajaville et al. (1995); Moore (1982, 1985); Giamberini et al. (1996); Giamberini and Pihan (1997)
Lysosomal system integrity and functioning	Decrease	non-specific ^a		
Paramètres	Biomarqueurs/ bioindicateurs*	Organismes	Contamination	Références
Physiologique	Vitellogenine	<i>Oryzias latipes</i>	E2, Genistein	(Scholz <i>et al.</i> , 2004)
	Stéroïdes plasmatiques (17b-oestradiol, 11-KT, testosterone)	<i>Cyprinus carpio</i>	PAHs, pesticides organochlorés, phénols,...	(Goodbred <i>et al.</i> , 1997)
Histopathologique	Ultrastructure des branchies, foie et reins	<i>Salmo trutta et Noemacheilus barbatulus</i>	Pesticides, HAP, PCB, métaux lourds.	(Schwainger, 2001)
	Ultrastructure des gonades	<i>Cyprinus carpio</i>	4-tert-pentylphenol et E2	(Gimeno <i>et al.</i> , 1998b)
	Ultrastructure du foie	<i>Barbus barbus</i>	PCB	(Hugla & Thome, 1999)
*Population	Longueur total	<i>Lepomis auritus</i>	BKME	(Adams <i>et al.</i> , 1992b)
*Communauté	Index of biotic integrity (IBI)	<i>Catostomidae, Centrarchidae, Cyprinidae, Esocidae, Percidae,...</i>	BKME	(Kovacs <i>et al.</i> , 2002)

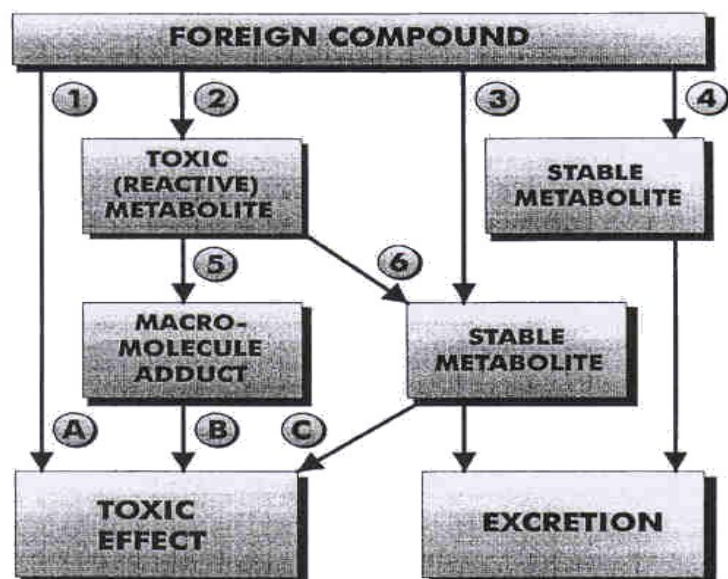


Fig.16 : Voie possible de toxification et détoxification des composés xénobiotiques : (1) effet toxique direct (A); (2) activation métabolique; (3) formation d'un composé métabolite stable qui peut causé un effet toxique (C); (4) détoxification. Le métabolite réactif formé par bioactivation (2) peut causé un effet toxique suite à une réaction avec une cible critique (5) ou être détoxifié grâce à une réaction avec un agent protecteur (6) (Van Der Oost *et al.*, 2003).

2.4) Pertinence écologique des signaux exprimés par les biomarqueurs

2.4.1) Altérations biochimiques

Le déficit majeur lors du développement de biomarqueurs dans le cadre du biomonitoring est de définir la représentativité des réponses de ces biomarqueurs en terme d'effets écologiques des polluants. Il est difficile de prédire jusqu'à quel point les altérations biochimiques, comme l'induction de l'EROD (étoxyrésorufin O-dééthylase), GST (Glutathione S-transferase), HSP (Heat Shock Protein),... chez des individus d'une population donnée peut influencer l'intégrité de cette population ou même d'une communauté d'espèces. Bien que très peu d'études traitant de ce problème aient été réalisées, certaines ont démontré clairement une relation entre une pollution environnementale et les maladies subies par les poissons exposés. Dans une études portant sur les analyse de soles au niveau des côtes pacifiques, aux USA, des relations de causes à effets ont été démontrées entre le niveau de pollution en hydrocarbures polycycliques aromatiques (PAHs), des réponses de biomarqueurs (augmentation d'activités CYP1A) et des conséquences biologiques comme des lésions hépatiques (Myers et al., 1994). Des relations similaires ont été reportées par Vethaak et al. (1996). Ils ont observé une induction EROD, et l'apparition de maladies du foie et de la peau chez la plie *Paralichthys flesus* après une exposition à long terme à des sédiments contaminés aux PAHs et PCBs dans une étude de type mésocosme.

Il existe de nombreux mécanismes toxiques possibles impliquant des enzymes de biotransformation et dont les niveaux et les activités ont été altérés. En effet, le traitement des xénobiotiques par le système de P450 conduit à l'excrétion de ces polluants mais peut aussi aboutir à des effets toxiques (fig.16).

Plusieurs causes peuvent êtres à la base de ces effets :

- Beaucoup de protoxiques, promutagènes, procarcinogènes sont convertis par le cytP450 (fig.17) en produits toxiques réactifs. Dans certains cas, si la capacité des enzymes de la phase II (ex : GSTs et UDPGTs, les glucoronyl transférases) est insuffisante pour conjuguer ces produits, des métabolites électrophiles peuvent se lier aux centres nucléophiles des macromolécules cellulaires (ADN, ARN, protéines) conduisant à une dégradation de membranes, toxicité cellulaire, mutations et carcinogènes (Celander, 1999) .

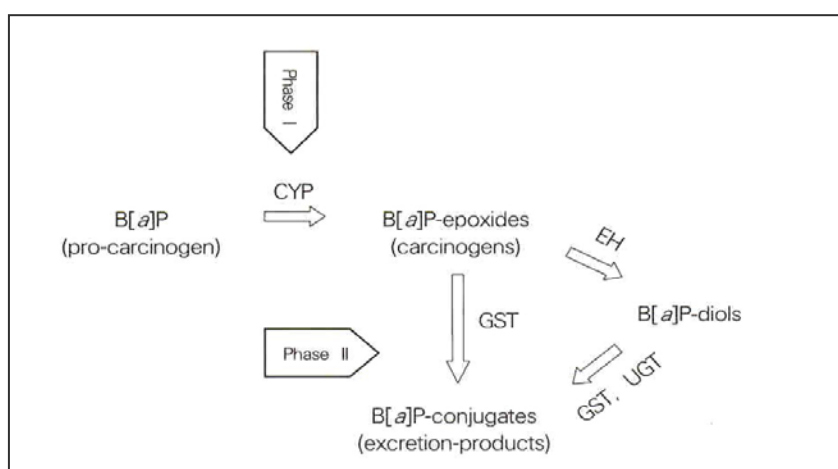


Fig.17 : Biotransformation du benzo[a]pyrene (B[a]P) (Celander, 1999).

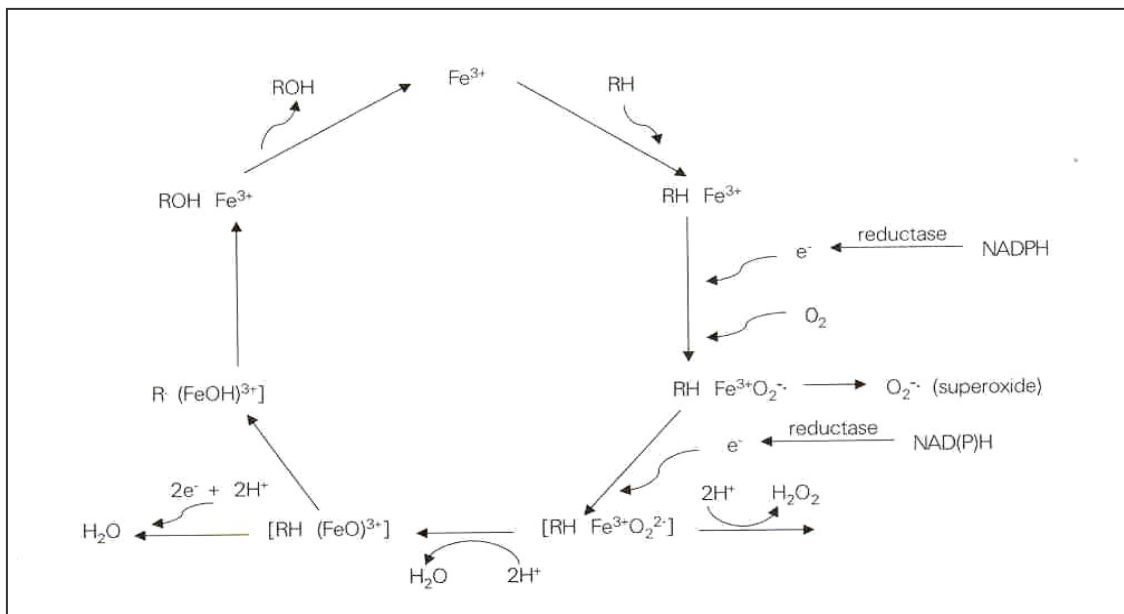


Fig.18 : Représentation du cycle catalytique du cytochrome P450 (Celander, 1999).

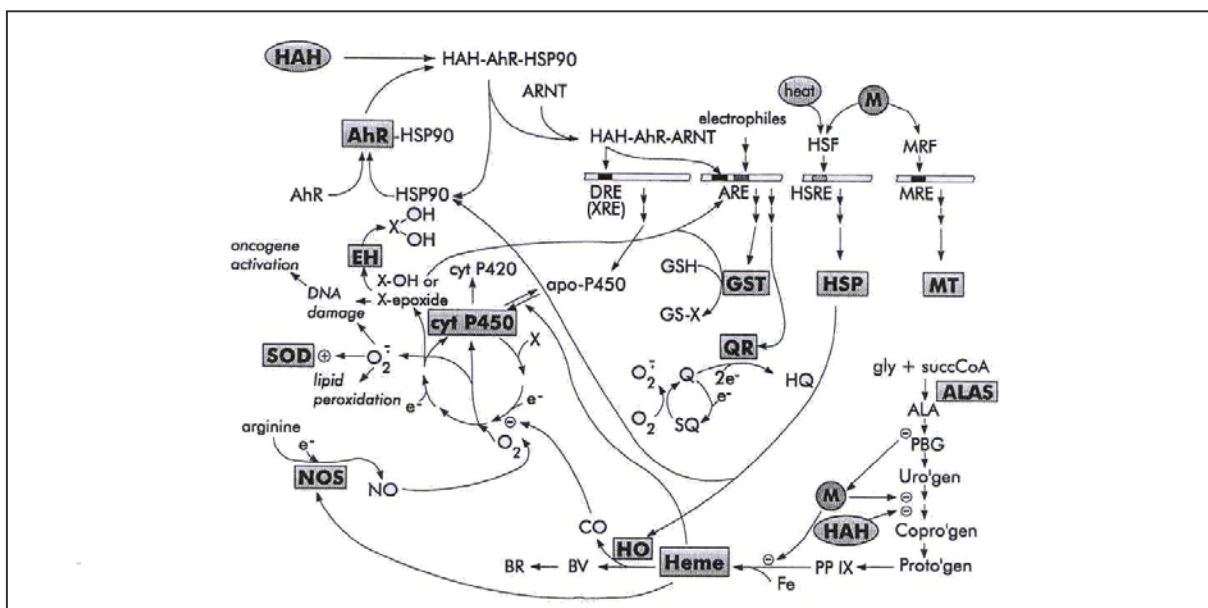


Fig.19 : Cette figure illustre les liaisons complexes qui existent entre les enzymes de la famille P450 et les autres systèmes biochimiques ainsi que les interactions complexes qui se produisent entre systèmes biochimiques lors d'une exposition à un polluant. Ahr, récepteur Ah ; ALAS, δ -amino-levulinic acid synthase ; ARE, élément de réponse aux antioxydants ;BR, bilirubine ;BV, biliverdine ;CO, monoxyde de carbone ;DRE, élément de réponse aux dioxines ;HE, epoxide hydroxylase ;GSH, glutathione ; GST,gutathione S-transférase ; HAH, hydrocarbure aromatique halogéné ; HO, oxygénase hème ; HQ, hydroquinone ; HSF, facteur de stress lié à la température ; HSP 90, protéine de stress liée à la température (90kDA) ; HSRE, élément de réponse au stress lié à la température ; M, métal ; MRE, élément de réponse aux métaux ;MRF, facteur de réponse aux métaux ; MT, méthallothionéine ; NO, oxyde nitrique ; NOS, oxyde nitrique synthase ; Cyt P450, cytochrome P450 ;PP, protoporphirine ;Q, quinone ; Qr, quinone réductase ;SOD, superoxyde dismutase ; SQ, semiquinone radical ; XRE, élément de réponse

- L'induction des enzymes du cytP450 par certains polluants peut altérer le taux du métabolisme des substrats endogènes soit directement comme catalyseur, soit indirectement par compétition pour réduire les composés provenant de la P450 réductase. Les enzymes de la P450 étant impliqués dans le métabolisme des stéroïdes, des effets négatifs peuvent se faire sentir sur la reproduction de l'individu (fig.7).
- L'inhibition, directe ou indirecte, du système P450 par des composés substrats ou non, peut affecter le métabolisme des xénobiotiques ou des composés endogènes, dépendant de la forme du P450 inhibée.
- Une défaillance dans le déroulement du cycle catalytique de la phase I, lors de la réduction de Fe^{3+} par la NADPH-cytochrome P450 réductase ou la liaison de la molécule d' O_2 au complexe CYP-substrat peut aboutir à la formation et la libération d'un radical oxygène (superoxyde, $O_2^{\cdot-}$), toxique et mutagène (fig.18)(Celander, 1999).

L'établissement du réseau d'interactions entre les fonctions des enzymes de la P450 et/ou la régulation des autres processus moléculaires permettra de révéler le rôle global de ces enzymes dans les mécanismes toxiques. Cependant, de nombreux liens existent entre le système de P450 et les autres systèmes biochimiques (Van Der Oost *et al.*, 2003). Ces systèmes incluent la synthèse et la dégradation des groupements hèmes, les HSPs, les gènes suppresseurs de tumeurs, etc (fig.19). Ces interactions complexes illustrent la difficulté d'évaluer et d'analyser les conséquences toxicologiques d'une modification des processus de biotransformation due à une exposition d'un polluant.

La toxicité ultime des xénobiotiques est liée à l'induction des enzymes de la phase I et II, à la balance qui existe entre les réactions de bioactivation et de détoxification. En effet, une étude menée par Van Der Oost *et al.* (1998) a révélé que l'induction par un polluant (PCBs et pesticides organochlorés) des enzymes de la phase II était moins prononcée que les enzymes de la phase I. Par ailleurs, la formation et la persistance de lésions génétiques critiques peuvent être influencées aussi bien par des processus de détoxification que des processus de bioactivation. La balance entre ces deux types de réactions joue un rôle crucial dans l'analyse des risques possibles lors d'une exposition à de tels contaminants. C'est pour cette raison que, dans cette même étude, Van Der Oost *et al.* (2003) ont développé « l'indice de biotransformation (BTI) » qui exprime le rapport entre l'activité des enzymes de la phase I et de la phase II (ex : EROD/UDPGT).

2.4.2) Altération à des niveaux hiérarchiques supérieurs

Bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour évaluer et valider la signification toxicologique des changements au niveau des biomarqueurs biochimiques (les protéines de stress, métallothionéine, paramètres hématologiques,...), la représentativité toxicologique des autres biomarqueurs (immunologique, reproductif, morphologique,...) est plus évidente.

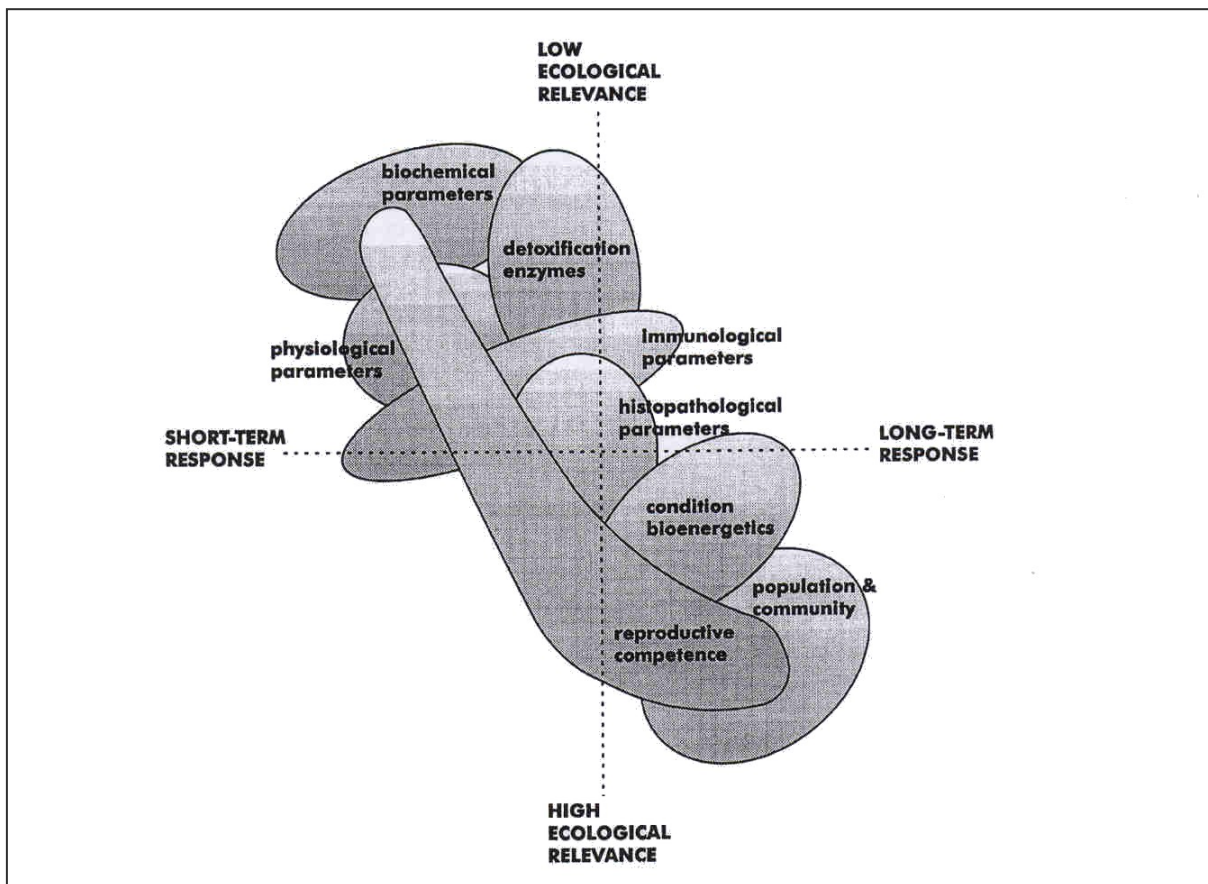


Fig.20 : Visualisation théorique des relations entre pertinence écologique et échelle de temps des réponses des biomarqueurs induites par un polluant (Adams et al., 1989 in Van Der Oost *et al.*, 2003).

La relation entre les réponses à différents niveaux d'organisation biologique ainsi que la pertinence et l'échelle de temps des réponses de ces biomarqueurs est illustrée à la figure 20. Les réponses à chaque niveau fournissent des informations qui peuvent nous aider à interpréter et comprendre la relation qui existe entre l'exposition et les effets des polluants. Il est généralement admis que la pertinence écologique est inversement liée à la sensibilité et la spécificité des réponses des biomarqueurs (Van Der Oost *et al.*, 2003).

Une approche qui permet d'intégrer la détection rapide et la pertinence écologique des réponses des biomarqueurs est le choix de paramètres assez sensibles mais qui peuvent être liés aux effets néfastes subis par l'individu, la population et même la communauté d'espèces. En général, les paramètres de la reproduction et du développement satisfont à ces critères (fig.20). Bien que la relation entre des paramètres comme la concentration en hormones stéroïdiennes, les altérations au niveau de l'individu ou la taille de la population reste peu claire, d'autres changements comme la taille réduite des gonades (particulièrement celle des poissons femelles), la production des oeufs, la survie des embryons et des larves pourraient avoir un impact sur la taille de la population (Monosson, 1999/2000).

2.5) Utilisation de biomarqueurs en tant que représentation de la variation spatiale et temporelle des sources de pollution

Suivant le type de monitoring, les biomarqueurs peuvent être utilisés soit pour révéler une pollution ponctuelle dans un même site ou mettre en évidence une altération de la qualité de l'environnement entre des sites différents.

Eggens *et al.* (1996) ont rencontré plusieurs problèmes lors du biomonitoring temporel de la mer de Wadden. Ces chercheurs ont examiné la variation temporelle de la concentration en protéines hépatiques CYP1A, son activité catalytique par analyse EROD ainsi que la concentration en PCB dans les muscles et le foie de plies mâles, femelles et juvéniles (*Platichthys flesus*). Leurs recherches se sont étalées de Mars (1989) à Novembre (1990), pour la première campagne et d'Octobre (1992) à Juin (1993), pour la deuxième campagne. Ils ont pu observer un pic distinct de la concentration en PCB après la période de ponte (de Mars à Avril), mais uniquement chez les mâles matures. Ce pic pourrait être associé à la présence dans la population de mâles ayant migrés pour se reproduire à l'endroit de l'échantillonnage. En effet, l'arrêt de la nutrition lors de la migration conduit à une diminution de la masse en lipide chez l'individu et donc à une augmentation de la concentration en PCBs, composés hydrophiles. De plus, les femelles éliminent les PCBs via la production d'œufs et les juvéniles ne prennent pas part à la migration. Le niveau en CYP1A reste stable de Juin à Octobre mais un pic se produit immédiatement après la période de reproduction. Des différences liées au sexe ont été observées pendant la période de ponte et la période juste après la ponte pour l'activité EROD et le niveau en CYP1A, respectivement. Les résultats de ces recherches suggèrent que ce type de monitoring, utilisant l'activité EROD, devrait se focaliser sur une période comprise entre Juin et Octobre dans le but de minimiser l'influence des processus physiologiques et du comportement migratoire associés au cycle reproductif annuel.

Parallèlement à ce type d'approche, d'autres études se sont penchées sur les niveaux d'altération de l'environnement qui pouvaient exister entre des sites géographiquement distincts. Le bilan de santé de la mer du Nord présenté à la Conférence International sur la Protection de la mer du Nord en 1993 constitue une référence pour l'application des biomarqueurs dans un programme de surveillance réalisé sur une zone de grande étendue (Burgeot & Galgani, 1998). En effet, ce programme a permis de mettre en place la cartographie de l'activité EROD de la mer du Nord (fig.21).

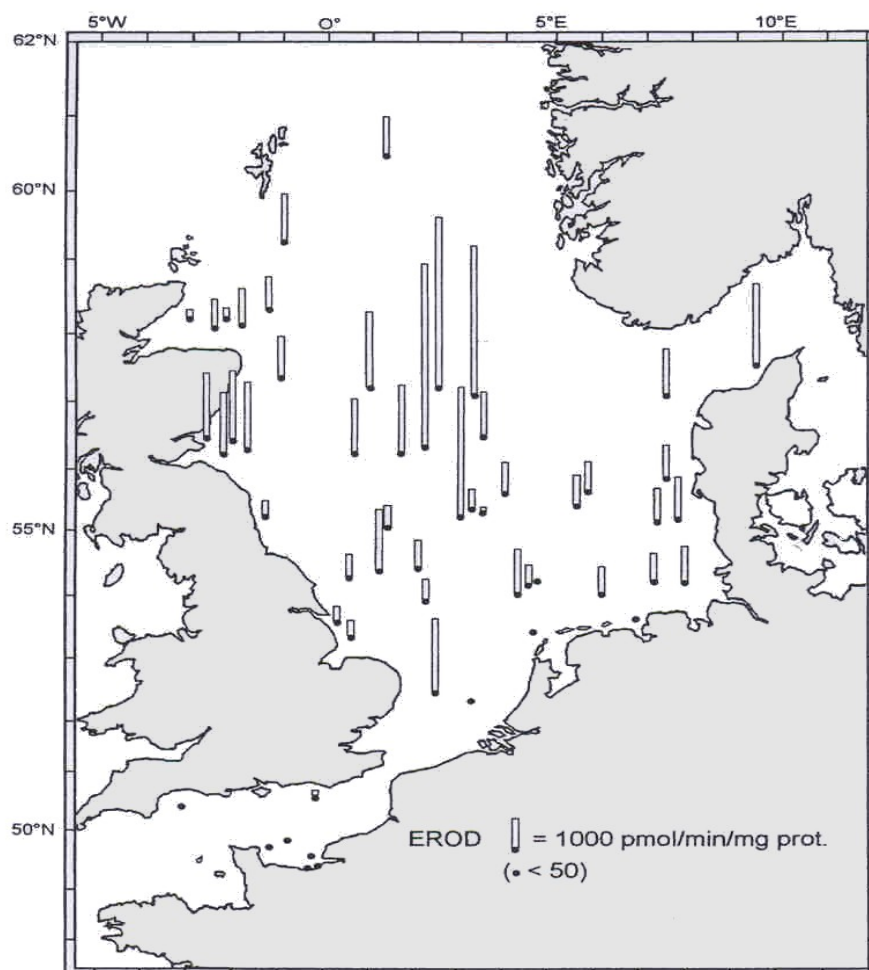


Fig.21 : Mesure de l'activité EROD dans des foies de Limandes en mer du Nord (Burgeot & Galgani, 1998).

La mesure d'EROD a été réalisée sur des foies de Limandes dans différentes sous-régions de la mer du Nord. Les plus fortes variations de l'activité EROD ont ainsi été enregistrées dans la zone centrale de la mer du Nord, sur le site de Dogger Bank. Cette zone est caractérisée par une courantologie tourbillonnaire, par la présence de sédiments vaseux et surtout par une concentration importante en plates-formes pétrolières, identifiées comme sources principales d'hydrocarbures (HAP en particulier). Les résultats propres au biomarqueur EROD montrent que, malgré toutes les difficultés d'interprétation (mobilités des poissons, complexité des mélanges de polluants, combinaison des phénomènes d'induction et d'inhibition de l'activité enzymatique suivant les molécules chimiques en présence, variations naturelles liées à la

Tableau 3 : Concept d'utilisation des biomarqueurs dans le monitoring environnemental (Den Besten, 1998).

Concept	Purpose	Use of biomarkers	Specific needs for further implementation of this concept
Screening	Cost-effective use of biomarkers as a first screening step	Simple biomarker measurements in a tiered approach (together with chemical analyses and bioassays)	Sensitive biomarkers with specificity for certain types of contaminants or certain types of effect mechanism
Diagnosis	Signalling effects (early-warning system) To signal the possible cause for observed adverse effects in populations of a certain species	Biomarkers of exposure and of toxic effect Biomarkers incorporated in bioassays Large batteries of biomarkers (effect indicators, in part non-invasive) are applied in studies on animals from affected populations; responses are compared with those in reference populations	Development of a suite of biomarkers Insight in the relationship between change in homeostasis (healthy state), biomarker response and fitness or performance of the organism
Trend monitoring	Study biomarker responses in time To compare changes of biomarker responses in time with quality objectives; check improvement after remedial action	Repeated sampling and biomarker measurements in time	Knowledge of the influence of confounding factors Translation of existing quality objectives in biomarker response criteria
Monitoring of spatial variation	Assessment of site-specific biomarker responses (gradients)	Comparison of biomarker responses between sites	Biomarkers must be applicable in common species (for a region considered) Knowledge on confounding factors; reference values
Site-specific risk assessment	Study of contaminant bioavailability and related risks at polluted sites (hot spots) Signalling effects at higher levels of organisation	Biomarkers as indicators of exposure Use of selected biomarkers as early-warning signals of adverse effects on the individual, population or community level	Biomarkers must be applicable in local species or in situ bioassays Responses of predictive biomarkers must be related to effects on higher organisation levels
Risk assessment: ecosystem structure and ecosystem function	Predicting effects on ecosystem level	Application of selected biomarkers in a range of species Estimation of the fraction potentially affected species (PAF) Application of selected biomarkers in key organisms	Biomarkers must be applicable in different species (including key organisms) Sensitivity comparisons between species

reproduction, au sexe et à la taille des individus), la mesure de ce paramètre permet de dresser une cartographie de l'interaction des contaminants avec les organismes. Ce programme a également montré qu'il était délicat d'identifier un biomarqueur parfaitement adapté à la surveillance d'une zone géographiquement aussi vaste. Seule une approche « multi-marqueurs » développée dans un programme incluant des analyses histo-pathologiques et des mesures chimiques sur les tissus et les sédiments, pourrait permettre d'établir un diagnostic de l'effet des polluants.

Les différents types d'approches utilisées dans le biomonitoring apportent des avantages bien spécifiques mais nécessitent en contre partie des exigences toutes particulières. Les caractéristiques des différents concepts utilisés dans la surveillance de l'environnement sont illustrées dans le tableau 3.

2.6) Caractéristiques et limites de l'utilisation de biomarqueurs

Selon un schéma désormais classique (Lam & Gray, 2003), l'utilisation des biomarqueurs en tant qu'outils d'évaluation de la qualité de l'environnement repose sur leur capacité :

- à estimer la distribution de substances potentiellement toxiques à la fois dans l'environnement et dans les organismes vivants.
- à mettre en évidence les réponses des organismes à l'exposition à des contaminants de l'environnement.
- à établir des relations de cause à effet entre la présence des contaminants et les réponses biologiques.
- à évaluer les conséquences de l'exposition des individus sur les niveaux d'organisation biologiques plus élevés (populations et communautés) et finalement sur l'état de santé des écosystèmes.

Les principaux facteurs qui compliquent l'interprétation des réponses des biomarqueurs mesurés chez les individus directement issus du milieu naturel sont en fait bien identifiés (Lagadic *et al.*, 1998) :

- *Interférence avec les facteurs environnementaux.* Dans le milieu naturel, les organismes vivants sont soumis aux variations de facteurs naturels, abiotiques (température, éclairage, etc.) ou biotiques (compétition interspécifique, prédation, etc.), qui peuvent modifier les effets des polluants en agissant soit sur la biodisponibilité des contaminants, soit sur les biomarqueurs eux-mêmes.
- *Effets combinés des substances chimiques.* Les effets de synergie ou d'antagonisme, ou plus simplement les effets combinés des différents types de polluants peuvent compliquer l'interprétation de la réponse des biomarqueurs.
- *Caractéristiques biologiques des individus.* La biologie des individus échantillonnés joue un rôle déterminant dans la signification de la réponse des biomarqueurs. Ainsi, les possibilités de déplacements des animaux conditionnent la fiabilité de la détection des sites pollués, l'état physiologique de l'individu au moment de la mesure du (ou des) biomarqueur(s) est également déterminant pour l'interprétation du résultat. Chez la plupart des organismes, certains processus physiologiques s'accompagnent de changements métaboliques importants comme la reproduction, la croissance et également des processus plus aléatoires comme le développement de pathologies, la présence de blessures, etc.

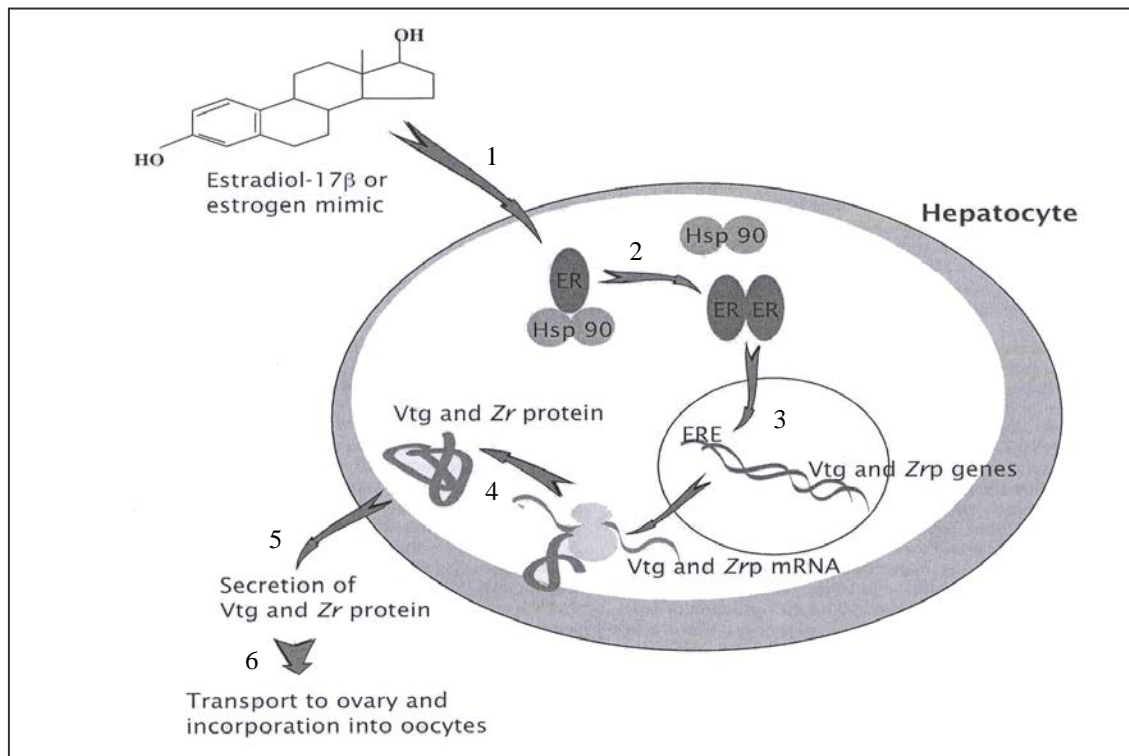


Fig.22 : Représentation schématique de l'induction des gènes de la vitellogénine et des protéines de la *zona radiata* (Arukwe & Goksoyr, 2003).

- 1) L'E2, produite par l'ovaire en réponse à la GtH1, ou des perturbateurs endocriniens, entre dans la cellule et se lie avec une haute affinité pour le récepteur œstrogénique (ER).
- 2) Le récepteur œstrogénique subit deux changements lors de la liaison avec son ligand : dissociation avec la protéine hsp90 et formation du dimère ER-ER.
- 3) Le complexe hormone-récepteur se lie fermement au noyau au niveau du ERE.
- 4) Les ARNm de la vitellogénine et des Zrp sont traduits, respectivement en vitellogénine et Zrp.
- 5) Ces protéines sont ensuite excrétées dans le sérum et transportées dans l'ovaire.
- 6) Une fois libérée, la Vtg est normalement incorporée dans l'ovocyte. Le taux d'incorporation dépend de la GtH1 et non de l'augmentation croissante de la Vtg dans le sang, due à l'induction par des xénobiotiques de type œstrogéniques. Ceci résulte en une concentration plasmatique en Vtg plus élevée chez les poissons exposés à ce type de polluants.

3) Paramètre de la reproduction : mise en place de biomarqueurs

3.1) Marqueurs biochimiques

3.1.1) Perturbation de l'expression des protéines de l'ovogenèse

a) Mécanisme d'induction des protéines ovogéniques

L'ovogenèse comprend essentiellement les processus de vitellogenèse et de zonagenèse. La vitellogenèse correspond à la synthèse, au niveau du foie, de la protéine précurseur du vitellus de l'œuf (la vitellogénine, Vtg), son transport dans le sang et son incorporation dans l'ovocyte en maturation, alors que la zonagenèse est le processus par lequel les protéines de la *zona radiata* (Zrp) sont synthétisées, transportées puis incorporées à leur tour au niveau de l'ovocyte en maturation. Le site de synthèse des Zrp se trouve pour la plupart des téléostéens (ex : Truite arc-en-ciel, Saumon atlantique, Medaka, etc.) au niveau du foie, bien que certaines espèces comme le *Syngnatus scovelli* et la carpe semblent synthétiser ces protéines au niveau de l'ovaire (Arukwe & Goksoyr, 2003). Le mécanisme moléculaire par lequel ces protéines sont exprimées est illustré à la figure 22. Les ERE (*estrogen-responsive-elements*) pour les gènes des Zrp n'ont pas encore été identifiés chez les poissons, bien que leur réponse à l'oestradiol soit très similaire aux gènes de la vitellogénine. Il semble que différents EREs sur l'ADN peuvent être temporairement masqués par certaines protéines, ce qui conduirait à l'induction partielle ou séquentielle des différentes réponses estrogéniques.

b) Dosage des protéines ovogéniques

Lors de la recrudescence ovarienne, l'incorporation de protéines ovogéniques (Vtg et Zrp) est responsable de la majeure partie de la croissance ovocytaire et donc du poids gonadal (Kime, 1998). L'augmentation ou la diminution de l'indice gonadosomatique (GSI) constituerait donc une mesure probable de l'altération de la synthèse des protéines ovogéniques. Cependant, une quantification plus directe de ces altérations peut être obtenue par mesure des concentrations plasmatiques, hépatiques et ovariennes en vitellogénine et Zrp.

La vitellogénine peut être dosée, soit indirectement par analyse de la concentration plasmatique en *alkali-labile phosphoprotein phosphorus* (ALPP) ou par des méthodes plus directes et qui nécessitent des quantités plus faibles en protéines : le RIA (*radioimmunoassay*), remplacée de plus en plus par une autre analyse immunologique, ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbant Assay*) (Schultz *et al.*, 2003). Cette dernière technique convient également au dosage des protéines de la *zona radiata*. Il est également possible de quantifier les transcrits d'ARNm de la Vtg et des Zrp par *Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (*Real Time RT-PCR*) ; par ailleurs, une étude effectuée *in vitro* et *in vivo* chez le Médaka par Scholz *et al.* (2004) a montré que la détection de l'induction de la Vtg, par quantification des ARNm est suffisante lors d'une exposition toxique à court terme alors qu'il était préférable d'utiliser un dosage immuno-chimique lors d'une étude à long terme qui vise à détecter et quantifier de façon précise des substances faiblement oestrogéniques. Enfin, la localisation cellulaire de la synthèse de protéines ovogéniques hépatiques a également été démontrée par analyses immuno-histo-chimiques sur des poissons exposés, grâce à des anticorps spécifiques (Bierbenstein *et al.*, 1999). Cette méthode s'avère donc très utile pour la détection de l'induction de la synthèse hépatique de Zrp et Vtg, particulièrement lorsque l'échantillonnage du sang se révèle être difficile.

Tableau 4 : Liste des études les plus pertinentes effectuées dans le cadre de biomonitoring ou en laboratoire, qui mettent en évidence l'impact des xénoestrogènes sur la vitellogénèse. +, induction significative. -, inhibition significative.

Site	Contamination	Espèce	Induction	Auteurs
Suède	Effluents de boues d'épuration	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	+	(Larsson <i>et al.</i> , 1999)
Baie de Tokyo	Polluants domestiques et industriels	Plies mâles (<i>Pleuronectes yokohamae</i>)	+	(Hashimoto <i>et al.</i> , 2000)
<i>In vivo</i>	Chlordecone, o,p'-DDT, o,p'-DDE.	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	+	(Donohoe & Curtis, 1996)
<i>In vivo</i>	17 α -Ethinylestradiol	Carpe (<i>Cyprinus carpio</i>)	+	(Solé <i>et al.</i> , 2000)
<i>In vitro</i>	3-methylcholanthrene (3MC), β -naphthoflavone	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	-	(Navas & Segner, 2000)
<i>In vitro et In vivo</i>	Oestradiol, Ethinylestradiol, genistein	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	+	(Scholz <i>et al.</i> , 2004)

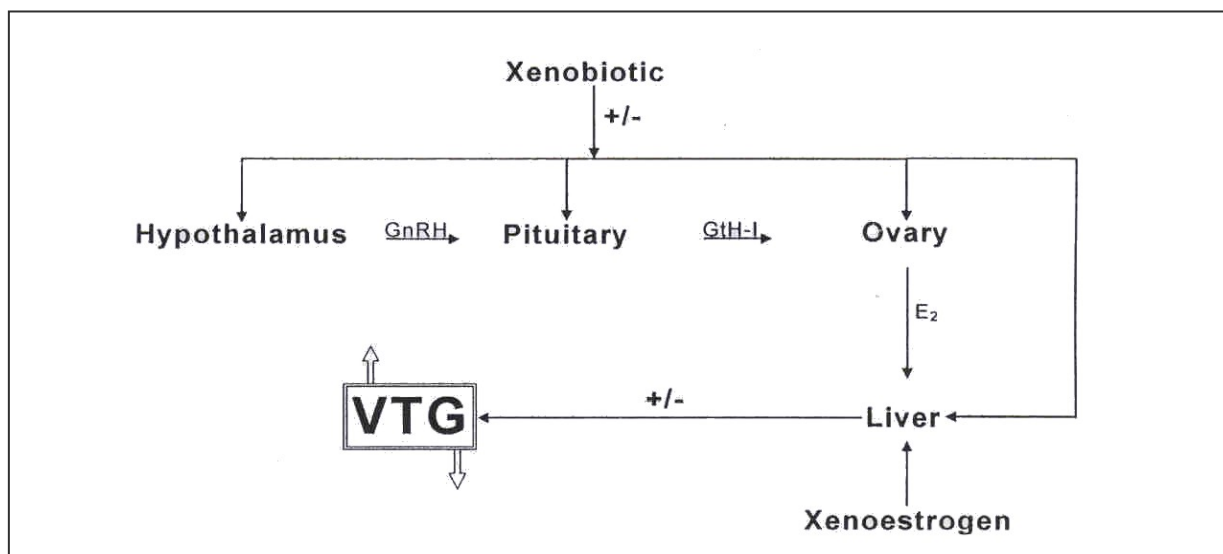


Fig.23 : Impacts des polluants environnementaux sur la production de la vitellogénine.

Plusieurs difficultés se posent lors du dosage de la Vtg et des Zrp (Arukwe & Goksoyr, 2003). Bien que la Vtg puisse se trouver en concentration plasmatique relativement élevée chez les poissons ayant subi un traitement aux œstrogènes (jusqu'à 50-150 mg/ml), la vitellogénine est très sensible à la dégradation protéolytique. En effet, cette protéine joue le rôle de précurseur de fragments peptidiques. La dégradation de la Vtg en ces fragments peut être évitée, lors de l'échantillonnage par l'utilisation d'inhibiteurs de protéases appropriés (Hiramatsu *et al.*, 2002). De plus, la concentration plasmatique en Vtg peut parfois varier fortement (de quelques ng/ml pour des salmonidés mâles non traités jusqu'à 150 mg/ml pour des salmonidés traités en œstrogènes). Cette caractéristique nécessite d'utiliser des techniques d'analyse avec une marge de sensibilité la plus large possible (Arukwe & Goksoyr, 2003). Les difficultés éprouvées lors du dosage des Zrp sont toutes autres. Ces protéines sont destinées à être incorporées de manière intacte dans l'enveloppe de l'œuf, ce qui leur confère une relative stabilité par rapport à la Vtg. Toutefois, la concentration plasmatique en Zrp est en moyenne plus faible que celle de la Vtg. Par ailleurs, des analyses récentes ont montré qu'elle pouvait atteindre des niveaux de 1 à 10 mg/ml chez des truites arc-en-ciel traitées à l'œstrogène (Berg *et al.*, 2002).

c) *L'induction de la vitellogénine en tant que biomarqueur*

Les substances chimiques susceptibles d'induire la synthèse de vitellogénine sont les œstrogènes naturels, les constituants des pilules contraceptives, les alkyls phénols, les phtalates, certains pesticides organochlorés ainsi que les PCBs. Ces xénobiotiques agissent sur les récepteurs hépatiques de l'oestradiol (fig.23). Aussi bien les mâles que les femelles et les poissons immatures possèdent des récepteurs œstrogéniques mais seuls les foies des femelles sont normalement exposés aux œstrogènes. La production de vitellogénine par les mâles, les juvéniles et les femelles non-vitellogéniques peut donc fournir un bon indicateur d'exposition à des œstrogènes environnementaux (Kime *et al.*, 1999). Plusieurs études démontrant les effets des substances de types œstrogéniques sur l'induction de la Vtg, aussi bien *in situ* qu'en laboratoire sont représentées au tableau 4.

L'utilisation de l'induction de la vitellogénine comme biomarqueur d'une exposition à des substances œstrogéniques nécessite beaucoup de vigilance. Ainsi, Janssen *et al.* (1995) ont constaté que la concentration en Vtg était supérieure chez des femelles de plies (*Pleuronectes flesus*) exposées dans des mésocosmes avec des sédiments du port de Rotterdam que chez des poissons contrôles. Cependant, aucun des poissons contrôles et mâles exposés ne montraient de concentrations détectables en vitellogénine, ce qui suggère que l'effet n'était pas dû à des œstrogènes externes. En effet, la production de Vtg par les femelles exposées était probablement due à une sécrétion élevée en E2 par les ovocytes prématurément avancés, décelés par l'analyse des gonades, ainsi qu'à l'inhibition du catabolisme de l'oestradiol par le benzo[a]pyrene, le constituant majeur des sédiments. Bien que le mécanisme de perturbation reste flou, les résultats suggèrent que l'analyse de l'induction de la Vtg chez les juvéniles et les mâles, uniquement, fournit un meilleur indicateur de l'exposition aux composés œstrogéniques. De plus, l'exposition œstrogénique peut également avoir des impacts néfastes sur d'autres composants impliqués dans le processus de la vitellogenèse (Kime *et al.*, 1999). En effet, celle-ci est établie par des interactions complexes entre les différentes glandes et hormones du système neuroendocrinien (fig.23). Les effets des composés œstrogéniques qui induisent la Vtg peuvent être très différents les uns des autres. En effet, les xénobiotiques peuvent avoir des actions agonistes

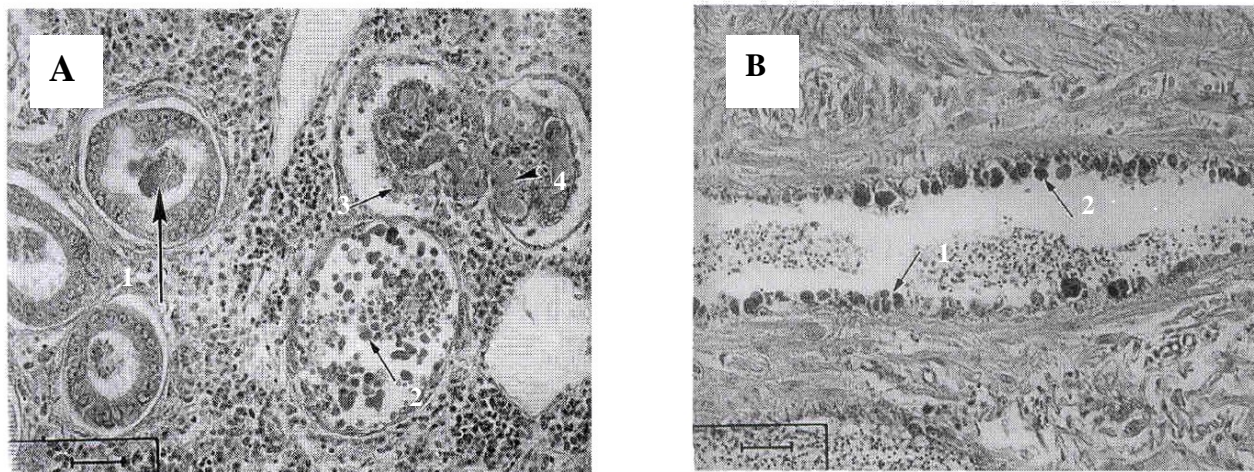


Fig.24 : Coupes immunohistochimiques de plies mâles (*Paralichthys dentatus*) traitées avec deux doses de E2 (10.0mg/kg) et échantillonnées après quatre semaines (adapté de Folmar *et al.*, 2001).

A : Coupe de rein illustrant une accumulation de matériels hyalins, contenant de la VTG, localisés au niveau du glomérule rénal (flèche 1), de l'espace de Bowman's (flèche 2 et 3) et des tubules rénaux (flèche 4).

B : Coupe de testicules illustrant l'accumulation de matériels hyalins au niveau des tubes séminifères (flèche 1 et 2).

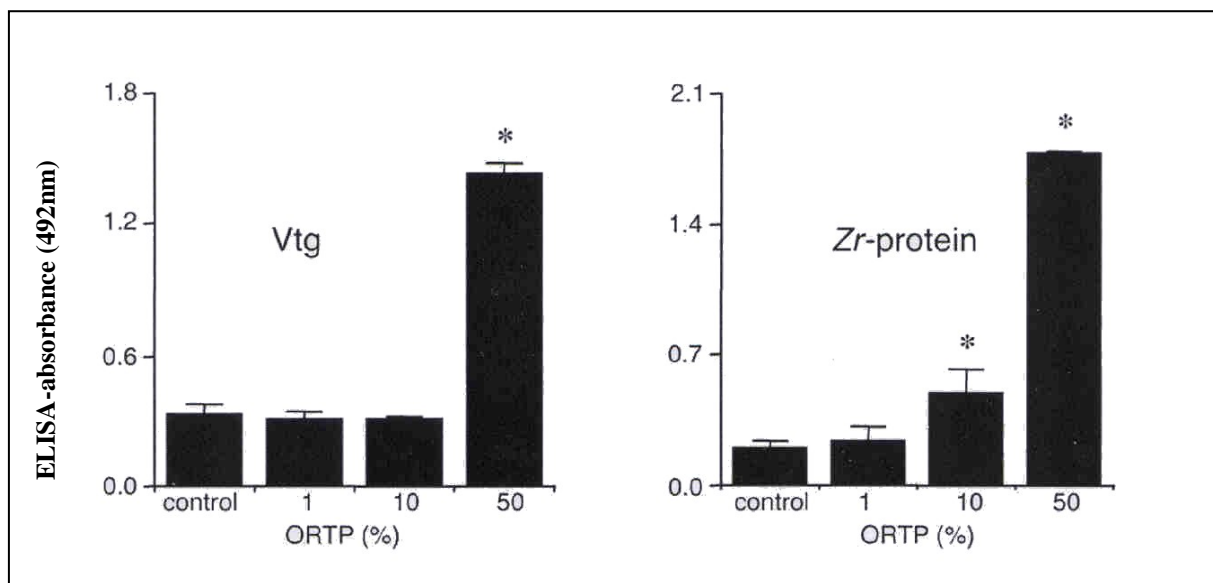


Fig.25 : Concentrations plasmatiques en protéines ovogéniques chez des saumons atlantiques (*Salmo salar*) juvéniles, exposés à différentes concentrations en effluents d'usine de raffinerie de pétrole (ORTP). * différence significative par rapport au contrôle ($p < 0.001$) (Adapté de Arukwe *et al.*, 1997).

ou antagonistes de l'E2. De plus, s'ils peuvent entrer en compétition avec l'E2 pour les ER au niveau du foie, ils sont également capables d'entrer en compétition avec les ER de l'hypophyse et de l'hypothalamus, servant normalement d'intermédiaires lors du feedback négatif de l'E2. Ce type d'altération peut donc modifier la production en GtH1, qui contrôle l'incorporation de la Vtg. Dès lors, une altération du processus de sécrétion de cette hormone peut affecter la taille des ovocytes. Ainsi, une étude de Tyler *et al.* (1994) réalisée sur des salmonidés à moitié ovariectomisés a pu montrer que l'exposition aux xénobiotiques oestrogéniques durant les premiers stades de développement des ovocytes, dépendant de la GtH1, peut altérer le nombre d'œufs formés. A des stades de développements ultérieurs, la sécrétion de GtH2 peut être affectée par des signaux qui indiquent apparemment une augmentation de la synthèse d'oestrogènes alors qu'une diminution signale l'accomplissement de la vitellogénèse. Une perturbation de la synthèse de GtH2 peut, donc, conduire à une altération de la maturation des ovocytes ainsi qu'à une perturbation du processus d'ovulation.

En plus d'être utilisée comme biomarqueurs de l'exposition à des polluants oestrogéniques, une étude de Folmar *et al.* (2001) a révélé que l'induction de la Vtg entraînait une altération de l'intégrité de l'individu exposé. Ces chercheurs ont mis en évidence chez des plies mâles (*Paralichthys dentatus*) traitées en E2 une induction de la vitellogénine, dont la concentration plasmatique atteignait celle de carpes mâles et de dorés jaunes (*Stizostédion vitreum*) exposés à des effluents de boues d'épuration. Ils ont également montré une accumulation excessive de matériels hyalins au niveau des foies, des reins et des testicules des poissons contaminés. Une partie de ce matériel hyalin a été identifiée, par immunohistochimie, comme étant de la vitellogénine (fig.24). Cette accumulation de la Vtg et, potentiellement, d'autres protéines induites par les oestrogènes, comme les Zrps, s'accompagne d'une hypertrophie des hépatocytes, une perturbation de la spermatogénèse et une obstruction, voire même une rupture, des glomérules rénaux.

d) *L'induction des protéines de la Zona radiata en tant que biomarqueurs*

Une étude effectuée par Arukwe *et al.* (1997) sur des saumons atlantiques (*Salmo salar*), a permis de montrer que des individus traités au 4-nonylphénol ou mis en contact avec des effluents d'usine de raffinerie de pétrole présentent une augmentation des niveaux plasmatiques en Zrp et Vtg. Par ailleurs, l'analyse des concentrations de ces protéines par méthode ELISA a démontré que l'induction des Zrps est plus sensible que celle de la Vtg (fig.25). Une étude menée par Celius et Walther (1998) sur des saumons traités avec de l'oestradiol (E2) a également pu mettre en évidence l'apparition de l'induction des Zrps à des concentrations plus faibles en E2, alors que des doses supérieures doivent être appliquées pour permettre l'induction de la Vtg. Cependant, cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par les affinités différentes qu'ont ces deux protéines pour les anticorps utilisés lors des analyses ELISA. Pour éviter ce problème, plusieurs études se sont focalisées sur d'autres techniques de quantification des Zrps et Vtg. Ainsi, Celius *et al.* (2000) ont quantifié les transcrits d'ARNm de Vtg et Zrps de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par méthode de *Real time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Il a pu montrer que, contrairement à la Vtg, l'induction de la transcription des ARNm des Zrps apparaît chez des individus traités avec des plus faibles doses en E2 et mycoestrogen α -zearalenol. Enfin, une étude récente de Lee *et al.* (2002) a permis d'identifier deux groupes majeurs de protéines de la *zona radiata*, le ZI-1,2 et le ZI-3 dont les précurseurs sont, respectivement, la choriogénine H et L. L'induction de la transcription des ARNm de la choriogénine L s'est révélée être plus sensible que pour les ARNm de la forme H.

Tableau 5 : Liste des études les plus pertinentes effectuées dans le cadre de biomonitoring ou en laboratoire, qui mettent en évidence l'impact de certains polluants sur la stéroïdogénèse.

Sites	Type de contaminants	Espèces étudiés	Effets observés	Références
Lake suprior (Ontario)	BKME	Cyprins –sucet femelles (Catastomus commersoni)	-Pendant la vitellogenèse : diminution de la 17β -oestradiol et de la testostérone. -Période de pré-ponte et de ponte : diminution de la testostérone et de la 17α , 20β -P .	(McMaster et al., 1991)
		Cyprins –sucet mâles	-Diminution de la concentration en testostérone, 11-Kétotestostérone (11Kt) et 17α , 20β -P .	
St Johns River	Pollution industrielle	Achigans (Micropterus salmoides floridanus)	-Chez les femelles : diminution en E2. -Chez les mâles : diminution en 11-KT.	(Sepúlveda et al., 2002)
<i>In vitro</i>	BKME	Cyprins –sucet femelles	-Diminution en E2 -Diminution des niveaux en enzymes P450-aromatase.	(Mcmaster <i>et al.</i> , 1995)
<i>In vitro</i>	PAHs (phénanthrène, benzo[a]pyrène, chrysène)	La plie femelle (platichthys flesus)	-Inhibition de l'enzyme limitante dans la stéroïdogénèse : P450 17,20-lyase.	(Monteiro <i>et al.</i> , 2000)

3.1.2) Concentration en stéroïdes sexuelles

La dynamique des hormones stéroïdiennes est guidée par un certain nombre d'enzymes (fig.6). Le composé de départ de la stéroïdogénèse est le cholestérol. A travers différentes réactions enzymatiques, il évolue en progestagènes, androgènes et oestrogènes. L'induction, ou la répression de gènes codant pour ces enzymes peut résulter en une altération de la production d'hormones (Crain, 1997). La plupart des enzymes intervenant dans la stéroïdogénèse sont des enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP450) et l'affinité de liaison d'un polluant pour une enzyme particulière varie de composés en composés (Crain, 1997).

Plusieurs techniques sont utilisées afin de démontrer une éventuelle altération de la stéroïdogénèse, notamment en calculant l'indice gonadosomatique sur les poissons contrôlés et traités. Une diminution du GSI est le résultat d'un abaissement d'activité de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou encore des gonades. Les informations obtenues sont, idéalement, complétées par une analyse histologique afin de déterminer quel niveau a été atteint. Une autre indication qui permet d'analyser le statut gonadal est de mesurer les niveaux de stéroïdes dans le plasma du poisson. Mesurer les taux d'hormones stéroïdiennes est devenu relativement simple. On peut réaliser le dosage par ELISA ou RIA. Une technique consiste à déterminer la capacité de la gonade à produire des stéroïdes en réponse à la GtH soit *in vitro*, soit *in vivo*.

Plusieurs études ont été réalisées afin de démontrer l'impact de certains polluants sur la stéroïdogénèse. De même, de nombreux programmes de biomonitoring ont utilisé les perturbations des concentrations en stéroïdes sexuelles comme biomarqueurs de l'exposition aux EDCs (tableau 5).

Enfin il est important de signaler que si les xénobiotiques sont capables de modifier les niveaux en stéroïdes sexuels en altérant la stéroïdogénèse, certains sont également capables de modifier les concentrations en récepteurs oestrogéniques (ER). Todorov *et al.* (2002) ont exposé des larves de *Morone saxatilis* à des effluents d'usines provenant de New York, riches en composés oestrogéniques (4-nonylphenol et 1-,2-,3-nonylphenol-ethoxylates). Cette étude a révélé chez les larves de poissons contaminés une concentration en Vtg et ER 3 à 5 fois supérieure par rapport au contrôle. Arukwe *et al.* (2001) ont montré, chez la truite arc-en-ciel, l'induction de la transcription des gènes codant pour les récepteurs oestrogéniques après un traitement au nonylphénol et à la 17β -oestradiol. Ils ont également cherché à comparer l'induction de la transcription des gènes de la Vtg, Zrp et ER après ces deux types de traitements. Ils en ont conclu que l'induction de l'expression des gènes de la Vtg et Zrp juste après l'exposition ne dépendait pas de l'augmentation de la transcription du gène du ER et que la transcription des gènes de la Vtg et Zrp nécessite seulement une concentration minimal en ER.

Tableau 6 : Liste des études qui ont pour objectif de montrer l'impact des xénobiotiques sur l'activité aromatase.

Substance	Espèce	Effet	Référence
Flavonoïdes	Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>In vitro</i> , inhibition de l'activité de l'aromatase au niveau de l'ovaire.	(Pelissero <i>et al.</i> , 1996)
17- α -éthinyloestradiol (EE ₂)	Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	EE ₂ induit l'expression du gène de l'aromatase au niveau des testicules. Tous les mâles exposés à 10 ng/l de EE ₂ présentent de l'ARNm de l'aromatase.	(Scholz & Gutzeit, 2001)
Les hydrocarbures polyaromatiques (PAHs)	Plie (<i>Platichthys flesus</i>)	Le kétokonazol (KCZ) et l'aminoglutéthimide (AMG) sont des inhibiteurs du P450arom résultant en une diminution de la synthèse d'E ₂ de 50% par rapport aux contrôles.	(Monteiro <i>et al.</i> , 2000)
Effluents publics	Brook trout (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Les femelles adultes montrent une baisse de l'activité de l'aromatase et une augmentation chez les juvéniles.	(Noaksson <i>et al.</i> , 2003)

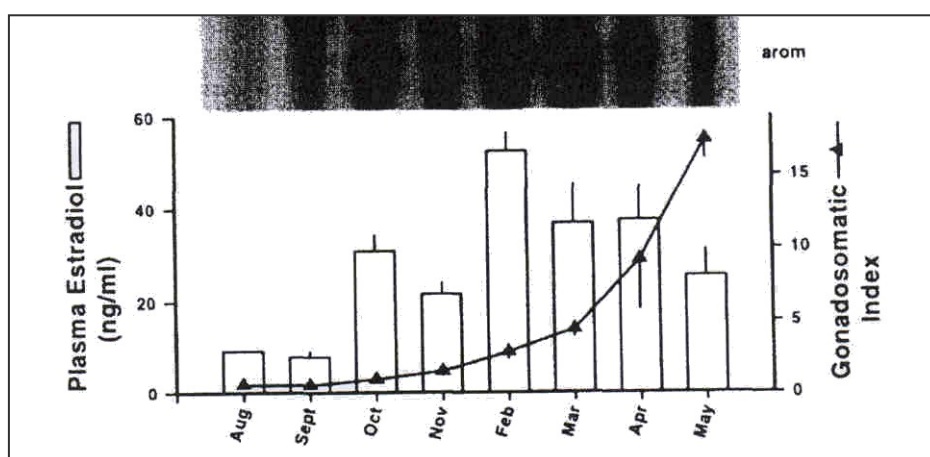


Fig.27 : Changements saisonniers au niveau du GSI, concentration plasmatique en oestradiol et abondance des transcrits de l'aromatase.

3.1.3) Expression de l'aromatase P450

Chez les mâles comme chez les femelles, les estrogènes coordonnent les réponses au niveau du développement, de la physiologie et du comportement qui sont essentielles pour la reproduction. La conversion des androgènes C₁₉ en estrogènes C₁₈ est catalysée par la P450 aromatasase, produit issu du gène CYP19. Cette conversion se produit par une aromatisation des stéroïdes sexuels C₁₉. Le complexe enzymatique est composé de l'aromatase cytochrome P450 et de la flavoprotéine NADPH-cytochrome P450 réductase. Cette réaction prend place au niveau du réticulum endoplasmique. La réaction d'aromatisation est illustrée à la figure 26.

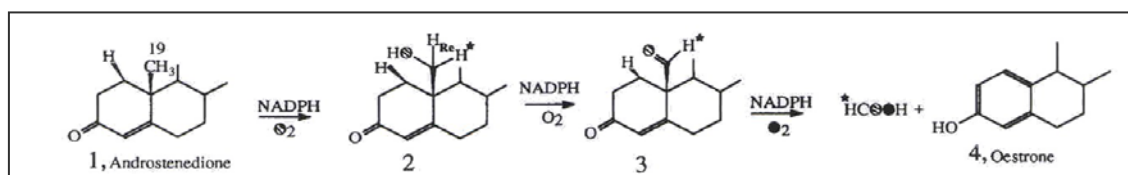


Fig.26: Schéma de la réaction d'aromatisation (Akhtar *et al.*, 1997).

Chez les vertébrés inférieurs, comme les poissons, l'aromatase P450 est essentiellement exprimée dans les gonades et au niveau du cerveau (Halm *et al.*, 2002). Chez les poissons (*Carassius auratus* et *Danio rerio*), deux formes d'aromatase ont été décrites (Tchoudakov *et al.*, 2001) : le gène *cyp19b* code pour l'aromatase P450B au niveau du cerveau, rétine, hypophyse et *cyp19a* est exprimé dans les ovaires.

Peu d'études montrent les effets *in vitro* et *in vivo* des composés exogènes sur l'activité de l'aromatase. Cependant quelques unes sont représentées au Tableau 6 : ces études montrent soit une inhibition, soit une activation de l'aromatase qui sont corrélées avec les niveaux d'oestradiol plasmatique. S'il y a activation de l'enzyme, alors il y a augmentation des niveaux d'oestradiol dans le sang et vice-versa.

Cependant, plusieurs précautions sont à prendre lors de l'utilisation de l'aromatase en tant que biomarqueur et de l'interprétation d'un changement de l'expression de cette enzyme. Ainsi, une étude de Trant *et al.* (1997) a mis en évidence une variation saisonnière de l'activité de l'aromatase au niveau de l'ovaire, corrélée avec les changements plasmatiques en oestradiol. Pendant les mois d'automne, une augmentation de la synthèse d'oestradiol correspond à une recrudescence ovarienne et la présence de transcrits de l'aromatase tandis qu'en été, ceux-ci sont indétectables, ce qui suppose que l'activité de l'aromatase ovarienne est extrêmement faible, voire inexistante à cette période (fig.27).

En plus de la présence d'un niveau élevé d'ARNm de P450aromB et d'une importante activité enzymatique au niveau du cerveau de l'adulte de poisson doré, une étude de Gelinat *et al.* (1998) a révélé la présence de variations saisonnières différentes suivant la zone du cerveau concernée. Le pic saisonnier d'ARNm du P450aromB à l'avant du cerveau (FB) a lieu en février, lors du début de la croissance gonadale. Les changements saisonniers dans d'autres parties du cerveau comme le cervelet, les lobes optiques et la médulla (M/HB) sont moins drastiques que dans le FB, approximativement 50 fois moins, mais tout en ayant le même profil : pic en février et diminution par la suite.

3.2) Histopathologie des gonades

3.2.1) Mécanismes d'expression sexuelle chez les poissons

L'expression ou la manifestation du sexe chez les poissons dépend de deux processus : la détermination sexuelle et la différenciation sexuelle. Ces mécanismes aboutissent à l'existence des phénotypes morphologiques, fonctionnels et comportementaux mâles et femelles (Piferrer, 2001). Les principaux types de manifestations sexuelles rencontrés chez les poissons ainsi que les différents facteurs qui contribuent à leur expression sont représentés dans le tableau 7.

a) La détermination sexuelle

La détermination sexuelle est définie comme étant la somme des éléments génétiques responsables de l'existence des gonades, d'une part mais également de la forme de celles-ci : organes fusionnés ou pairs, présence d'une cavité ovarienne ou non, etc.

Trois modèles de détermination sexuelle peuvent être attribués aux poissons : le modèle chromosomique, polygénique et la détermination par l'interaction sexe-environnement. L'héritage chromosomique dépend de la présence de chromosomes sexuels, appelés hétérochromosomes, qui ont accumulé la plupart des gènes responsables du développement sexuel. Ce système peut varier d'une situation simple, avec la présence des chromosomes XX/XY ou WZ/ZZ pour la plupart des poissons, à des situations plus complexes impliquant plus d'une paire de chromosomes ou même un nombre de chromosomes variant selon le sexe.

Le système polygénique correspond à l'existence de gènes sexuels femelles et mâles (souvent dominants) sur les autosomes. Le sexe de l'embryon résulte donc de la force relative des facteurs mâles et femelles, présents dans l'ensemble des chromosomes hérités de chaque parent. Enfin dans certains cas, la détermination sexuelle se fait sous contrôle génétique et environnemental. Dans le cas de l'athérinidé, *Menidia menidia*, la détermination sexuelle dépend de la température d'incubation lors de la phase critique du développement larvaire (Piferrer, 2001).

b) La différenciation sexuelle

La différenciation sexuelle se rapporte aux événements qui se produisent lors du développement embryonnaire et qui permettent l'expression du phénotype sexuel. Elle englobe tous les changements qui se produisent au niveau de la gonade primordial : la migration des germes cellulaires primordiaux (PGCs), l'établissement des crêtes gonadales et la différenciation des gonades en testicules ou ovaires. La différenciation sexuelle se produit d'abord chez les femelles. Les premiers signes de changements, perceptibles par observations histologiques plutôt que par des modifications externes, correspondent à l'entrée des ovogonies en méiose et/ou la prolifération des cellules somatiques pour former la cavité ovarienne. La différenciation sexuelle mâle est caractérisée par l'apparition des spermatogonies, l'arrangement des cellules germinales et des cellules somatiques en lobules ou tubules, la différenciation du système vasculaire, incluant les veines testiculaires, les artères testiculaires et les canaux irriguant le sperme (Nakamura *et al.*, 1998).

La différenciation gonadale peut prendre plusieurs formes chez les poissons ; les principales rencontrées chez les téléostéens sont représentées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Représentation des principaux systèmes de différenciation gonadale chez les téléostéens.

Types de différenciation gonadale	Caractéristiques	Exemples (Devlin & Nagahama, 2002)
Espèces Gonochores	- Développent des gonades mâles ou femelles. - Gardent le même sexe tout au long de leur vie.	
-Gonochores différenciés	- Les gonades indifférenciées se développent directement en testicules ou ovaires.	<i>Oncorhynchus kistuch, Abramis brama, Cyprinus carpio,...</i>
-Gonochores indifférenciés	- Tous les individus d'une population développent un tissu ovarien. Pour ~ 50% des individus, ce tissu se masculinise, on observe donc un intersexe intermédiaire. Finalement, la masculinisation aboutit à un testicule normal.	<i>Danio rerio, Barbus tetrazona,...</i>
Espèces hermaphrodites	- Développent des gamètes mâles et femelles durant leur existence.	
-Hermaphrodites synchrones	- Les individus produisent des gamètes mâles et femelles en même temps.	<i>Serranus sp., Siderea sp., Lythrypnus sp.,...</i>
-Hermaphrodites séquentiels	- Les individus produisent un type de gamètes, changent de sexe et produisent l'autre type à un cycle de ponte ultérieur.	
-Protandres	- Produisent d'abord des gamètes mâles après leur première maturation sexuelle.	<i>Amphiprion sp., Diplodus sp., Gonostoma sp.,...</i>
-Protogynes	- Produisent d'abord des gamètes femelles après leur première maturation sexuelle.	<i>Coryphopterus sp., Halichoeres sp., Thalassoma sp.,...</i>

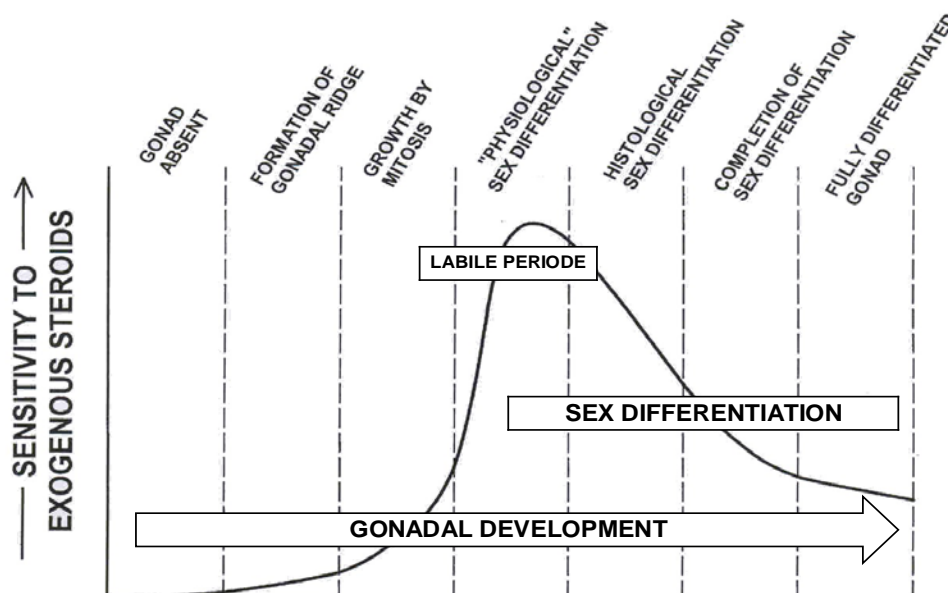


Fig.28: Diagramme représentant le changement de sensibilité à l'action des stéroïdes exogènes en relation avec les principales étapes de la gonadogenèse (adapté de Piferrer, 2001).

c) Contrôle de la différenciation sexuelle

Actuellement, les mécanismes de la détermination sexuelle qui sont impliqués dans le développement gonadale en terme d'initiation de la production de stéroïdes ainsi que dans la différenciation sont encore inconnus. Comme la production variable de stéroïdes sexuels nécessite des processus de régulation génétique, il est peu probable que seuls ces stéroïdes, ou que les enzymes associées à leur production, correspondent aux facteurs initiaux intervenant dans la détermination du sexe (Devlin & Nagahama, 2002). Cependant, la production de stéroïdes est fortement associée aux premières étapes de la différenciation sexuelle. Par exemple, l'inhibition de la synthèse d'oestradiol dans les premiers stades de développement, au moyen d'inhibiteurs de l'enzyme aromatasase, peut provoquer la masculinisation de *Coho salmo*, la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la plie japonaise (*Paralichthys olivaceus*), et le tilapia (*Oreochromis niloticus*) (Afonso & Wassermann, 2001). Liu et al. (2000) ont détecté, chez des truites arc-en-ciel, des transcrits d'ARNm de 11 β -hydroxylase, une enzyme intervenant dans la production de 11-kétotestostérone, dans des gonades encore non différenciées de futurs mâles. Le niveau de ces transcrits est 100 fois supérieur dans les futures testicules que dans les futurs ovaires. Le manque d'expression de la 11 β -hydroxylase chez les femelles, à ce moment, indique que cette enzyme ainsi que la 11-kétotestostérone joue un rôle important dans les premiers stades de la différenciation sexuelle chez la truite.

3.2.2) Perturbation de l'expression sexuelle chez les poissons

La complexité des processus physiologiques impliqués lors de la différenciation gonadale et de la maturation, notamment l'intervention des stéroïdes sexuels, offre une possibilité d'action aux agents extérieurs. Les études sur l'impact des stéroïdes exogènes, en milieu contrôlé, permettent de fournir des informations importantes sur les processus de perturbation de l'expression sexuelle. En effet, les mécanismes d'action, des xénobiotiques, dont certains sont connus pour mimer ces stéroïdes, restent encore peu clairs et les données collectées sur le terrain, dans le cadre de programmes de biomonitoring, sont également peu prévisibles.

a) Approche théorique : impact des stéroïdes exogènes

La majorité des recherches effectuées dans ce domaine a été réalisée dans le but de contrôler la reproduction des espèces utilisées en élevage. Cependant, plus de 50 espèces ont été utilisées dans des études ayant pour but la compréhension de l'inversion sexuelle due à des traitements aux stéroïdes exogènes (Devlin & Nagahama, 2002). Les facteurs essentiels intervenant dans la manifestation de l'inversion sexuelle due à ce type de traitement sont : le moment auquel on applique le traitement, la durée du traitement, la dose et le type d'hormones utilisées (Nakamura *et al.*, 1998).

L'administration des stéroïdes se fait essentiellement par voie alimentaire, immersion directe dans l'eau ou, moins fréquemment, par injection dans le sang. Le type d'androgènes le plus utilisé pour masculiniser les individus correspond au 17 α , méthyltestostérone (MT), ayant un effet significatif sur plus de 25 espèces étudiées (Devlin & Nagahama, 2002). Parallèlement, les traitements aux oestrogènes (essentiellement la 17 β -estradiol, l'éthynylestradiol et le diéthylstilbestrol) s'accompagnent dans la plupart des cas d'une féminisation des individus génétiquement mâles. Les doses utilisées lors de l'administration orale et en immersion dans l'eau se situent aux alentours de 5-500 mg/kg d'aliments et 50-1000 μ g/l, respectivement. Néanmoins, les doses et le type de traitement varient d'une espèce à l'autre (Devlin & Nagahama, 2002).

Tableau 9 : Liste des études effectuées dans le cadre de biomonitoring ou en laboratoire, qui mettent en évidence l'impact de certains polluants sur l'histologie des gonades ainsi que la morphologique et l'apparition des caractères sexuels secondaires.

Sites	Type de contaminants	Espèces étudiées	Effets observés	Références
Estuaire de Mersey (Angleterre)	Métaux lourds, PCBs, DDT, PAHs	Plie (<i>Platichthys flesus</i>)	Présence d'ovocytes protoplasmiques chez les mâles. (intersexe)	(Simpson <i>et al.</i> , 2000)
Baie de Tokyo	Composés oestrogéniques	Plies mâles (<i>Pleuronectes yokohamae</i>)	Présence d'ovocytes protoplasmiques chez les mâles. (intersexe)	(Hashimoto <i>et al.</i> , 2000)
Rivières de Mecklenburg (Allemagne)	Rejets industriels	Zoarces viviparus, Gasterosteus aculeatus, Perca fluviatilis	Présence d'ovocytes protoplasmiques chez les mâles. (intersexe)	(Gercken & Sordyl, 2002)
<i>In vivo</i>	4-tert-pentylphenol (composé oestrogénique)	Carpes mâles (<i>Cyprinus carpio</i>) juvéniles pendant la différenciation sexuelle	<i>Féminisation</i> : inhibition de la spermatogenèse, apparition d'ovocytes protoplasmiques, formation d'un oviducte à la place d'un canal déférent.	(Gimeno <i>et al.</i> , 1998a)
<i>In vivo</i>	4-tert-pentylphenol (composé oestrogénique)	Carpes mâles (<i>Cyprinus carpio</i>) sexuellement matures.	<i>Démasculinisation</i> : disparition des spermatozoïdes, fibroses, vacuolisation et atrophie de l'épithélium germinale, apparition d'intersexe.	(Gimeno <i>et al.</i> , 1998b)
<i>In vivo</i>	O,p'- DDT ; octylphenol (composé oestrogénique)	Plie mâles (<i>Paralichthys dentatus</i>).	Diminution significative de l'indice gonadosomatique (GSI).	(Mills <i>et al.</i> , 2001)
<i>In vivo</i>	Vinclozolin, p,p'-DDE et flutamide (composé antiandrogène)	Guppies mâles (<i>Poecilia reticulata</i>).	Inhibition du développement des gonopodes, réduction de la quantité de sperme et suppression de la parade nuptiale.	(Bayley <i>et al.</i> , 2002)

En général, les poissons sexuellement indifférenciés sont beaucoup plus sensibles aux traitements en stéroïdes exogènes. Il existe une période lors du développement, connue sous le nom de « période labile » durant laquelle la gonade encore indifférenciée est plus sensible à l'action des stéroïdes exogènes (Piferrer, 2001). Cette période correspond à l'étape appelée également la « différenciation sexuelle physiologique », durant laquelle les principaux processus, conduisant à une différenciation sexuelle définitive, se mettent en place (fig.28). Néanmoins, il est possible d'obtenir une inversion sexuelle en dehors de cette période moyennant l'utilisation de doses plus importantes en hormones et une période de traitement plus longue. De plus, l'évolution des premiers stades de développement diffère fortement chez les poissons et les périodes labiles se produisent donc à différents moments suivant les espèces (Piferrer, 2001).

Des transformations sexuelles incomplètes sont souvent observées lors de traitements aux stéroïdes chez les poissons. Ce type de transformation aboutit au développement de tissus testiculaires et ovariens au sein du même individu. Dans certains cas, ces conditions d'intersexe résultent de la production de gamètes fonctionnelles chez les espèces hermaphrodites. Toutefois, chez les gonochores, il est difficile de savoir si l'intersexualité provient d'un traitement insuffisant (dosage, période labile, durée) ou si certaines espèces sont incapables de répondre entièrement au traitement.

Les traitements excessifs en oestrogènes ou androgènes peuvent provoquer une interruption du développement gonadal ainsi qu'une stérilisation de l'individu (Devlin & Nagahama, 2002). Des traitements excessifs en androgènes peuvent également conduire à une diminution de la masculinisation et dans certains cas conduire à une féminisation. En effet, une étude de Mori et al. (1998) a montré que les androgènes pouvaient interagir avec les récepteurs oestrogéniques et pourraient donc avoir un effet féminisant direct dans certains cas. Lorsque leur concentration est élevée, les androgènes peuvent être également convertis en oestrogènes par l'aromatase et donc avoir un effet féminisant indirect. Piferrer et al. (1993) ont remarqué, chez le *Coho salmo*, une féminisation paradoxale avec l'utilisation d'androgènes aromatisables (17α -méthyltestostérone) alors qu'elle ne se produit pas après l'utilisation d'androgènes non aromatisables (17α -méthyldihydrotestostérone).

Finalement, dans la majorité des cas, les fonctions génétiques qui déterminent le sexe à l'état normal, ne permettent pas à l'individu traité de recouvrir son « état sexuel » génétiquement programmé. Ce qui signifie que les gènes impliqués dans la détermination sexuelle agissent très tôt dans le développement de l'individu ou que leurs effets sont insuffisants pour modifier le cours de la différenciation sexuelle établie par le traitement aux stéroïdes.

b) Impact des polluants

De nombreux types de polluants sont connus pour avoir une affinité envers les récepteurs stéroïdiens (tableau 1). Or, le processus de différenciation sexuelle ainsi que les mécanismes de contrôle endocrinien de la reproduction font intervenir ces stéroïdes sexuels. Il est donc normal que, à l'instar des traitements aux stéroïdes sexuels le rejet de telles substances dans l'environnement provoque de manière directe ou indirecte une modification de l'expression sexuelle des poissons contaminés. Le tableau 9 reprend les principales études ayant utilisé l'histopathologie des gonades et des caractères sexuels secondaires en tant que biomarqueur d'exposition aux EDCs.

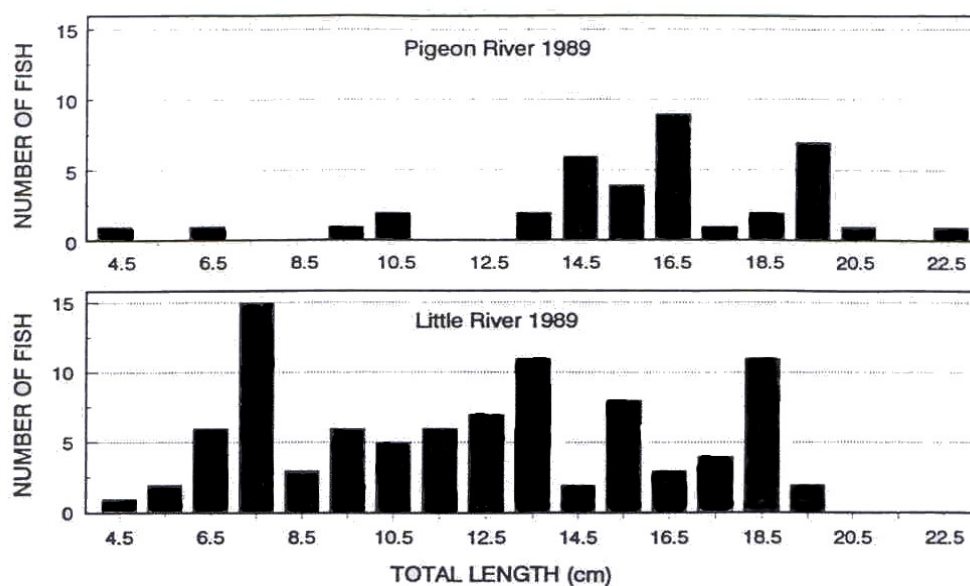


Fig.29 : Histogramme fréquence-taille de deux populations de Redbreast sunfish (*Lepomis auritus*) collectées dans un site contaminé par des effluents d'usine papetière (Pigeon river) et dans un site de référence (Little river) en 1989 (Adams et al., 1992).

Tableau 10 : Principaux processus dont l'altération éventuelle par un polluant est susceptible d'altérer la dynamique d'une population. (Craquet & Lagadic, 1998)

Fonction	Processus pouvant être perturbé au niveau	
	individuel	interindividuel
Reproduction	Orientation Équilibre Activité locomotrice Régulation (hormones) Acquisition des caractères sexuels primaires et secondaires Gonadogenèse, Gamétogenèse Développement des embryons Parturition Utilisation optimale de l'énergie : métabolisme, allocation des ressources	Agrégation Recherche de partenaires sexuels Accouplement Émission des gamètes Parade Nidification Capacités de prédation
Développement et Croissance	Recherche et prise de nourriture Tactismes divers Équilibre Activité locomotrice Apprentissage Régulation : facteurs de croissance Utilisation optimale de l'énergie : métabolisme, allocation des ressources, <i>fitness</i>	Couvaion Nourrissage des jeunes Apprentissage des jeunes Protection vis-à-vis des facteurs du milieu
Survie	Recherche et prise de nourriture Tactismes divers Orientation Équilibre Activité locomotrice Mécanismes homéostatiques Détoxification, capacité de réparation tissulaire, résistance aux parasites et aux maladies	Agression Protection vis-à-vis des facteurs du milieu Protection vis-à-vis des prédateurs ou des parasites

3.3) Paramètre de la population.

La structure d'âge d'une population est un véritable indicateur de son état de santé. Selon Dajoz (2000), on peut distinguer trois types de répartition des classes d'âges. Le premier type est dominé par les classes jeunes et est caractéristique des populations à fort accroissement. Le second est, à l'inverse, dominé par les individus plus âgés et est caractéristique des populations en déclin. Le troisième type est intermédiaire, la répartition des classes d'âges y est uniforme et caractérise les populations stationnaires.

Plusieurs études ont examiné l'effet de contaminations environnementales sur la structure des populations de poissons. Ainsi, Adams et al. (1992b) ont constaté que la population de Redbreast sunfish *Lepomis auritus* vivant dans un milieu contaminé par des effluents d'usines papetières était dominée par des individus plus gros et plus vieux que ceux de la population de référence et surtout que les stades jeunes étaient sérieusement touchés (fig.29). Ceci rapproche la population du site contaminé d'une population de type 2, donc en régression. Les auteurs expliquent cette différence par une diminution du recrutement ovocytaire moins important chez les femelles provenant de la rivière contaminée. En effet, les femelles possédaient un nombre important d'ovocytes atrétiques ainsi que de faibles niveaux d'oestradiol. Dans ce cas, s'il s'est avéré que la perturbation de la répartition des classes d'âges était due à une altération au niveau de la fonction reproductive, il est néanmoins important de savoir que la dynamique d'une population peut-être modifiée à cause du disfonctionnement d'autres processus (tableau 10). En effet, ces mêmes auteurs ont également réalisé une étude de biomonitoring sur la Oak ridge (Tennessee), connue pour recevoir des rejets industriels (Adams *et al.*, 1992a). Les poissons étudiés (*Lepomis auritus*) présentaient, dans les sites pollués, des niveaux élevés en enzymes de détoxification, de faibles niveaux en lipides, des dommages histopathologiques ainsi qu'une réduction de la croissance par rapport au site de référence. Dans ce cas, les auteurs ont expliqué la présence d'individus de plus petite taille par une réduction de la quantité en lipides, due à une perte métabolique, nécessaire au processus de détoxification. Cette perte énergétique résulte d'une diminution de l'énergie nécessaire à la croissance des individus.

Tableau 11 : Synthèse de l'évaluation de plusieurs biomarqueurs chez les poissons

Criteria	Biomarkers >											
	Phase I	Phase 2	Antiox	Biotrans	Proteins	Blood	Immune	Repro	Neurotox	Genotox	Histopath	Morpho
	EROD CYPIA	GST UDPGT	SOD CAT	bile FAC	HSP MT MXR	AST ALT	Leuko lympho	VTG ZRP	ACHE	DNA add DNA dam	Tissue	LSI CF
Reliable and easy assay	+	+	+	+	+	+	±	+	+	-	±	+
Sensitive to pollution	+	±	-	+	±	±	±	+	±	+	-	-
Known base-line data	+	±	±	+	-	±	±	±	±	+	+	+
Confounding factors	±	±	±	±	-	±	±	±	-	±	±	±
Response mechanism	+	±	-	+	±	-	-	+	±	+	±	±
Toxicological significance	±	+	±	±	±	+	+	±	±	+	+	±
Overall	5.0+	4.0+	2.5+	5.0+	2.5+	3.5+	3.0+	4.5+	3.0+	4.5+	3.5+	3.5+

Symbols : +, bon ; ±, moyen ; -, faible. **Abréviations**: phase I, enzymes de biotransformation de la phase I ; phase II, enzymes de biotransformation de la phase II ; antiox, enzymes antioxydantes ; biotrans, produits de la biotransformation ; proteins, protéines de stress, metallothionéines et MXR-protéines ; blood, transaminases du sérum ; immune, paramètre immunologique ; repro, paramètre reproductif ; genotox, paramètre génotoxique ; histopath, paramètre histopathologique ; morpho, paramètre morphologique

IV) Evaluation des différents biomarqueurs .

Actuellement, des biomarqueurs efficaces sont à notre disposition pour analyser l'exposition d'un individu à un polluant ainsi qu'évaluer les effets toxiques de cette substance. Cependant, des recherches approfondies sont nécessaires : la pertinence écologique de biomarqueurs plus sensibles et plus spécifiques devraient être validée avant que ceux-ci ne soient utilisés dans des programmes de biomonitoring standardisés ; à l'inverse, les recherches devraient se pencher sur l'augmentation de la sensibilité et de la spécificité des biomarqueurs dont la pertinence écologique est manifeste.

Par ailleurs, Van Der Oost et al. (2003) ont examiné différents biomarqueurs chez les poissons suivant six critères préétablis. Les paramètres détaillés et les résultats de leur évaluation sont indiqués au tableau 11. Un aperçu plus visuel de l'évaluation de ces biomarqueurs (fig.30) montre que les enzymes de la phase I (ex : EROD, CYP1A), les produits de la biotransformation (ex : les métabolites PAH biliaries), les paramètres reproducteurs (ex : VTG plasmatique), et les paramètres génotoxiques sont actuellement les biomarqueurs les plus utiles pour le biomonitoring. Cependant, il faut insister sur le fait que la valeur de certains biomarqueurs sera plus élevée lorsque des études supplémentaires sur certains sujets auront été réalisées avec succès. De plus, une remarque capitale est à faire quant à l'interprétation de cette dernière figure. Il est important de signaler que l'aperçu visuel de l'évaluation des biomarqueurs est simplifié. En effet, tous les critères donnent les mêmes valeurs (bon [+], 1 ; moyen [±], 0.5 ; faible [-], 0) et aucun facteur de grandeur n'a été inclus pour indiquer l'importance des différents critères. Il est impossible de proposer des facteurs de grandeur qui sont applicables en général ; ceux-ci dépendent, en effet, du but de l'investigation pour laquelle les biomarqueurs ont été utilisés.

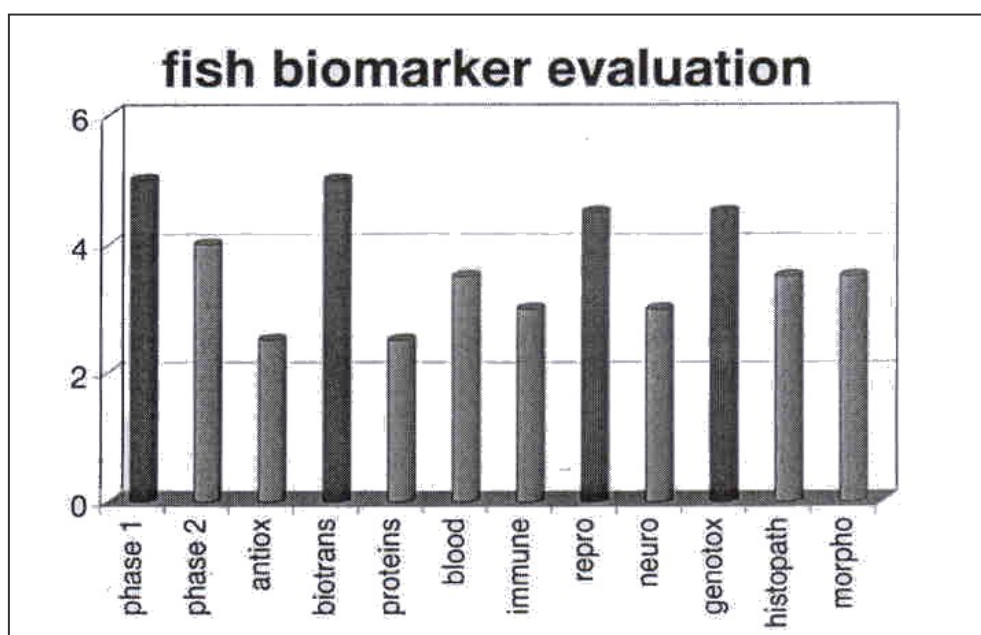


Fig.30 : Evaluation globale de différents biomarqueurs utilisés chez les poissons.

1) Espèce étudiée

Le goujon est un petit poisson téléostéen dont la taille maximale est de 20 cm, mais atteint généralement 15 à 17 cm en milieu naturel. La coloration du dos est brun-verdâtre, les teintes s'atténuent sur les flancs qui présentent des reflets bleutés, le ventre est gris à reflets argentés. Des taches rondes à linéaires se rencontrent sur les flancs.

Le goujon s'adapte bien à différents habitats. Il vit dans les rivières, les fleuves, les lacs, les canaux et les étangs, convoitant toutefois un habitat à fond graveleux, pierreux ou sablonneux, à courant modéré. Les jeunes poissons de l'année vivent généralement près de la surface (20 à 30cm) alors que les individus plus âgés restent en profondeur.

Une température minimale de 14 à 17°C est requise pour observer la ponte des femelles en milieu naturel. La période de fraie s'étend, selon les régions, de mi-avril à fin août, avec un pic d'activité reproductrice en mai-juin. Les mâles sont matures environ 15 jours avant les femelles, ce qui se remarque aisément par la présence de petits tubercules nuptiaux sur le front et les opercules rendant leur surface rugueuse au toucher.

Le goujon est un poisson à pontes fractionnées et multiples (ovogenèse dite «groupe synchrone» ou «asynchrone») (Kestemont, 1990). En milieu naturel, le goujon est sexuellement mature à 2 ans. La fécondité annuelle varie de 500 à 4500 œufs à 2 ans, de 1500 à 9000 œufs à 3 ans et de 3000 à 15000 œufs à 4 ans.

Le régime alimentaire du goujon est essentiellement constitué d'invertébrés planctoniques (rotifères, crustacés, principalement cladocères, puis copépodes et ostracodes) au stade de larve et d'alevin, et d'invertébrés benthiques (par ordre de préférence : insectes, crustacés, mollusques et vers) à l'état adulte. Il semble toutefois qu'il soit très opportuniste, son régime étant fixé dans une large mesure par l'abondance de la faune en place.

L'utilisation du goujon dans le cadre du biomonitoring présente des aspects antagonistes. Il s'agit d'une espèce qui tolère relativement bien la pollution de l'eau : faible concentration en oxygène dissout, pollution organique, forte température ainsi qu'une certaine résistance aux Cd (Knappen *et al.*, 2004). On a donc de grandes chances de le retrouver dans des sites choisis comme référence mais également dans les sites altérés où les espèces plus polluo-sensibles sont absentes. Il convient de noter que l'espèce est bien représentée et que le prélèvement de quelques individus ne nuit pas de façon dramatique à l'équilibre du milieu. Quatre vingt huit pourcents des individus d'une même population vivent dans une étendue de 100 mètres (Knappen *et al.* 2004). Par conséquent, la présence potentielle de polluants dans les tissus des individus prélevés révèle une contamination locale. Cependant, quelques critiques peuvent être évoquées quant à l'utilisation de ce poisson lors de programmes de biomonitoring. En effet, sa taille relativement petite ne fournit pas toujours la présence d'un matériel biologique (foie, sang, gonades,...) suffisant pour mener à bien toute une série d'analyses ultérieures. De plus, comme cela est souvent le cas chez les poissons à fécondité élevée, la durée de vie du goujon est relativement courte, la plupart des individus sexuellement actifs mourant après 4 ans. Ce poisson est soumis à la pollution pendant une durée relativement courte et n'aura donc pas l'occasion d'accumuler une quantité importante de polluants.

Tableau 12 : Analyse des composés organochlorés dans le Ton et dans l'effluent de la station d'épuration (28/8/2000) (GIREA, 2000)*.

Stations	EAUX (µg/l)							SEDIMENTS (mg/kg MS)	
	TON			EFFLUENT		NORME		Lamorteau	
	St Mard	Harmoncourt	Lamorteau	station épuration	rejet				
AOX	(6) 5	(3) 4	(730) 274	(1580) 1132	8200				
EOX			(< 200) <1	(< 200) 3					
Chlorophénols									
Pentachloroph.			(< 10) <0,3	(< 10) 0,22	0,4		(< 1) < 0,3		
Guaiacols			(< 10) <0,3	(< 10) 0,5			(< 1) < 0,01		
Chloroforme			(2,1) <0,6	(17,5) <1	58		(< 0,05) < 0,001		

() données de 1991

* analyses réalisées par l'ISSEP

AOX : Charge globale en composés organochlorés (80% à haut poids moléculaire : chlorolignines,...)

EOX : Composés organochlorés lipophiles (~10% AOX)

2) Milieux étudiés

2.1) Choix des différentes stations

Les différents sites ont été choisis en consultant différentes sources. Les recherches du professeur Thomé (LEAE, Laboratoire d'Ecologie Aquatique et d'Ecotoxicologie, Ulg) portant sur l'étude du niveau de contamination des rivières wallonnes par les PCBs a permis de sélectionner, sur base de la concentration en PCBs retrouvée dans les muscles de chevaines et d'anguilles, le site de Vaux-Sous-Chèvremont, sur la Vesdre comme station particulièrement touchée par ce type de polluant. Les stations de Lamorteau et d'Harnoncourt, sur le Ton, ont été choisies en confrontant les résultats obtenus à partir de deux études. La première correspond à l'étude de Didier (1997), visant à adapter l'indice biotique d'intégrité ichtyologique au bassin de la Meuse et le rapport réalisé en 2000 du GIREA (Groupe Interuniversitaire de Recherches en Ecologie Appliquée) étudiant l'impact des rejets de l'usine de pâte à papier Burgo-Ardenne sur les milieux récepteurs. Ces deux études s'accordaient pour conclure que cette rivière était fortement perturbée par ces rejets. La station d'Habay-La-Vieille, sur la Rulle, a été choisie comme site de référence suivant une évaluation qualitative, inscrite dans la base de données FIDES (*Fish Database of European Streams*), élaborée dans le cadre du programme FAME (*Fish-based Assessment Method for the Ecological status of European rivers*)

2.2) Le Ton à Lamorteau (aval de l'industrie de Burgo-Ardenne)

Le travail effectué par le GIREA (2000) associait cette station à la zone à barbeau sur base des mesures de pente (1.25 ‰) et de la largeur moyenne du cours (+/- 10 m). Le fond est constitué de galets et de graviers, mais les sédiments fins sont importants. Le courant y est assez rapide et la température annuelle mesurée atteint 14.6°C (GIREA, 2000). Les résultats de campagnes de mesures plus anciennes (GIREA, 1992) indiquaient que la température pouvait augmenter de plus de 5°C entre la station en amont et celle en aval de l'industrie de pâtes à papier Burgo-Ardenne. Les matières en suspension atteignaient des valeurs importantes de 30mg/l et les concentrations en chlorures et sulfates sont également élevées (jusqu'à 77mg Cl⁻/l et 210 mg S-SO₄⁻/l). Le rapport réalisé par le GIREA (2000) montre une nette amélioration de la qualité de cette station, spécialement au niveau des organochlorés et des dioxines dont les concentrations dans l'eau et les sédiments étaient faibles, toujours en deçà des normes autorisées (tableau 12). La qualité biologique de cette station a été évaluée par plusieurs indices basés sur les diatomées et sur les invertébrés benthiques. Les résultats montraient des valeurs moyennes mais en amélioration par rapport à l'étude de 1992. Le recensement ichtyologique effectué sur cette station confirmait cette bonne évolution. Dix espèces y avaient été répertoriées pour une biomasse totale de 411.2 kg/ha, dominée par le chevaine et le goujon.

2.3) Le Ton à Harnoncourt (amont de Burgo-Ardenne)

La pente calculée sur le secteur allant de l'entrée de Dampicourt à la sortie d'Harnoncourt à partir de cartes 1/25.000 est de 1.67 ‰. La largeur du cours d'eau à ce niveau est de ± 10m et ce tronçon possède des zones profondes et d'autres moins profondes à courant plus rapide. La température moyenne annuelle (1999) sur le Ton en amont du rejet est de 11.7°C (données de Burgo-Ardenne). D'après ces caractéristiques, on se situe dans la zone à barbeau supérieure de Huet, à la limite de la zone à ombre.

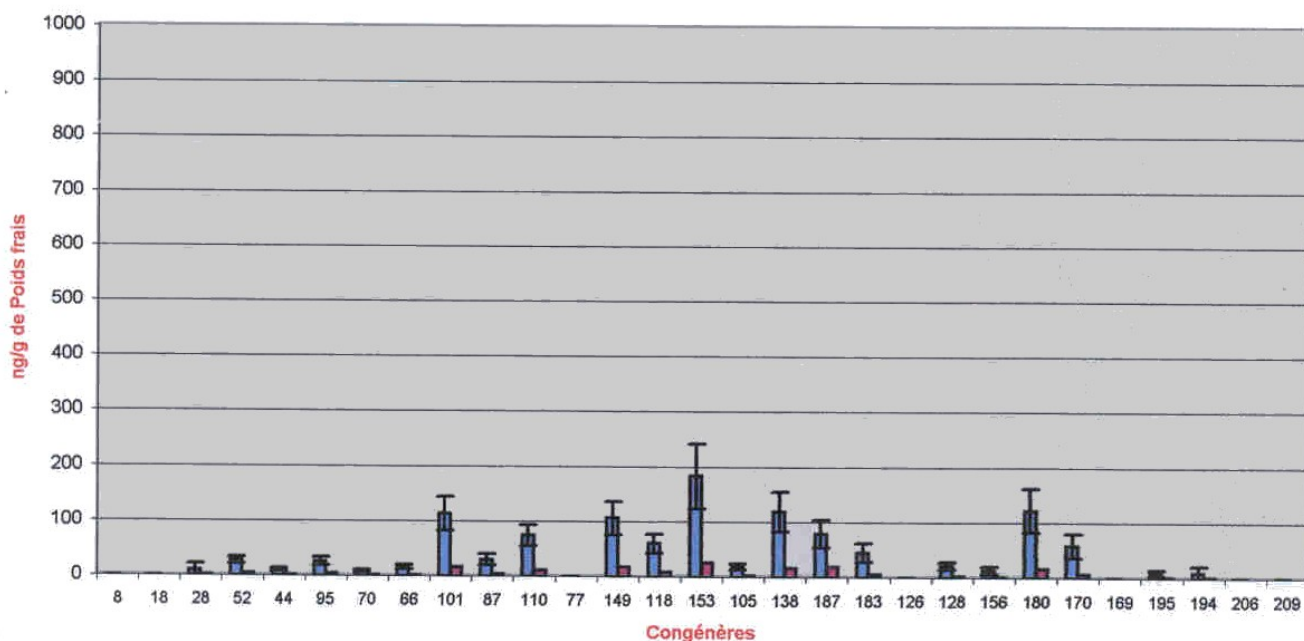


Fig.31: Concentration en PCBs par rapport au poids frais chez les chevaines femelles (bleu) et mâles (rouge) à Vaux-Sous-Chèvremont (Thome *et al.*, 2003).

Tableau 13 : Représentation des différentes dates de pêches.

CAMPAGNES		D1	D2	D3	D4	D5
SITES	Ton (Lamorteau)	22/10/03	8/03/04	30/03/04	27/04/04	25/05/04
	Ton (Harnoncourt)	23/10/03	/	31/03/04	/	26/05/04 <i>(18 individus)</i>
	Vesdre (Vaux-Sous-Chèvremont)	29/10/03	/	1/04/04	29/04/04 <i>(10 individus)</i>	/
	Rulle (Habay-La-Vieille)	19 /12/03	11 /03/04 <i>(12 individus)</i>	2/04/04 <i>(16 individus)</i>	30/04/04	28/05/04

Les populations piscicoles présentes caractérisent en effet plutôt cette dernière (salmonidés : truites, ombres). Lors du rapport GIREA (2000), dix espèces différentes ont été pêchées, pour une biomasse total de 154kg/ha, dont les principales sont la truite fario, l'ombre commun et les petites espèces accompagnatrices comme le vairon, la loche franche et le goujon. Trois espèces de cyprins ont également été recensées en moins grand nombre : le chevaine, la vandoise et le gardon.

2.4) La Vesdre à Vaux-Sous-Chèvremont.

Phillipart et Vranken (1983) ont classé cette station comme appartenant à la zone à ombre sur base des mesures de pente (5.2 ‰) et de largeur (25 m). Le courant y est assez soutenu et le fond est composé de blocs et de graviers. La Vesdre a toujours été réputée pour sa pollution aiguë résultant pour l'essentiel des nombreuses firmes textiles installées sur son cours. Cette pollution est observée à plusieurs niveaux : pollution trophique et organique, métaux lourds, et plus récemment en PCBs. En effet, une étude de Thomé *et al.* (2003) a révélé que, en général les poissons prélevés dans la Vesdre et dans la Meuse à Lixhe, sont nettement plus contaminés que les individus capturés dans les autres rivières wallonnes. Lorsque les concentrations sont exprimées par rapport au poids frais, les niveaux de contamination des chevaines mâles et femelles apparaissent assez faibles (5 à 70 ng PCBs/g) sauf dans la Vesdre et dans la Meuse où le niveau des concentrations atteint 300 ng/g. Les concentrations des différents congénères de PCBs retrouvées chez les chevaines à Vaux-Sous-Chèvremont sont représentées à la figure 31.

2.5) La Rulle à Habay-La-Vieille.

Cette station est classée comme appartenant à la zone à ombre sur base des mesures de pentes 15.3 ‰ et de la largeur moyenne égale à 8m. D'après la base de données FIDES (*Fish Database of European Streams*), cette station présente une faible pollution organique et toxique. Les berges sont peu altérées et le déplacement des poissons, ainsi que le débit, n'est entravé ou modifié par aucun obstacle majeur.

3) Matériels et méthodes

3.1) Pêches électriques

Cinq grandes campagnes de pêche ont été effectuées tout au long de l'année académique 2003-2004. Les dates de pêche sont représentées au tableau 13. La pêche s'est déroulée, selon le cours d'eau, avec 1 ou 2 groupes électrogènes DEKA générant un courant redressé utilisé à ± 300 volts pour une intensité de 2 à 6 ampères. L'équipe de terrain était proportionnelle à la taille du cours d'eau et au nombre d'anodes requises. Mis à part les goujons disséqués pour les analyses histologiques et endocrinologiques, tous les poissons capturés étaient remis à l'eau.

3.2) Prélèvement sur les goujons

Les goujons destinés aux prélèvements ont été mesurés (longueur totale, mm), pesés (g) puis assommés avant de subir une prise de sang dans la région ventro-caudale, juste en arrière de la nageoire anale. Cette prise de sang a été réalisée à l'aide d'une seringue, dont le volume maximal est de 1 ml, sur laquelle était fixée une aiguille de 0,5 mm de diamètre. Durant la première campagne de pêche, l'héparine (25000 unités) était utilisée comme anticoagulant. Cependant, de nombreux cas de coagulation se sont présentés, notamment sur la Rulle qui a dû être échantillonnée à nouveau le 19 décembre au lieu du 30 octobre. Afin de réduire les problèmes de coagulation, du citrate de sodium (1g/10ml) a été utilisé lors des autres campagnes de pêches. Un volume de sang de 0,2 à 0,9 ml était alors aspiré avant d'être stockés dans des eppendorfs préalablement traités au citrate de sodium. Après homogénéisation, les échantillons de sang ont été centrifugés sur place à 3500 RPM pendant 15 minutes. Le plasma a été transféré de nouveau dans des eppendorfs et maintenus dans la glace jusqu'à notre retour au laboratoire.

Après la prise de sang, les poissons étaient tués par incision de la colonne vertébrale au niveau de la nuque et rupture de la moelle épinière. Ils ont été ensuite soigneusement ouverts en évitant de percer tout organe. Le sexage a eu lieu à ce moment. Après l'ablation rapide du foie par l'équipe de l'université de Liège (Laboratoire d'Ecologie Aquatique et d'Ecotoxicologie, LEAE) pour les dosages EROD, les gonades ont été prélevées dans le but d'examen ultérieurs au laboratoire. Notons également que d'autres organes comme le tube digestif, le cerveau et les muscles ont été prélevés pour l'analyse de PCBs.

De retour au laboratoire, les gonades ont été pesées au centième de gramme près et une partie a été placée dans du bouin pour l'analyse histologique ultérieure alors que les échantillons de plasma ont été stockés à -80°C.

3.3) Dosage de l'activité EROD et PCB.

L'activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase a été mesurée par le LEAE. Le principe du dosage est basé sur la dééthylation de la 7-éthoxy-O-résorufine en hydroxyrésorufine dont la fluorescence est mesurée par spectrométrie. Le protocole de dosage se trouve en *annexe 4*. Les PCBs ont également été dosés par le LEAE, le protocole de dosage se trouve en *annexe 5*.

3.4) Dosage des stéroïdes sexuels plasmatiques (11-kétotestostérone et 17 β -oestradiol).

Ce dosage a été effectué par une méthode radioimmunologique (Radioimmunoassay : RIA). Le protocole utilisé a été décrit par Fostier et Jalabert (1986). Son principe est basé sur la compétition entre une hormone marquée (H^*) grâce à un isotope radioactif (H^3 ou I^{125}) et une hormone froide (H^o) de concentration connue (standard) ou inconnue (échantillons), vis-à-vis d'un anticorps spécifique (As). Dans un premier temps, l'hormone froide est mise en contact avec l'anticorps spécifique. Elle se trouve ainsi sous deux formes : libre ou complexée. On ajoute ensuite l'hormone marquée. La quantité d'anticorps et d'hormone marquée reste constante. Toute augmentation de la concentration en hormone froide entraîne une réduction du taux de fixation de l'hormone marquée. Par la suite, on sépare l'hormone marquée complexée à l'anticorps de l'hormone marquée libre. Il est dès lors possible de mesurer la radioactivité de l'une de ces deux fractions et d'en déduire la concentration en hormone froide présente dans l'échantillon. L'établissement d'une courbe standard permet de caractériser la décroissance du pourcentage d'hormone marquée qui se fixe à l'anticorps en présence d'une quantité connue et progressivement croissante d'hormone froide. Les stéroïdes sexuels doivent d'abord subir une double extraction qui permet de produire une rupture des

liaisons hormone-protéine. Ensuite, on effectuera la compétition entre l'hormone froide (standards et échantillons) et l'hormone marquée vis-à-vis de l'anticorps. Après une incubation de 12 heures à 4°C, la séparation entre l'hormone marquée libre et l'hormone marquée complexée à l'anticorps se fait par centrifugation, décantation et rinçage. La dernière partie du dosage consiste à mesurer la radioactivité émise par chacun des tubes (cpm). Cette mesure est effectuée par un compteur β (BECKMAN LS 6000IC). Un système de calcul proposé par Fostier et Jalabert (1986) permet de transformer les valeurs, exprimées en cpm, en valeurs exprimées en pg/tube. La quantité réelle d'hormone présente dans l'échantillon est calculée selon la formule :

$$C_c = C_t \times \frac{Q_t \times 1000}{Q_{pi} \times Q_{pe}}$$

C_c = concentration en pg/ml
 C_t = concentration en pg/tube
 Q_t = quantité de tampon reprise dans les stéroïdes extraits (μ l)
 Q_{pi} = quantité de plasma initiale utilisée pour le dosage (μ l)
 Q_{pe} = quantité de plasma extraite (μ l)

Notons que les mesures sont réalisées en duplicata pour chaque échantillon et standard. De plus, pour chaque hormone, on réalise une mesure de la radioactivité naturelle (background) et une mesure de la fixation totale. L'intégralité du protocole se trouve en *annexe 6*.

3.5) Dosage de la vitellogénine par ALP

La vitellogénine (Vg) et la vitelline sont des complexes lipo-phosphoprotéiques. Les phosphates de ces composés sont sous forme libre en milieu alcalin et peuvent être déterminés par spectrophotométrie (méthode « phosphomolybdate »). La concentration en phosphate « alcalin libre » (ALP) est un indicateur indirect du taux de Vg ou Vt car la corrélation avec la Vg dosée par utilisation d'anticorps spécifiques est très élevée (> 95%). Les principales étapes du dosage sont les suivantes : après précipitation des protéines plasmatiques, les culots obtenus sont lavés avec différents solvants organiques (éthanol absolu, chloroforme, acétone et diéthyléther). Après séchage des culots contenant essentiellement des protéines, une solution alcaline est ajoutée aux échantillons afin de libérer les phosphates des lipophosphoprotéines. Finalement les réactifs nécessaires aux mesures spectrométriques, phosphomolybdate et reducteur, sont ajoutés à la préparation.

L'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 660 nm. Le contenu en phosphate pour chaque tube est déterminé en utilisant l'absorbance des dilutions standards préalablement réalisées. La concentration en phosphate, pour chaque échantillon (en μ g ALP/ml plasma) peut être calculée par la relation suivante :

$$C_c = C_t \times \frac{V_t \times 1000 \mu l}{V_m \times V_p}$$

C_c = concentration en μ gALP/ml plasma
 C_t = concentration en μ gALP/tube
 V_t = Volume total présent dans les tubes (μ l)
 V_m = Volume de phosphomolybdate ajouté (μ l)
 V_p = Volume de plasma utilisé pour le dosage (μ l)

L'intégralité du protocole se trouve en *annexe 7*.

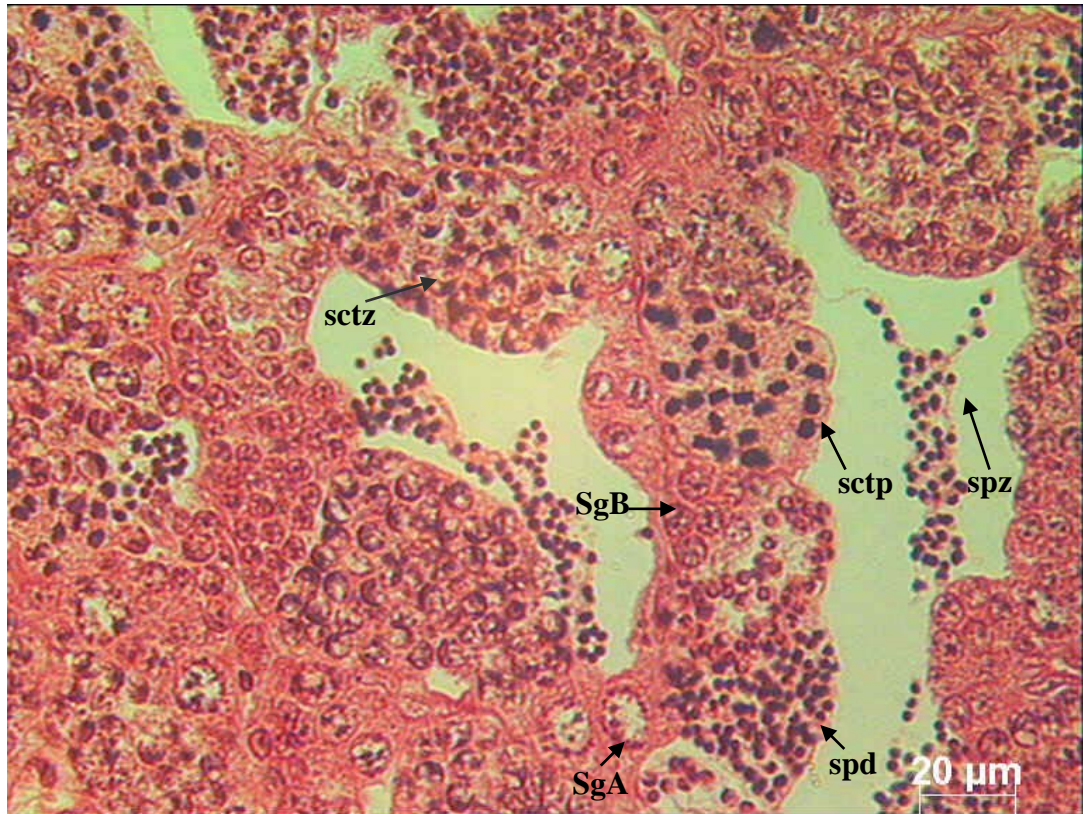


Fig.32 : Structure testiculaire présentant les différents stades de maturation des cellules germinales : **SgA** : spermatogonies A, **SgB** : spermatogonies B, **sctz** : spermatocystes zygotènes (noyaux en forme de parapluie), **sctp** : spermatocystes pachytènes (noyaux en forme d'amas condensé), **spd** : spermatides, **spz** : spermatozoïdes.

3.6) Analyse histologique

3.6.1) Manipulation des gonades

Après prélèvement et pesée, les gonades ont été fixées dans du Bouin (75% d'acide picrique, 20% de formol et 5% d'acide acétique glacial). La réalisation de lames histologiques peut être résumée en 6 grandes étapes :

- La déshydratation : Ce processus consiste à déshydrater les tissus afin de permettre à la paraffine de les pénétrer. Pour ce faire, les gonades vont être plongées, successivement, dans différents bains, pendant 12 heures. (4 bains de méthanol absolu, 4 bains de toluol et enfin 4 bains de paraffine). La déshydratation est réalisée automatiquement.
- L'enrobage des gonades avec de la paraffine.
- La coupe des blocs au microtome : les ovaires sont coupés à 4 μm alors que les testicules sont coupés à 3 μm .
- L'étalement des tissus sur des lames « superfrost ».
- La coloration des lames : les testicules sont colorés avec un trichrome à chaud (Hématoxyline de Regaud, à 57°C - solution de rouge - vert lumière) alors que les ovaires subissent un trichrome à froid (Bleu de Célestin, hémalum, phloxine, vert lumière). L'association du bleu de Célestin et de l'hémalum colore les noyaux des ovocytes en bleu foncé et l'hématoxyline de Régaud colorent les noyaux des cellules germinales mâles en noir, La phloxine, utilisée chez les femelles, colore les protéines en rouges, dont la vitelline. La solution de rouge colore le cytoplasme des cellules mâles en rouge. Le vert lumière est utilisé pour colorer les tissus conjonctifs en vert.
- Le montage : lors de ce processus, qui constitue la dernière étape de la réalisation de lames, la préparation est enduite de DPX et finalement recouverte d'une lame couvre-objet.

L'entièreté du protocole se trouve en annexe 8.

3.6.2) Analyse des coupes histologiques

Pour des raisons pratiques, l'analyse des coupes histologiques a été réalisée selon deux approches distinctes. Les coupes des testicules ont été analysées de manière qualitative. Bien que la spermatogenèse soit un processus continu, différents stades de maturité ont été définis, ceux-ci sont représentés à la figure 32. Pour chaque individu, l'évaluation des stades les plus matures atteints ainsi que la présence d'intersexe a été effectuée. Les coupes des ovaires ont été analysées de manière quantitative. Bien que l'ovogenèse soit également un processus continu, elle peut être généralement divisée en quatre étapes chez les poissons téléostéens : la croissance primaire de l'ovocyte, la vitellogenèse endogène, la vitellogenèse exogène et la maturation finale (Rinchard *et al.*, 1998). Dans le cadre de cette étude, chaque ovaire a été classé selon la présence de stade ovocytaire le plus avancé (tableau 14). Pour chaque lame, la proportion des différents stades ovocytaires a été réalisée. La mesure moyenne des diamètres des ovocytes les plus avancés a également été effectuée, excepté pour les ovules et follicules atrétiques. L'extrapolation de résultats obtenus d'une surface à la réalité morphologique tridimensionnelle suppose un certain nombre de correction tenant compte des caractéristiques des échantillons à analyser. Dans le cas des ovaires, contenant donc des ovocytes sphériques, une correction pour l'extrapolation en trois dimensions divise la fréquence des tailles des particules par le diamètre moyen de la particule, car il est évident qu'une particule de grand

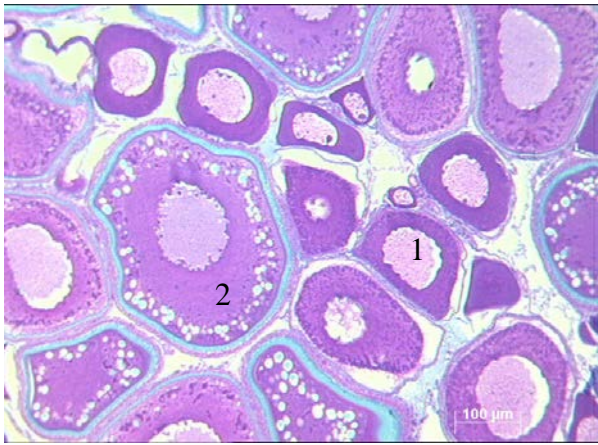


Photo 1 : ovocyte protoplasmique, 1 ; ovocyte en prévitellogenèse précoce, 2.

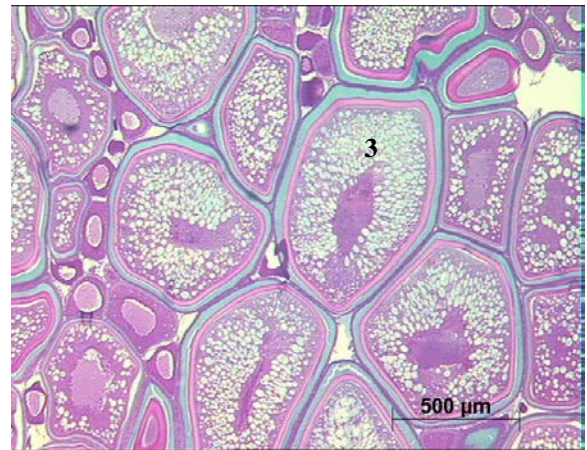


photo 2 : ovocyte en prévitellogenèse avancée, 3.

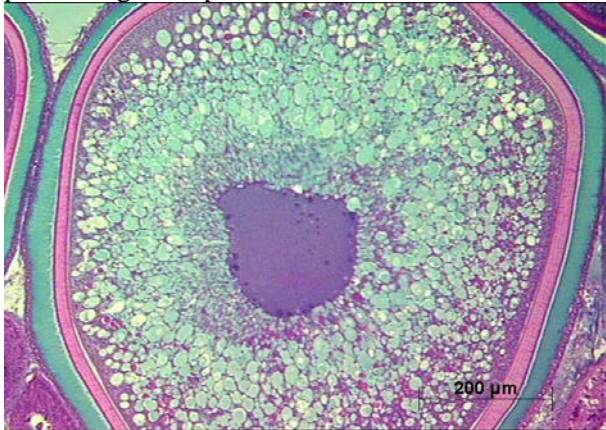


Photo 3 : ovocyte en vitellogenèse précoce

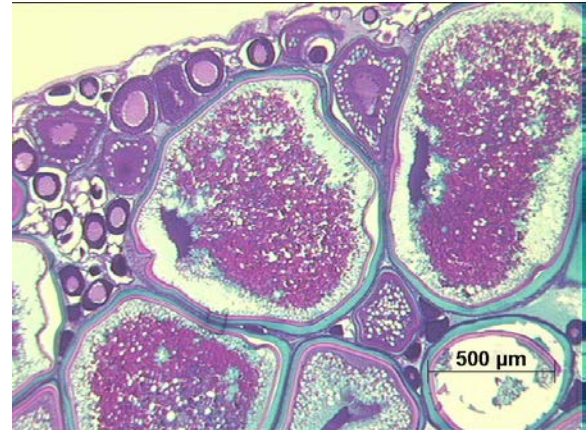


Photo 4 : ovocyte en vitellogenèse avancée



Photo 5 : Ovocyte en maturation finale.

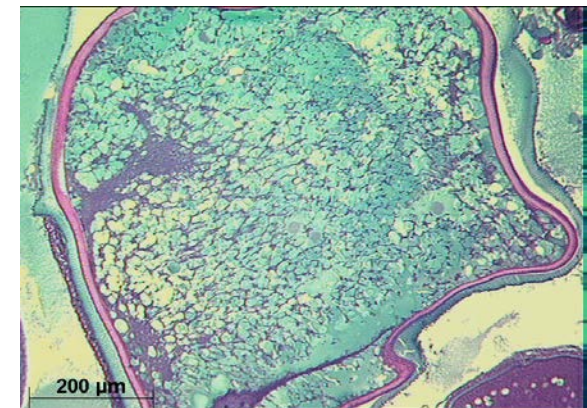


Photo 6 : ovule (absence de granulosa et thèque)

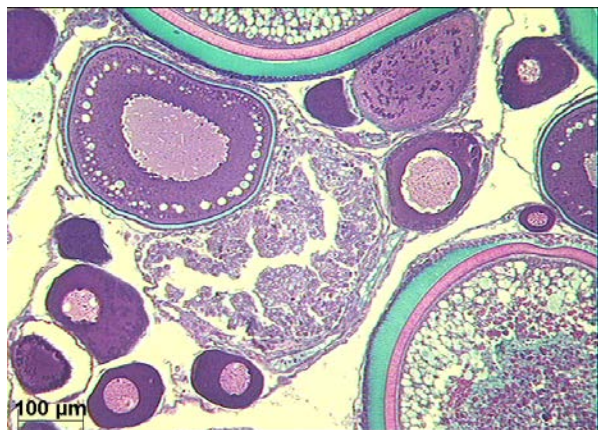


Photo7 : Follicule atrétique post-ovulatoire

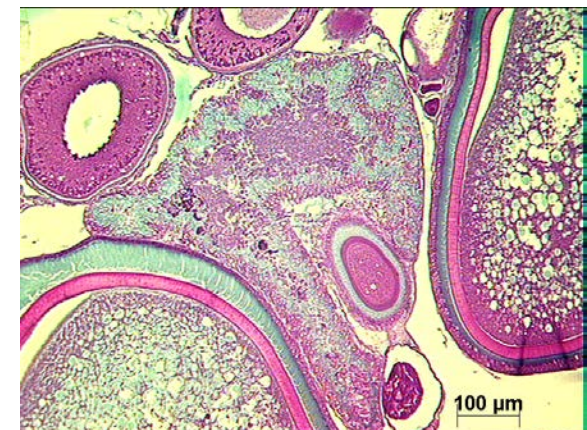


Photo8 : Follicule atrétique pré-ovulatoire

Tableau 14 : Description des différents stades ovariens du goujon (adapté de Rinchard *et al.*, 1993). Les photos correspondantes se trouvent en vis-à-vis.

Stade ovarien	Stade ovocytaire présent dans l'ovaire	Description de l'ovocyte le plus avancé
(1) Immature	Ovocyte protoplasmique	Ovocytes sans substances vitellogéniques
(2) Prévitellogenèse précoce	Ovocyte protoplasmique et ovocyte en prévitellogenèse précoce.	Apparition de vésicules de glycoprotéines sur 2 ou 3 rangées en périphérie du cytoplasme.
(3) Prévitellogenèse avancée	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse.	Ovocyte avec cytoplasme rempli de vésicules glycoprotéiques, différenciation des membranes folliculaires.
(4) Vitellogenèse précoce	Ovocyte protoplasmique, ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et ovocyte en vitellogenèse précoce.	Les globules de vitellus (lipoprotéines) apparaissent et occupent 2 à 3 rangées en périphérie du cytoplasme.
(5) Vitellogenèse avancée	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et de la vitellogenèse.	Le cytoplasme est rempli de globules de vitellus qui repoussent en périphérie les vésicules de glycoprotéines. Apparition du micropyle et migration du noyau vers celui-ci.
(6) Maturation finale	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et vitellogenèse, apparition de GVBD (germinal vesicle breakdown) et ovule.	Accolement et éclatement du noyau près du micropyle. Reprise de la méiose jusqu'à la métaphase de la deuxième division. (bloqué jusqu'ici en prophase I) et enfin ovulation.
(7) Interponte.	Ovocyte protoplasmique et ovocyte à différents stades de la prévitellogenèse et vitellogenèse, apparition de follicules postovulatoires.	Hypertrophie des cellules granulaires et thécales et ensuite apparition d'autophagocytose.
(8) Postponte (non observée)	Ovocyte protoplasmique et follicules pré et post ovulatoires.	Les cellules de la granulosa s'hypertrophient et la substance vitelline dégénère.

diamètre, à nombre égal avec une particule de petit diamètre a plus de chance d'être représentée dans une section aléatoire (Kestemont, 1987). Notons que seuls les ovocytes dont la coupe passait par le noyau en position généralement centrale ont été mesurés, de manière à éviter des problèmes de stéréologie (Weibel, 1979).

3.9) Analyses statistiques

La dynamique stéroïdienne et l'évolution histologique des gonades étant naturellement différentes entre des individus de sexe différent, l'analyse des paramètres mesurés s'est effectuée en deux étapes : d'une part chez les femelles et d'autre part chez les mâles.

Pour des raisons pratiques et une meilleure compréhension, les dates de pêches considérées dans la présentation et l'analyse des résultats correspondent aux différentes campagnes de prélèvements (tableau 13).

Pour chaque sexe, une première analyse en composante principale, de type centrée réduite, nous a permis d'obtenir une meilleure visualisation des corrélations qui pouvaient exister entre variables et d'obtenir une brève description des principales tendances observées dans l'évolution des paramètres étudiés.

Les contraintes expérimentales et environnementales ne nous ont pas permis d'avoir un plan d'échantillonnage équilibré. En effet, dans certaines stations, aucun poisson n'a été pêché les 8 et 9 mars, ainsi que le 28 avril et 27 mai (tableau 13). Par conséquent, l'effet du site et du temps sur les variables quantitatives ont été déterminés grâce à l'application d'un modèle linéaire généralisé (GLM). Afin d'obtenir une distribution normale, les valeurs des paramètres étudiés : RGS (rapport gonadosomatique), diamètres des ovocytes les plus avancés ainsi que les concentrations en vitellogénine et stéroïdes sexuels ont été préalablement transformées par l'équation : $y = \log(x+1)$. Notons que les valeurs représentées par un seul individu n'ont pas été pris en compte dans l'analyse statistique des données. Dans le cas où le GLM rapportait un effet de l'interaction du site et de la date sur les variables étudiées, un test de comparaison de moyenne « post hoc » a été systématiquement réalisé pour chaque variable afin de comparer les dates au sein d'un même site et les sites au cours d'une même campagne. Le test post hoc de Scheffe a été utilisé après vérification de l'homogénéité des variances, mis en évidence par le test de Levene. Le test non paramétrique de Tukey a été réalisé dans le cas contraire. Les modèles linéaires généralisés ainsi que l'analyse en composantes principales ont été effectués sur le logiciel « R » ; les tests post hoc ont été réalisés sur le logiciel « SYSTAT ».

Résultats

1) Analyse descriptive des données

Dans le cas des individus mâles, l'analyse en composantes principales (ACP) n'a pas permis de représenter le maximum d'informations en deux dimensions. Par conséquent, la projection en deux dimensions du jeu de données correspondant aux mâles attribuait des corrélations aberrantes entre variables connues pour être foncièrement différentes. En effet, l'ACP montrait une corrélation entre les variables E2 et 11-KT ainsi qu'entre les variables ALP et RGS, alors qu'une analyse en régression linéaire révèle, en fait, un coefficient de détermination égale à 0,05 entre les deux premières variables et 0,083 pour les variables de l'ALP et le RGS. Pour ces raisons, les résultats de l'analyse en composantes principales effectuée sur le jeu de données des femelles, uniquement, sera mentionné dans ce travail.

1.1) Les femelles

Les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur les femelles permet de se rendre compte d'une certaine corrélation entre les variables suivantes : E2, RGS, diamètre des ovocytes les plus avancés et valeurs d'ALP (fig.33). Une analyse sur Excel a montré un coefficient de détermination égale à 0,59 entre la variable « ALP » et « le diamètre des ovocyte ». Les valeurs propres sont indiquées à la figure 33. Les deux premiers axes représentent, à eux seuls, 78 % de la variance totale. Les résultats de l'ACP sont les suivants : les profils de distribution, le long de l'axe horizontal, des individus capturés à des dates différentes varie d'une station à l'autre (fig.34). Ceci suggère que l'effet du temps joue un rôle différent, selon la station considérée, sur le RGS, le diamètre des ovocytes et les concentrations en ALP et E2 des individus. Ainsi, à Lamorteau, il semble que les individus capturés en fin novembre présentent de faibles valeurs pour ces derniers paramètres, les individus capturés à partir du début mars semblent présenter des valeurs plus élevées, alors que pour les stations d'Harnoncourt et Vaux-Sous-Chèvremont, les valeurs des variables contribuant le plus à la formation de l'axe horizontale semblent évoluer progressivement dans le temps. A Habay-La-Vieille, l'ACP semble nous indiquer des valeurs élevées pour ces variables chez les femelles prélevées à partir de fin avril.

Les résultats de l'ACP effectuée, pour chaque date, sur les femelles provenant des différents sites nous montre que les différences entre sites évoluent également dans le temps, exception faite en fin novembre où les individus des différentes stations montrent tous des valeurs faibles pour l'ALP, le RGS, l'E2 et le diamètre des ovocytes (fig.35). A l'inverse, en fin mai, les individus montrent tous des valeurs élevées pour ces variables. De fortes différences semblent se présenter entre les stations de Lamorteau et d'Habay-La-Vieille, surtout en mars. L'axe vertical, essentiellement corrélé à la variable « 11-KT » ne semble pas intervenir dans la différence de distribution des individus. Néanmoins, les femelles pêchées sur la Vesdre, à Vaux-Sous-Chèvremont, en fin avril, présentent une forte variabilité pour ce paramètre.

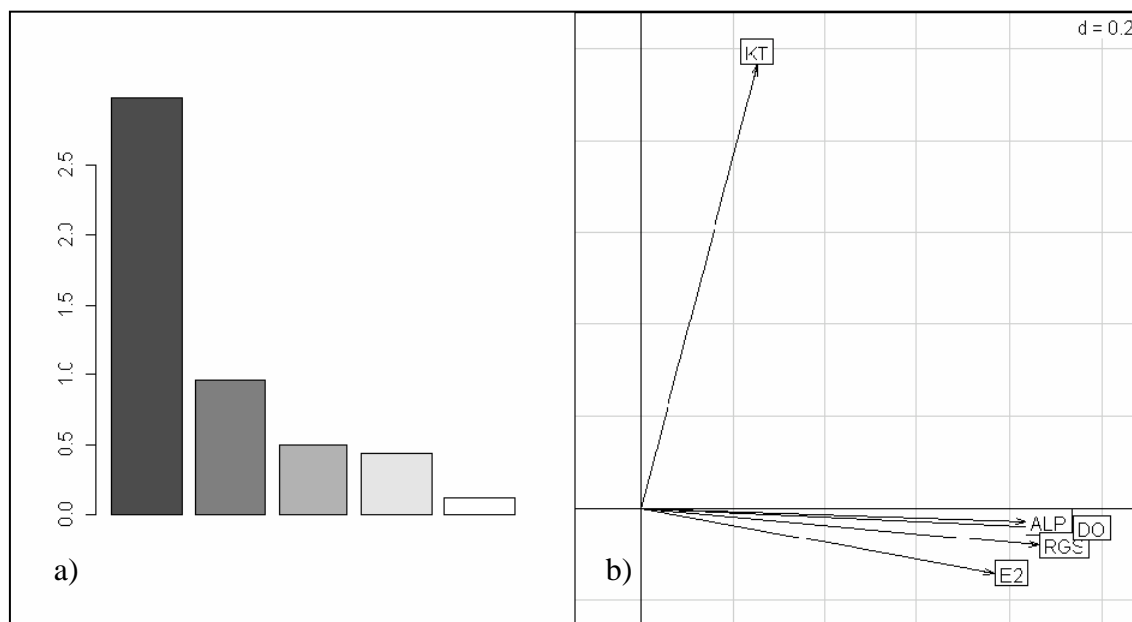


Fig. 33 : Résultat de l'ACP effectuée sur le jeu de données des femelles. a) Résultats des valeurs propres b) Représentation des variables sur un plan en deux dimension. E2 : 17β -oestradiol, ALP : phosphate labile alcalin, DO : diamètre des ovocytes les plus avancés, RGS : rapport gonadosomatique.

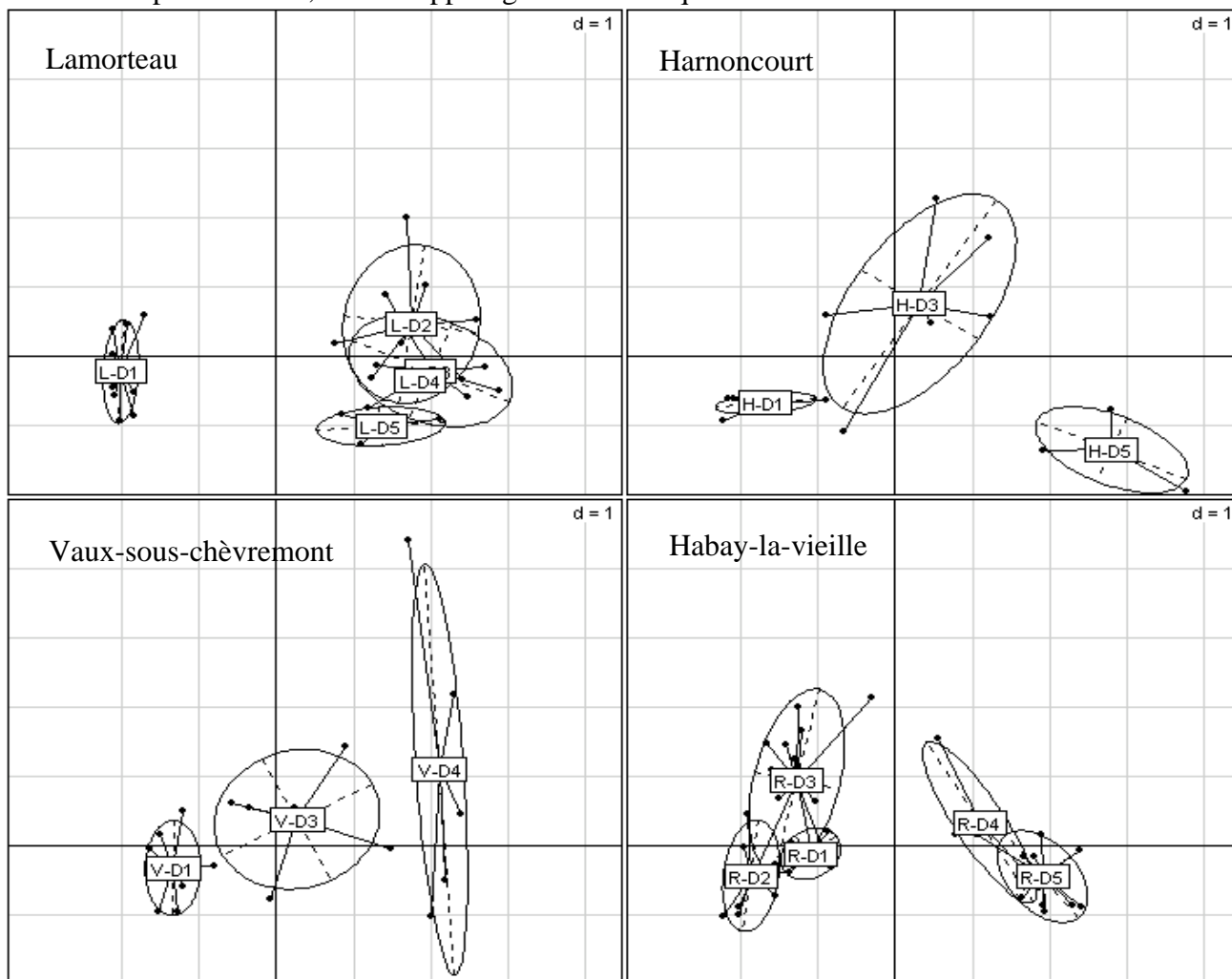


Fig.34 : Résultat des ACP réalisée chez les femelles, groupées par site. L'orientation des variables est représentée à la figure 32, b. Les individus compris dans un même cercle correspondent à la même date. L : Lamorteau ; H : Harnoncourt ; V : Vesdre ; R : Rulle.

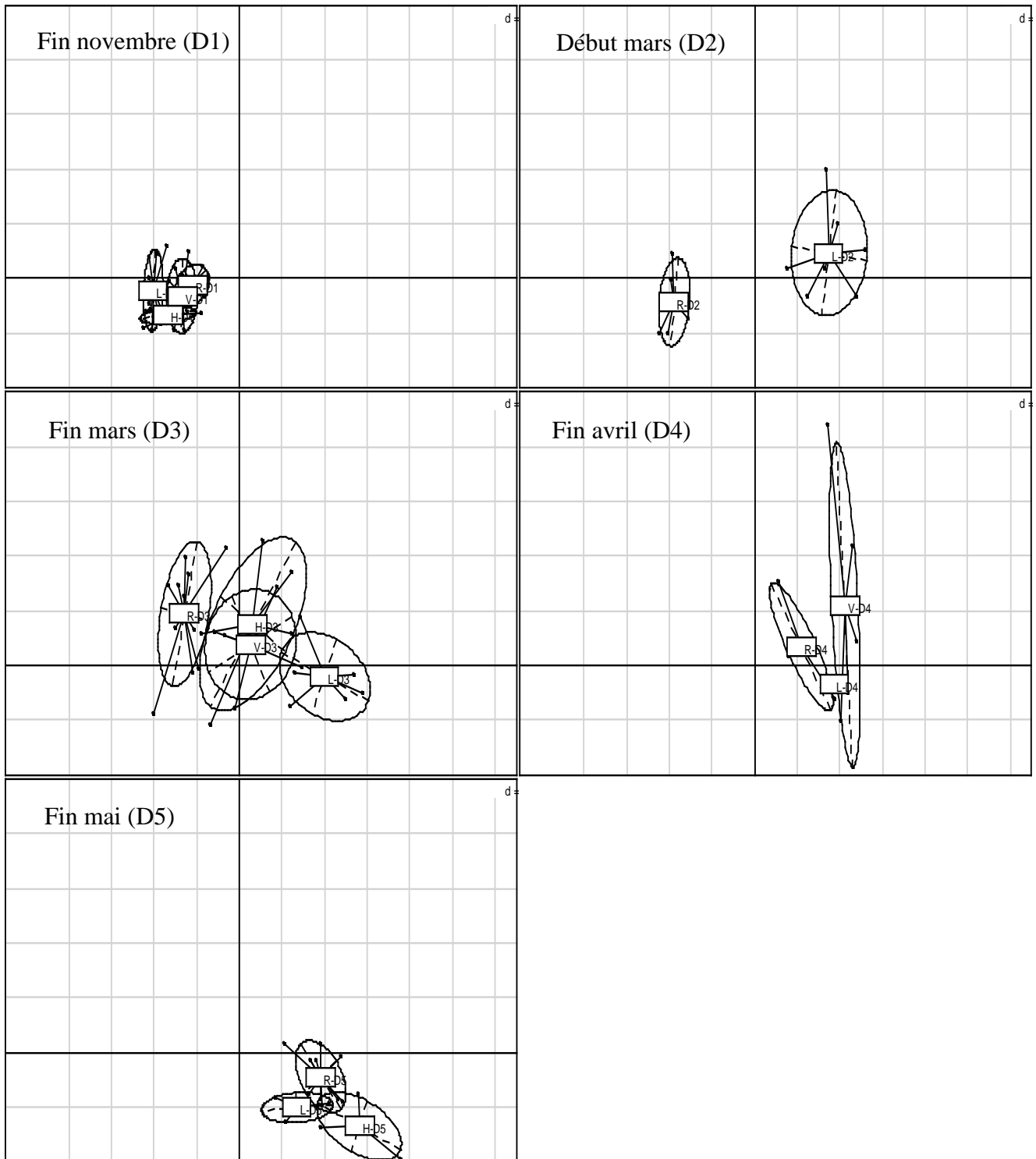


Fig. 35 : Résultat des ACP réalisées sur les femelles, groupées par date. L'orientation des variables est représentée à la figure 32, b. Les individus compris dans un même cercle correspondent au même site. L : Lamorteau ; H : Harmoncourt ; V : Vesdre ; R : Rulle.

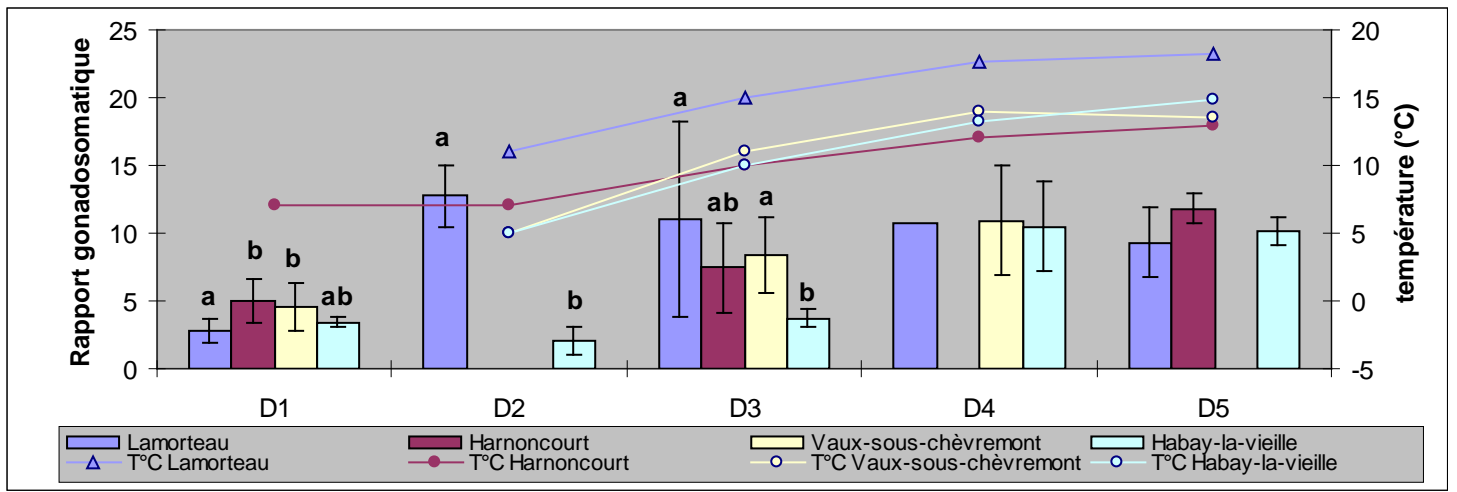


Fig.36 : Comparaison des rapports gonadosomatiques chez les femelles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

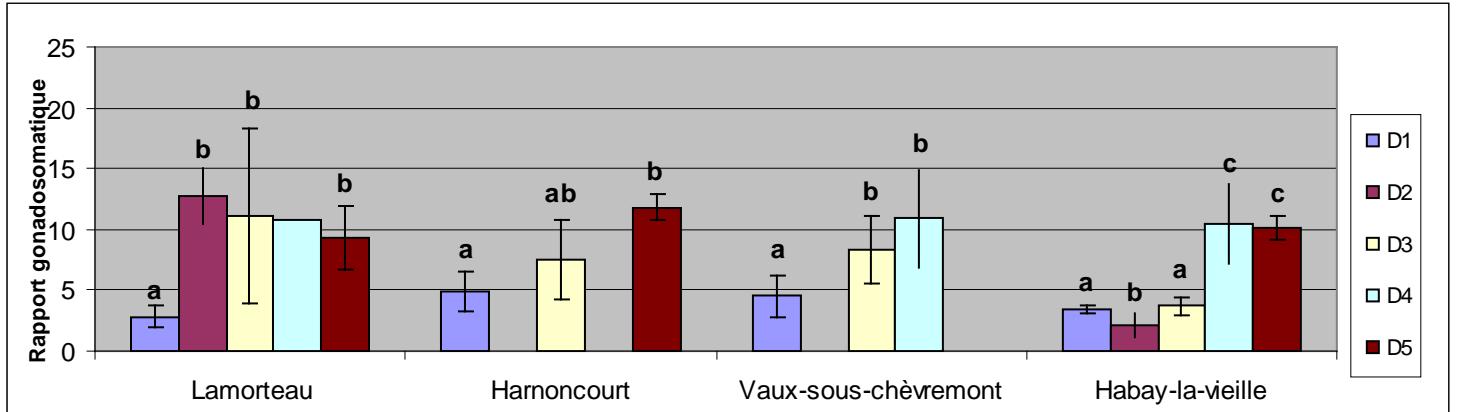


Fig.37 : Comparaison des rapports gonadosomatiques chez les femelles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

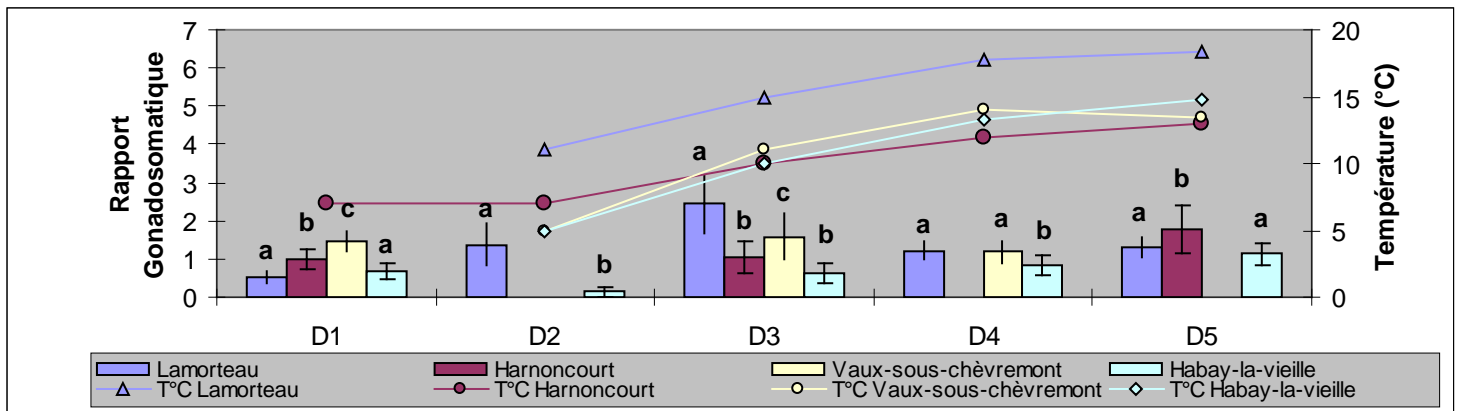


Fig.38 : Comparaison des rapports gonadosomatiques chez les mâles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

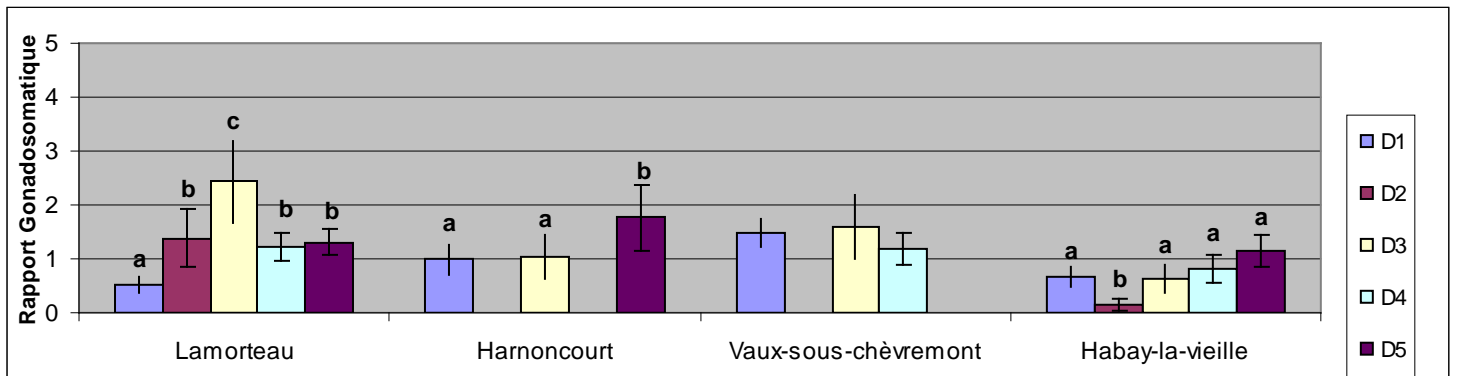


Fig.39 : Comparaison des rapports gonadosomatiques chez les mâles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

2) Paramètres morphologique et histopathologique

2.1) Rapport gonadosomatique (RGS)

2.1.1) Femelles

L'évolution des différences de RGS pour les femelles entre sites est représentée à la figure 36. Globalement, les valeurs de RGS varient, pour l'ensemble des stations, de 5 avant la période de reproduction (fin novembre) à 10 en période de reproduction (à partir de fin avril jusque fin mai). Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif pour les paramètres de la date, du site et de la l'interaction date - site ($p < 0,001$) sur le rapport gonadosomatique des femelles.

- L'application de test post hoc a révélé une évolution dans les différences de RGS entre sites (fig.36). Durant la première campagne de pêche, les individus présents sur les sites d'Harnoncourt et de Vaux-Sous-Chèvremont présentent des RGS supérieurs aux individus présents sur les autres stations. Les tendances s'inversent ensuite et les valeurs de RGS à Lamorteau deviennent significativement supérieures à partir du début mars (D2) jusqu'à fin mars (D3) où les femelles de Habay-La-Vieille uniquement présentent un RGS plus petit. Finalement, les valeurs de RGS des 4 stations se stabilisent durant les 2 dernières campagnes de pêches pour atteindre des valeurs comprises entre 9 et 12.

- Comme prédit par l'analyse en composante principale, les profils de RGS (présentés à la fig.37) pour les femelles des différents sites suivent ceux de l'ALP (voir fig.53). Dans le cas d'Habay-La-Vieille, après transformation en logarithmes, les valeurs de l'ALP et du RGS montrent un $r^2 = 0,48$. Globalement, Lamorteau présente une brusque augmentation du RGS au début mars (D2) où les valeurs se stabilisent jusqu'en fin mai (D5) mais présentent une grande variabilité alors que les valeurs de RGS des autres stations augmentent plus progressivement pour atteindre des niveaux relativement stables jusqu'en fin mai pour Harnoncourt, fin mars pour Vaux-Sous-Chèvremont et fin avril (D4) pour Habay-La-Vieille. Celle-ci présente cependant une faible valeur en D2, également observable pour la variable de l'ALP et E2.

2.1.2) Mâles

L'évolution des différences de RGS pour les mâles entre sites est représentée à la figure 38. Les mâles présentent un RGS nettement plus faible que les femelles. Dans le cadre de cette étude, les valeurs se situent entre 0.13 pour les mâles prélevés à Habay-La-Vieille au début mars et 2.44 pour ceux prélevés à Lamorteaux en fin mars (D3). Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif de la date, du site et de la l'interaction date - site ($p < 0,001$) sur le rapport gonadosomatique des mâles.

-Un test post hoc a permis de révéler les différence entre sites, pour chaque date (fig.38). De nouveau, les différences de RGS entre stations diffèrent dans le temps. Fin novembre (D1), les plus fortes valeurs de RGS (~1,5) se retrouvent à Vaux-Sous-Chèvremont, alors que les stations de Lamorteau et d'Habay-La-Vieille montrent des faibles valeurs (~0,5). Au début et à la fin du mois de mars, les tendances changent ; en effet, les valeurs atteintes à Lamorteau sont significativement supérieures à celles des autres stations, les valeurs d'Habay-La-Vieille restant, pour toutes les dates, les plus faibles.

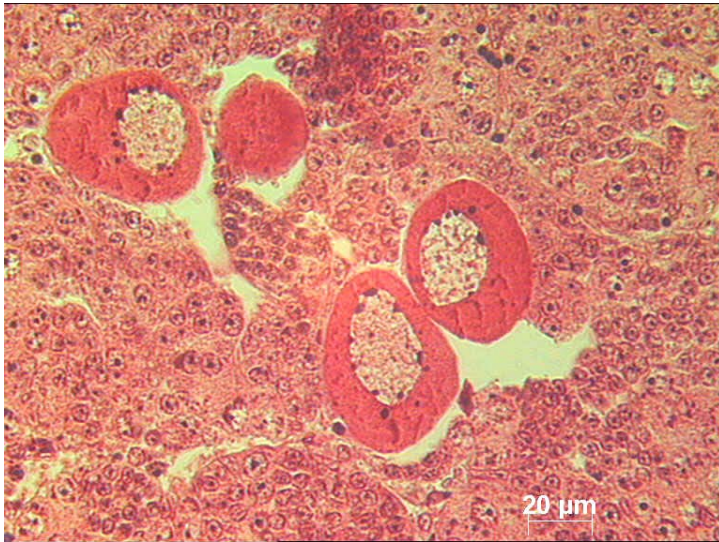


Fig.40 : Structure testiculaire avec présence de plusieurs ovocytes protoplasmiques.

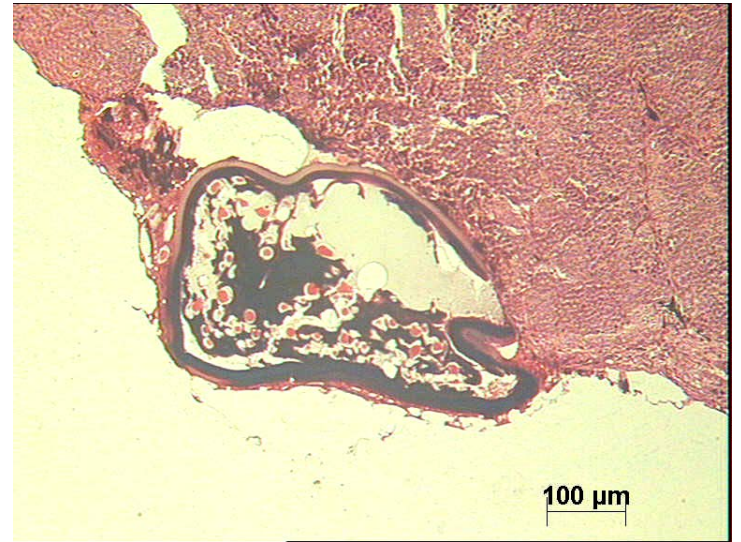


Fig.41 : Structure testiculaire avec présence d'un ovocyte de type 3.

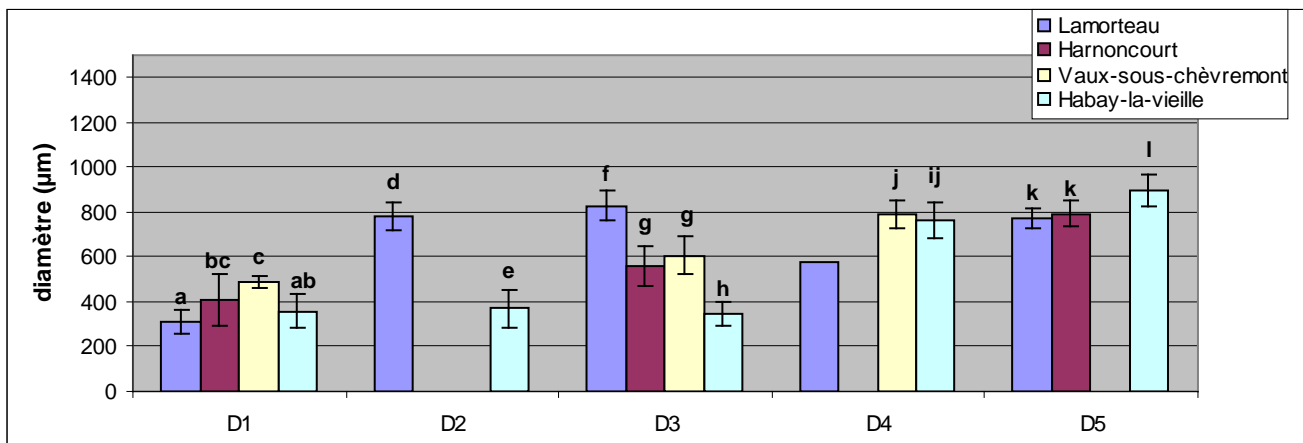


Fig.42 : Comparaison des diamètres des ovocytes les plus avancés. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

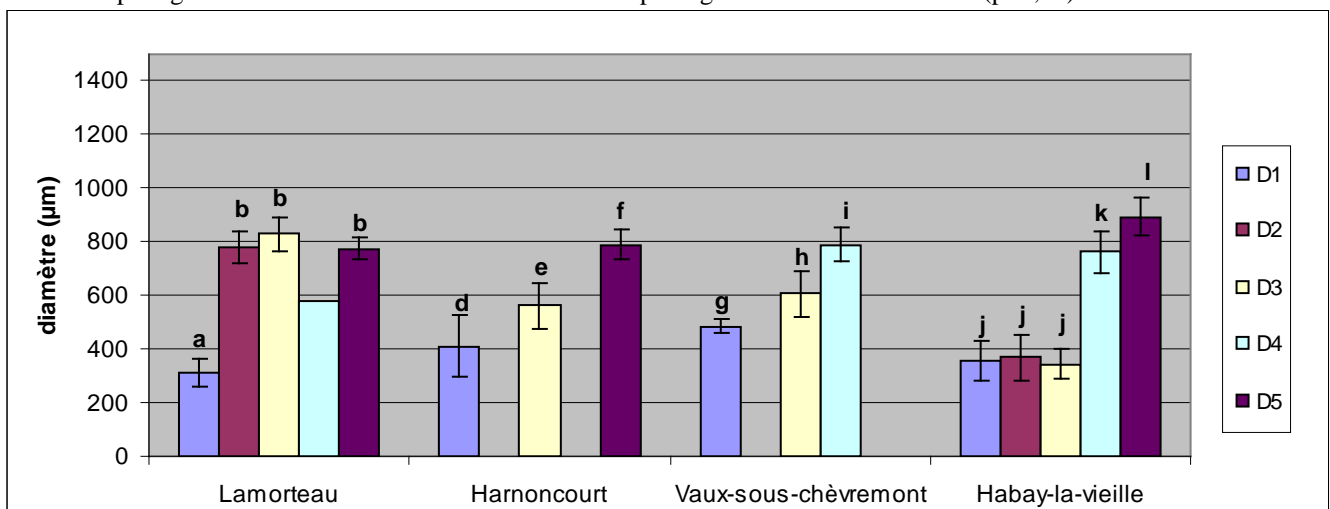


Fig.43 : Comparaison des diamètres des ovocytes les plus avancés. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

Les valeurs des RGS à Lamorteau et à Vaux-Sous-Chèvremont semblent se stabiliser en fin avril (D4) alors que le RGS à Harnoncourt est supérieur à la fin du mois de mai (D5).

- Ces différences s'expliquent par un profil d'évolution du RGS différent selon les stations étudiées (fig.39). Comme pour les femelles, le RGS des mâles à Lamorteau augmente dès D2, atteint un pic en D3 (~2,4) et se stabilise pour atteindre une valeur de ~1,2 en D4 et D5. Les autres stations présentent un profil d'évolution différent : les individus prélevés à Harnoncourt présentent seulement leur pic de RGS en D5, alors que les valeurs sur la Vesdre à Vaux-Sous-Chèvremont et sur la Rulle à Habay-La-Vieille n'évolue pas significativement, excepté pour la Rulle qui présente des faibles valeurs en D2.

2.2) Analyse des coupes histologiques

2.2.1) Les mâles

L'analyse histologique des testicules a été réalisée de manière qualitative. La première étape de cette description a consisté en une évaluation de la maturité des individus grâce à la détermination des cellules germinales les plus avancées dans le processus de spermatogenèse. Les résultats de cette description sont représentés dans le tableau ci-dessous :

	Date 1 (fin Novembre)	Date 2 (début Mars)	Date 3 (fin Mars-début Avril)	Date 4 (fin Avril)	Date 5 (fin Mai)
Ton (Lamorteau)	SgB	Spz	Spz	Spz	Spz
Ton (Harnoncourt)	SgB, Scyt (Zygotène)	/	Spz	/	Spz
Vesdre (Vaux-Sous- Chèvremont)	SgB, Scyt (Zygotène)	/	Spd	Spz	/
Rulle (Habay-La- Vieille)	SgB	SgB	Scyt (Zygotène)	Spz	Spz

SgB : spermatogonie B ; Spz : spermatozoïdes ; Spd: spermatides; Scyt: spermatocytes

On peut remarquer que la spermiogenèse débute à des moments différents selon les stations échantillonnées. Ainsi, à Lamorteau, on observe l'apparition de spermatozoïdes dès le début du mois de mars alors que ceux-ci n'apparaissent que fin mars à Harnoncourt et fin avril pour les sites de Vaux-Sous-Chèvremont et à Habay-La-Vieille.

Des structures ovocytaires au sein des testicules ont également été observées. Globalement, deux types d'intersexualité ont été observés : le premier consiste en l'apparition de plusieurs ovocytes protoplasmiques au sein de la structure testiculaire (fig.40) et le second, beaucoup plus rare, correspond à l'apparition d'un ou deux ovocytes à des stades plus avancés (stade 3 : vitellogenèse endogène avancée) (fig.41). Il semble que les poissons provenant de la Rulle soient les moins affectés par ce phénomène : l'intersexualité ne touche que 5.5% des individus analysés, toutes dates confondues ; alors que les autres sites présentent, chacun, un nombre d'individus touchés de 10%. Par ailleurs, aucune différence au niveau de la spermatogenèse n'a été observée chez ces individus, les testicules présentent les mêmes stades de maturation que les individus du même site, prélevés à la même période.

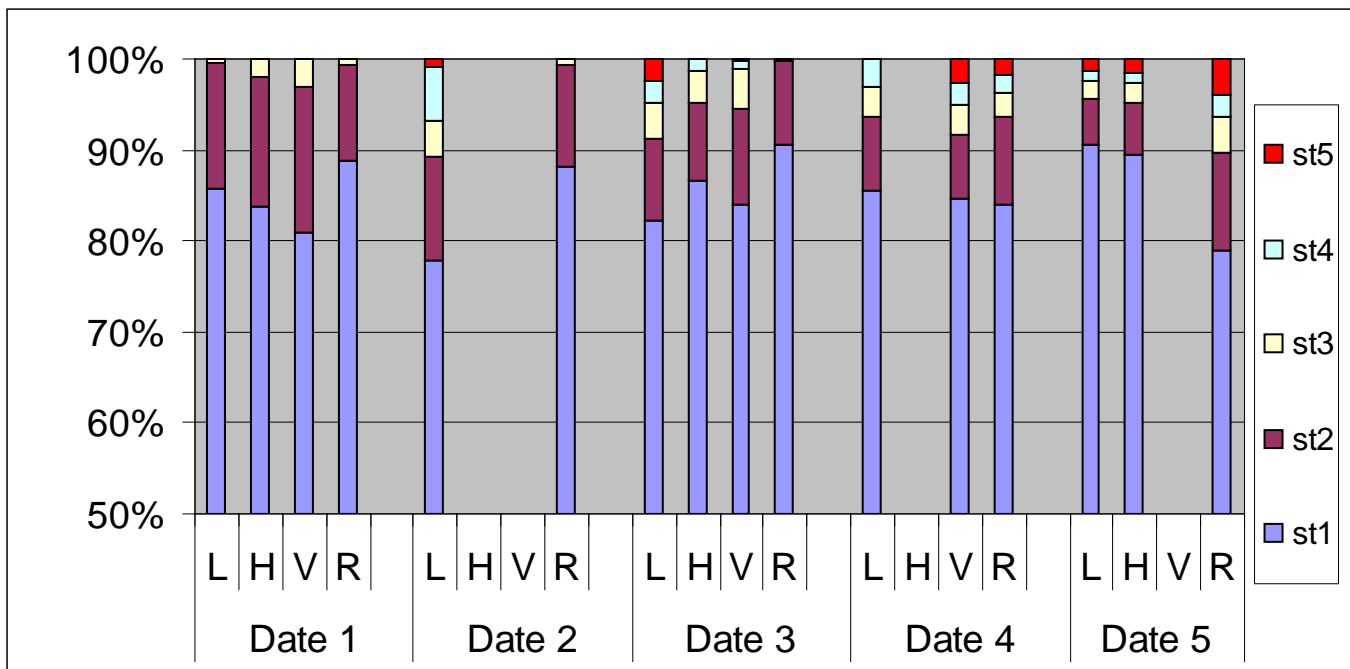


Fig. 44 : Comparaison entre station de la proportion d'ovocytes aux différents stades de maturités, pour chaque date de prélèvement.

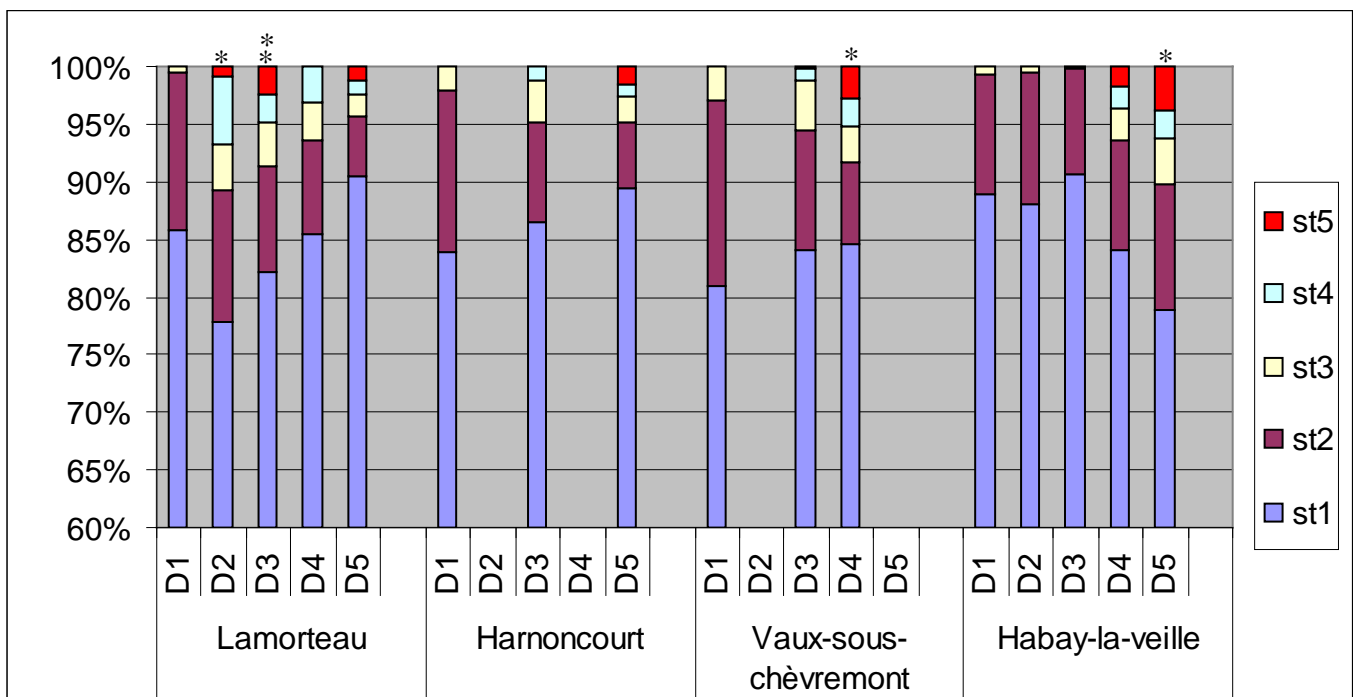


Fig. 45 : Evolution de la proportion d'ovocytes aux différents stades de maturités, pour chaque station étudiée. *, présence d'un individu en maturation finale (stade6) **, présence de plus d'un individu en maturation finale.

2.2.2) Les femelles

a) Diamètres des ovocytes les plus avancés

La taille des ovocytes, pour l'ensemble des femelles capturées peut varier de 310 μm avant la période de reproduction (fin novembre) à Lamorteau à 892 μm en pleine reproduction, fin mai à Habay-La-Vieille. Notons que les plus petites tailles des ovocytes les plus avancés correspondent à celles des ovocytes en prévitellogenèse précoce (stade 2). En effet, les ovocytes protoplasmiques dont le diamètre moyen avoisine les 100 μm sont toujours accompagnés du stade 2 lors des périodes, excepté en post ponte, non observé ici. Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif de la date d'échantillonnage, du site mais également de l'interaction du site et de la date sur le diamètre des ovocytes les plus avancés ($p < 0,001$).

- Un test post hoc a permis de représenter les différences existantes entre sites à chaque date (fig.42). Comme l'analyse en composante principale l'avait suggéré, une certaine corrélation existe entre la variable ALP et le diamètre des ovocytes ($r^2=0.59$). Il est donc normal que les profils des différences entre sites se ressemblent (cfr : fig.53). Néanmoins, quelques différences sont à noter. En effet, dans le cas du diamètre des ovocytes, on remarque des différences en fin novembre entre Lamorteau et la Vaux-Sous-Chèvremont où les valeurs sont significativement supérieures. De plus, en D5, les diamètres des ovocytes des femelles présentes sur la Rulle sont supérieurs aux autres stations et peuvent atteindre des valeurs de $\sim 890 \mu\text{m}$.

- Les profils d'évolution des diamètres, par site (fig.43) sont également forts semblables à ceux de l'ALP (cfr : fig.54). Néanmoins, à Habay-La-Vieille, dans le cas des diamètres des ovocytes, les valeurs restent stables jusqu'en fin mars puis augmentent pour atteindre un pic en fin mai (D5). Notons que la valeur à Lamorteau en fin avril (D4) n'est représentée que par un individu et donc peu interprétable.

b) Proportion des ovocytes à différents stades de maturation

La différence entre la maturité des femelles provenant des différents sites est bien représentée à la fig.44. On peut remarquer que pour la date 1, les 4 stations étudiées possèdent les mêmes types d'ovocytes et que les ovocytes les plus avancés sont du type 3, plus présents à Harnoncourt et la Vesdre. La présence du type 5 qui correspond à l'état de maturation final de l'ovocyte (présence de lipoprotéine dans l'entièreté du cytoplasme, apparition du mycropyle et migration du noyau en périphérie) apparaît à différent moment selon les stations : D2, pour les individus à Lamorteau ; D3, pour la Vesdre et D4 pour les femelles prélevées à Harnoncourt et sur la Rulle.

La figure 45 permet de se rendre compte de l'évolution de l'état de maturation des ovaires des femelles collectées au sein d'un même site. Les principales différences observées entre les stations se font au niveau de l'évolution des proportions des ovocytes aux stades inférieurs (1 à 3). On peut, ainsi observer 2 types de recrutements des ovocytes au stade supérieur (5). Le premier correspond aux sites de Harnoncourt et Vaux-Sous-Chèvremont, le nombre d'ovocytes protoplasmiques augmente avec le temps, plus particulièrement à Harnoncourt. Cette augmentation a pour conséquence un recrutement des ovocytes du stade 5 au détriment des ovocytes des stades inférieurs (2, 3 et 4). En effet, ceux-ci voient leur proportion diminuer au cours du temps, spécialement pour le stade 2.

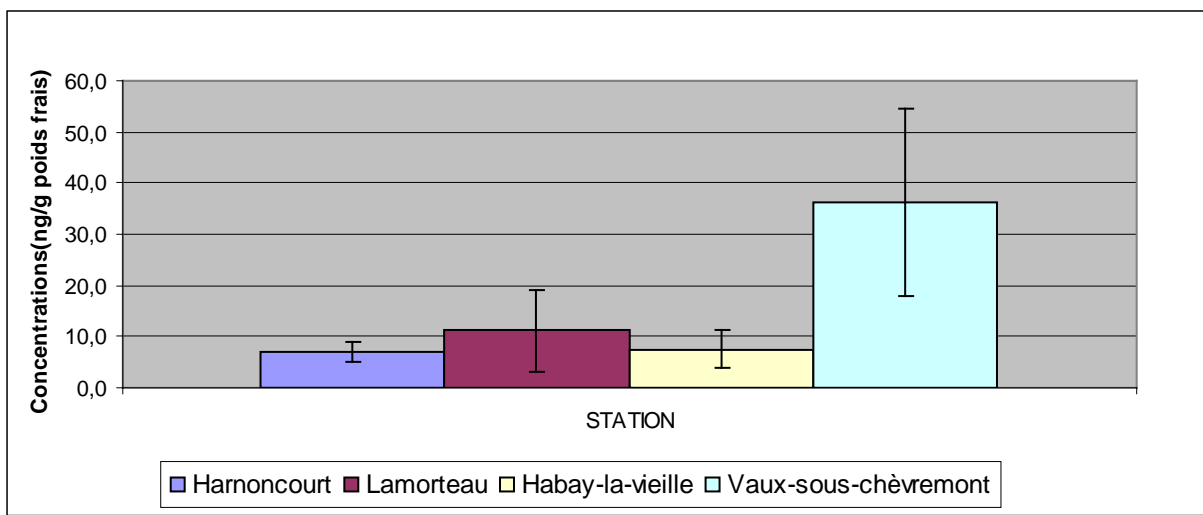


Fig.46 : Concentration globale dans les muscles (poids frais) de goujons prélevés dans les différentes stations (données fournies par l'université de Liège (LEAE), Woestyn, T.)

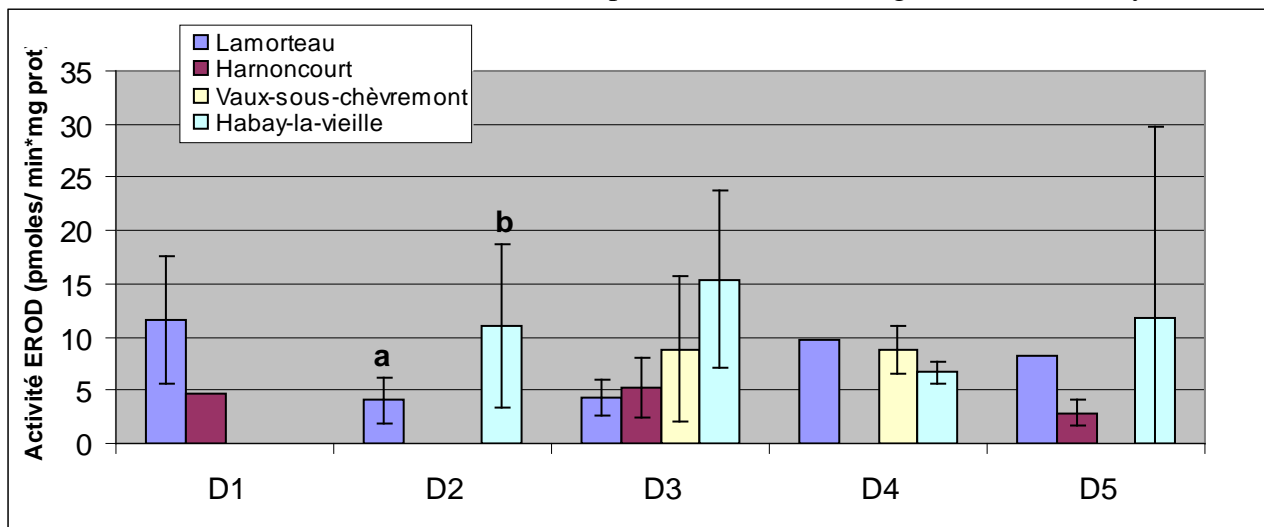


Fig.47 : Comparaison de l'activité EROD mesurée chez les femelles capturées sur les différents sites échantillonnés. Au sein de chaque date, les lettres différentes indiquent une différence significative entre les sites ($p < 0.05$). (Données fournies par l'Ulg)

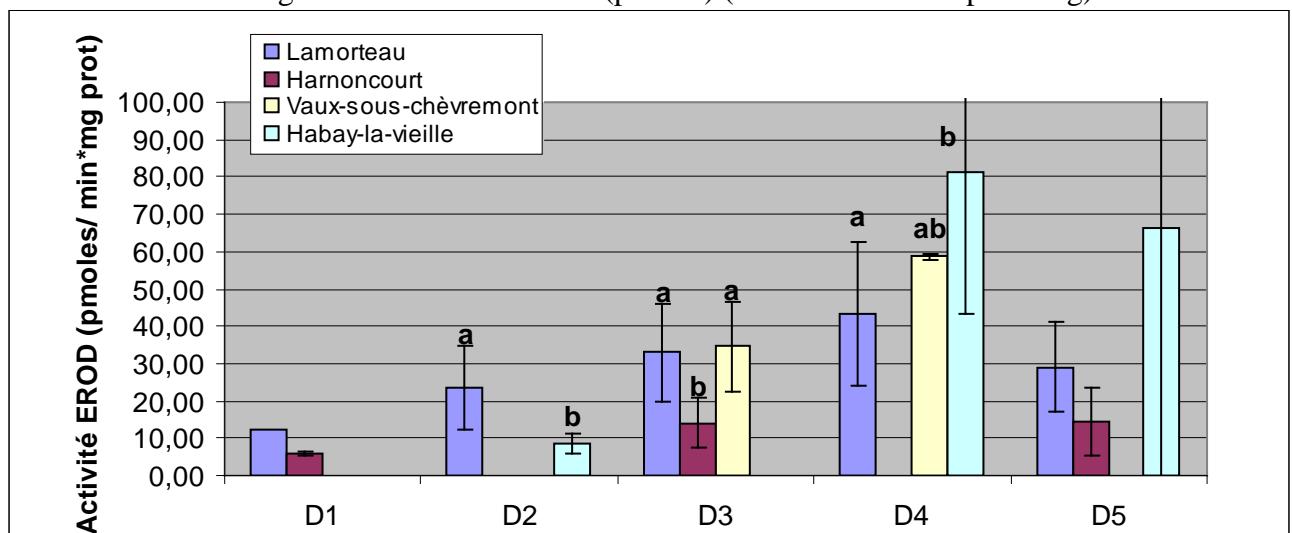


Fig.48 : Comparaison de l'activité EROD mesurée chez les mâles capturés sur les différents sites échantillonnés. Au sein de chaque date, les lettres différentes indiquent une différence significative entre les sites ($p < 0.05$). (Données fournies par l'Ulg)

Le second type de recrutement des ovocytes du stade supérieur s'observe bien sur la station d'Habay-La-Vieille et Lamorteau, pour laquelle on peut remarquer une diminution des ovocytes protoplasmiques au cours du temps. Notons, cependant, qu'à Lamorteau la diminution du nombre d'ovocytes protoplasmiques se fait brusquement de fin novembre jusqu'au début mars. De plus, la proportion des ovocytes de stade 2 ne varie pratiquement pas, ce qui signifie que l'apparition des ovocytes les plus mûres se réalise grâce à un recrutement continu des ovocytes protoplasmiques.

3) Indicateurs biochimiques et endocriniens de l'exposition.

3.1) Concentration en PCB dans les muscles de goujons

La figure 46 illustre la concentration globale en PCB mesurée dans les muscles de goujons capturés sur les différents sites. Ces valeurs sont fournies par l'Université de Liège, Laboratoire d'Ecologie Aquatique et Ecotoxicologique (LEAE). Ces valeurs ne sont données qu'à titre indicatif, étant donné que d'autres polluants présents dans les différentes stations peuvent influencer les indicateurs biologiques étudiés.

Globalement, seules les concentrations en PCBs obtenues dans les muscles de goujons prélevés sur la Vesdre, à Vaux-Sous-Chèvremont s'isolent des autres stations avec des valeurs atteignant 36,2 ng/g de poids frais. Néanmoins ces valeurs restent faibles si on sait que, pour cette station, les concentrations globales en PCBs sont de l'ordre de 200 ng/g de poids frais dans les muscles de chevine (Mayon, 2003). Les valeurs obtenues pour les autres sites oscillent entre 7 et 12 ng/g de poids frais.

3.2) Activité EROD

3.2.1) Femelles

La figure 47 représente les différences d'activités EROD mesurées chez les goujons femelles prélevées dans les différentes stations. Globalement les valeurs observées sont comprises entre 5 pmoles/min/mg de protéines (pour l'ensemble des valeurs à Harnoncourt) et 15 pmoles/min/mg de protéines chez les poissons prélevés à Habay-La-Vieille, lors de la campagne de pêche effectuée en fin mars (D3). Les analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre les différentes stations pour l'ensemble des dates de prélèvement excepté au début mars (D2). A cette date, les valeurs d'activité EROD des femelles prélevées à Habay-La-Vieille (10.9 pmoles/min/mg de protéine) sont supérieures à celles des femelles présentes à Lamorteau (4.0 pmoles/min/mg de protéines).

3.2.2) Mâles

La littérature mentionne souvent l'aspect sexe-dépendant des niveaux d'activité EROD observés, les individus femelles possédant des activités EROD plus faibles que les mâles, ce qui se vérifie à la figure 48. En effet, alors que les activités EROD des femelles ne dépassent pas 15 pmoles/min/mg de protéines, les valeurs observées chez les mâles varient entre 5.9 pmoles/min/mg de protéines à Harnoncourt en fin novembre (D1) et 81.2 pmoles/min/mg de protéines à Habay-La-Vieille fin avril. Chez les mâles, aucune différence significative d'activité EROD n'est observée entre les sites en D1 et en fin mai (D5). Alors que les valeurs présentent à Habay-La-Vieille au début mars (8.6 pmoles/min/mg de protéines) sont significativement différentes par rapport à Lamorteau (23.7 pmoles/min/mg de protéines), les tendances s'inversent en fin avril (D4) où les valeurs présentent à Habay-La-Vieille atteignent

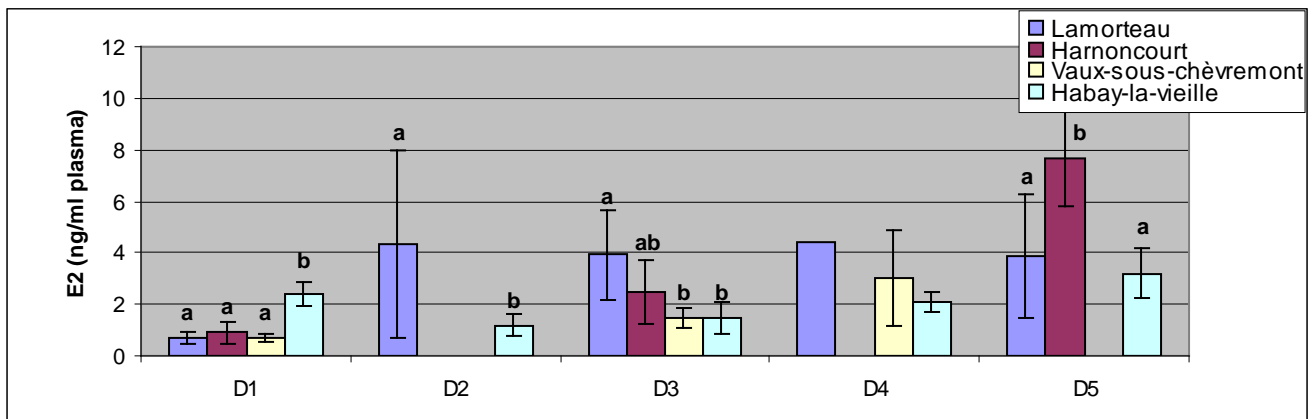


Fig.49 : Comparaison des concentrations plasmatiques en E2 chez les femelles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

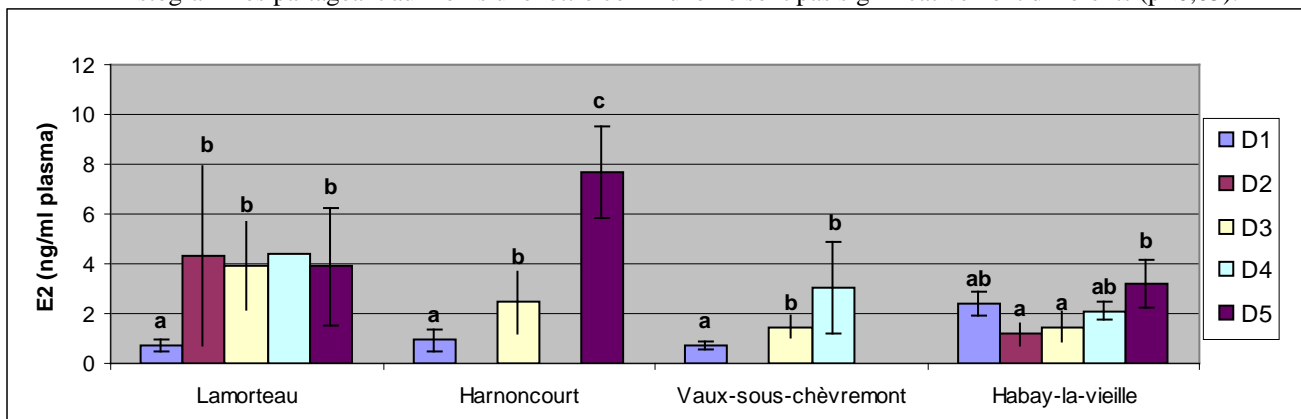


Fig.50 : Comparaison des concentrations plasmatiques en E2 chez les femelles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

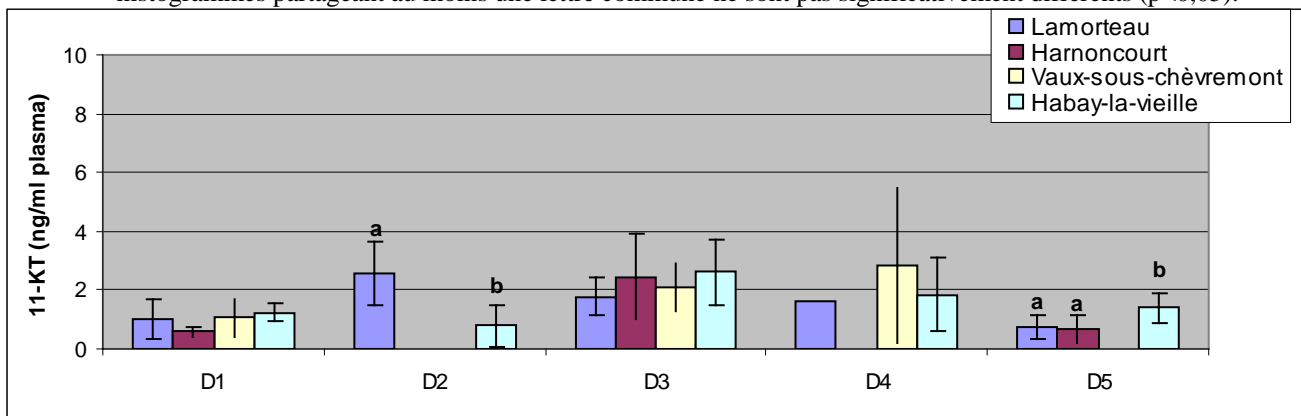


Fig.51 : Comparaison des concentrations plasmatiques en 11-KT chez les femelles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

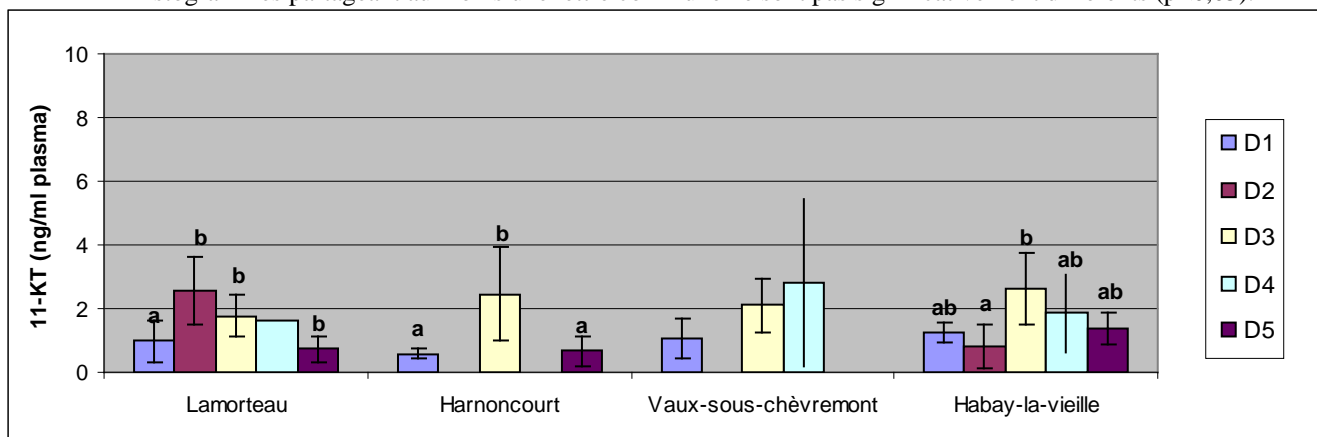


Fig.52 : Comparaison des concentrations plasmatiques en 11-KT chez les femelles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

81.2 pmoles/min/mg de protéines (Lamorteau présentant des valeurs de 43.3 pmoles/min/mg de protéines, à cette date). Notons enfin que les activités EROD des mâles capturés à Harnoncourt présentent des valeurs relativement faibles, ne dépassant pas les 15 pmoles/min/mg de protéines.

3.3) Concentrations plasmatiques en stéroïdes sexuels et ALP

En générale, les concentrations en stéroïdes qui sont présentés dans cette étude correspondent aux ordres de grandeur des valeurs que l'on retrouve chez les cyprinidés, de l'ordre de 10ng/ml. Rinchar et al. (1998) précise que les teneurs les plus élevées se rencontrent chez les salmonidés (de l'ordre de 100ng/ml) et les plus faibles chez les perciformes (1ng/ml).

3.3.1) Femelles

a) 17- β oestradiol

L'analyse des concentrations en E2 chez les femelles a montré que les valeurs atteintes (entre 4 et 8 ng/ml) pouvaient être nettement supérieures à celle des mâles dont les valeurs ne dépassent pas 2 ng/ml. Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif de la date d'échantillonnage ($p < 0,001$), du site ($p < 0,01$) mais également de l'interaction du site et de la date sur les concentrations en E2 ($p < 0,001$).

-Un test post hoc de Scheffé a permis de distinguer les différences entre sites, pour chaque date (fig.49). Fin novembre, les valeurs entre sites sont relativement faibles et oscillent entre 1 ng/ml plasma, excepté pour la Habay-La-Vieille où elles dépassent les 2 ng/ml plasma. A partir du début du mois de mars (D2), les tendances changent : la concentration en E2 à Lamorteau est généralement plus élevée (4 ng/ml plasma) que le reste des stations et ce, jusqu'en fin avril ou les valeurs se stabilisent entre sites. En fin mai (D5), la valeur à Harnoncourt est significativement plus élevée et atteint ~8 ng /ml plasma.

-L'évolution de la concentration en E2 pour chaque site est représentée en figure 50. Celle-ci varie fortement entre les stations. En effet, à Lamorteau, la concentration en E2 atteint son pic dès la date 2 et reste stable jusqu'en D5 alors qu'en générale, pour le reste des stations, la concentration en E2 augmente progressivement.

b) 11-kétotestostérone

A l'inverse des fortes concentrations en E2, les femelles se distinguent des mâles par des concentrations en 11-KT beaucoup plus faibles (ne dépassant pas 4 ng/ml), les mâles présentant des pics pouvant atteindre des valeurs comprises entre 60 et 80 ng/ml. Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif de la date d'échantillonnage ($p < 0,001$) mais également de l'interaction du site et de la date sur les concentrations en 11-KT ($p < 0,01$).

-Un test post hoc a permis de distinguer les différences entre sites, pour chaque date (fig.51). Globalement, pour chaque date, il existe peu de différences entre site, exception faite au début mars (D2) où la concentration à Lamorteau est significativement supérieure à la Habay-La-Vieille et en fin mai (D5) où, cette fois, les valeurs de 11-KT présentes à

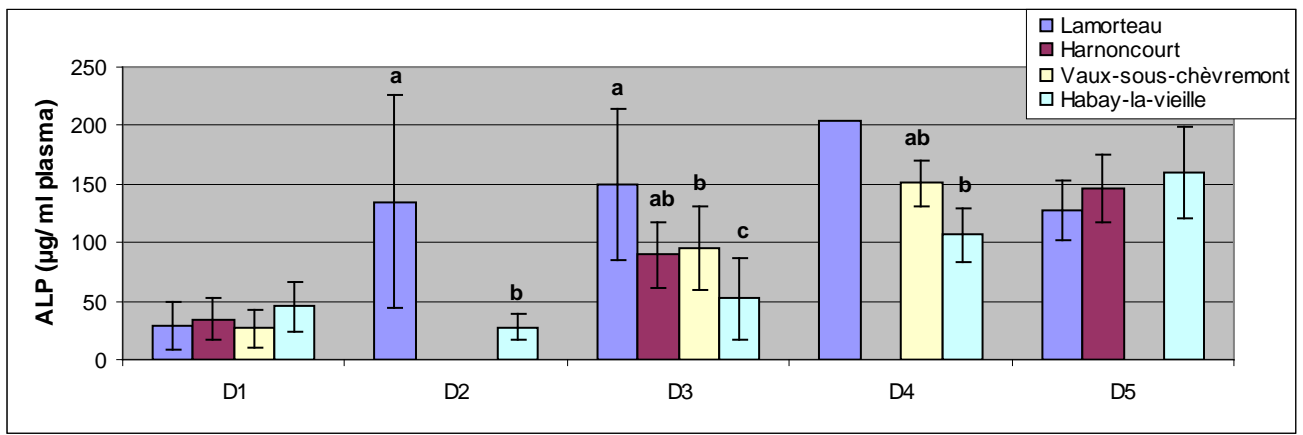


Fig.53 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ALP chez les femelles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

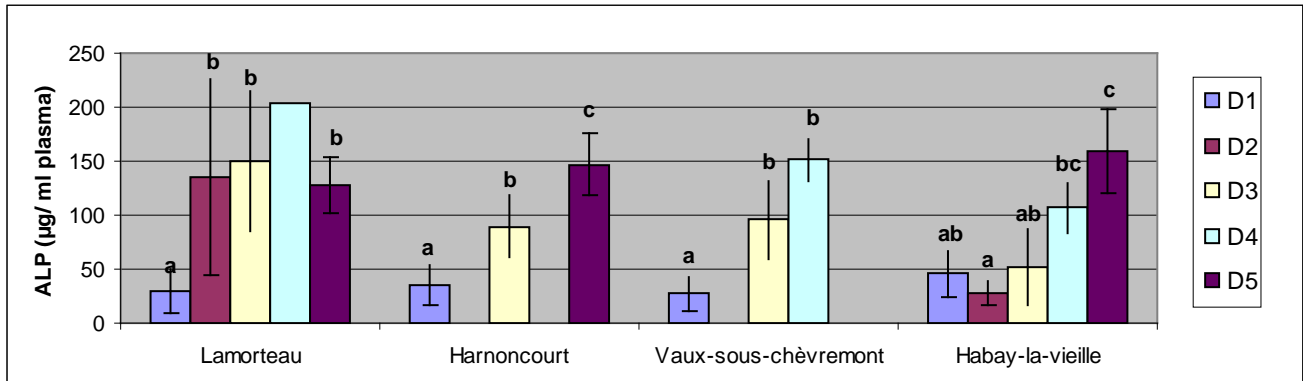


Fig.54 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ALP chez les femelles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

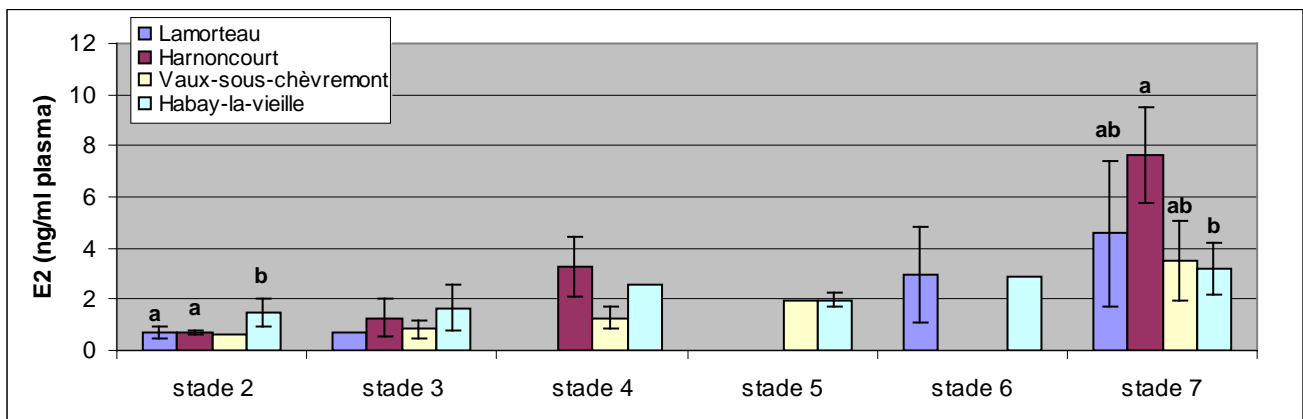


Fig. 55 : Concentration en E2 chez les femelles des différents sites, en fonction du stade de maturité ovarien. Au sein de chaque stade, les histogrammes présentant des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$).

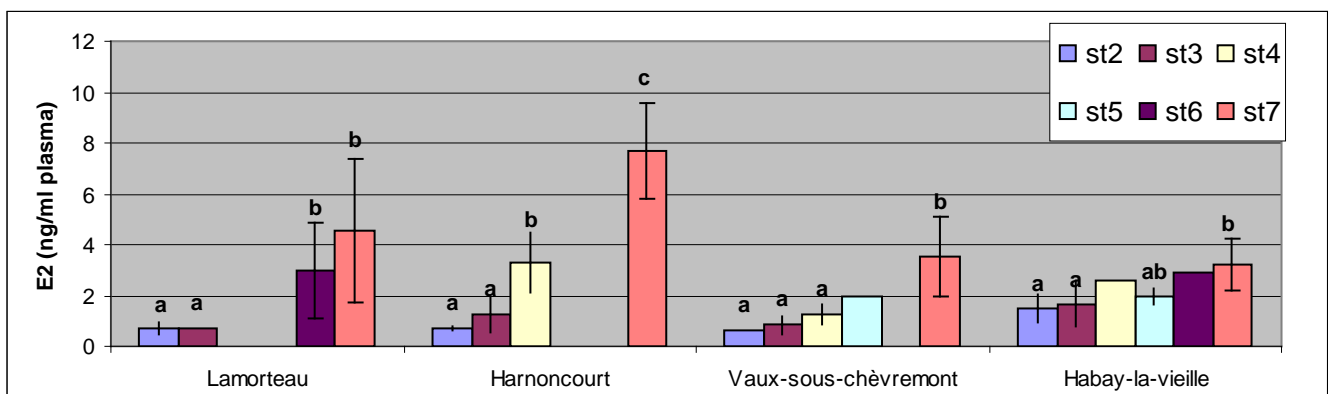


Fig.56 : Evolution de la concentration en E2 chez les femelles d'une même station, en fonction du stade de maturité ovarien. Au sein de chaque site, les histogrammes présentant des lettres différentes sont significativement différents ($p < 0,05$).

Habay-La-Vieille sont supérieures au reste des autres stations. L'ensemble des valeurs restent relativement faibles et oscillent entre ~1 ng/ ml plasma pour les stations en fin novembre jusqu'à ~2,2 ng/ml plasma en fin mars (D3).

-Un test post hoc a également été réalisé afin de mettre en évidence l'évolution dans le temps des concentrations en 11-KT au sein d'un même site (fig.52). Comme pour l'E2, les valeurs à Lamorteau augmentent à partir de D2 et se stabilisent jusqu'en D5. Alors que les niveaux en 11-KT ne varient pas à Vaux-Sous-Chèvremont, un pic de concentration est visible à Habay-La-Vieille et à Harnoncourt en D3.

c) Concentration en ALP

Parallèlement aux forte valeurs d'E2, les femelles présentent des concentrations élevées en ALP, pouvant atteindre des pics compris entre 150 et 200 µg/ml plasma, les concentrations minimales observées se situant aux alentours de 35 µg/ml de plasma. Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif pour les paramètres de la date, du site et de la l'interaction date - site ($p < 0,001$).

-Un test post hoc a permis de distinguer les différences entre sites, pour chaque date (fig.53). Les profils de concentration en ALP suivent globalement ceux de l'E2. Cependant aucune différence significative n'a été rencontrée entre les stations en D1, avant la période de reproduction où les valeurs tournent autour de 35 µg/ml plasma. A partir du début mars (D2), la concentration en ALP à Lamorteau est généralement plus élevée que le reste des stations, surtout à Habay-La-Vieille, et ce, jusqu'en fin mai (D5) où les valeurs se stabilisent entre les stations (~145 µg/ ml plasma). Les stations de Vaux-Sous-Chèvremont et Harnoncourt montrent, quant à elles, des valeurs intermédiaires de D2 à D4.

-Un test post hoc a également permis de mettre en évidence une évolution différente de la concentration en ALP entre sites (fig.54). La concentration en ALP à Lamorteau augmente fortement jusqu'en D2, pour atteindre un pic de ~200 µg/ ml plasma (valeur représentée par un individu) en fin avril (D4). Pour le reste des stations, la concentration en ALP augmente progressivement de D1 jusqu'en D5 (D4, pour Vaux-Sous-Chèvremont) où elle atteignent chacune des valeurs de ~150 µg ALP/ ml plasma.

d) Evolution des sécrétions hormonales chez les femelles en fonction des stades de maturité

L'analyse histologique nous a permis d'isoler les femelles ayant le même stade de maturation ovarien. Il est devenu ainsi possible de comparer l'évolution des sécrétions en stéroïdes et de la vitellogénine chez les femelles provenant des différentes stations en faisant plus ou moins abstraction des différences au niveau de l'impact environnementale, essentiellement thermiques, rencontrées sur les stations étudiées.

Concentration en E2

En ce qui concerne les concentrations en E2, aucune différence significative entre sites n'est apparente entre les stades de maturité ovarien 3 et 6 (fig.55). Par contre, en prévitellogenèse précoce (stade 2) les femelles de la Rulle, à Habay-La-Vieille montrent une concentration supérieure aux restes des stations.

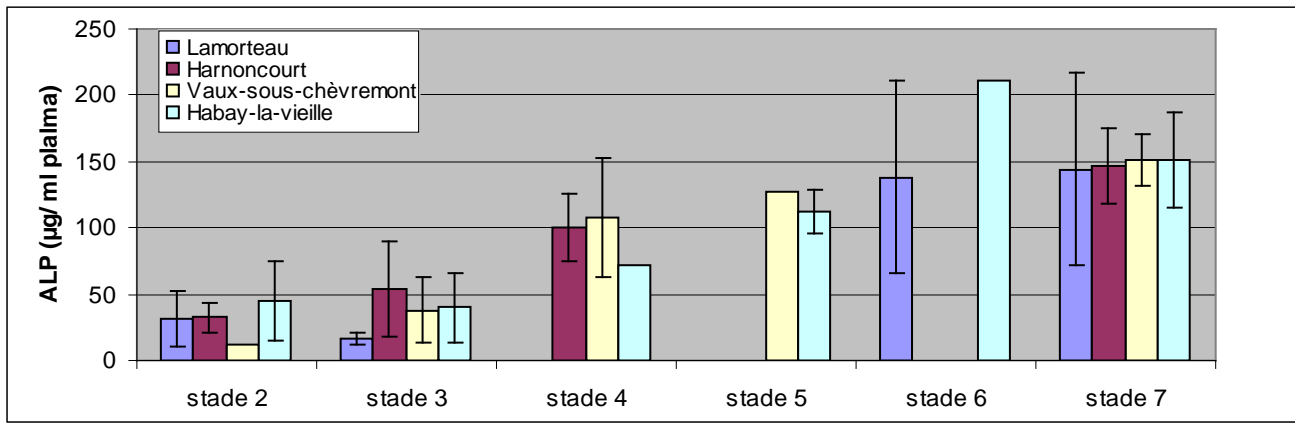


Fig. 57 : Comparaison des concentrations en ALP chez les femelles des différents sites, en fonction du stade de maturité ovarien.

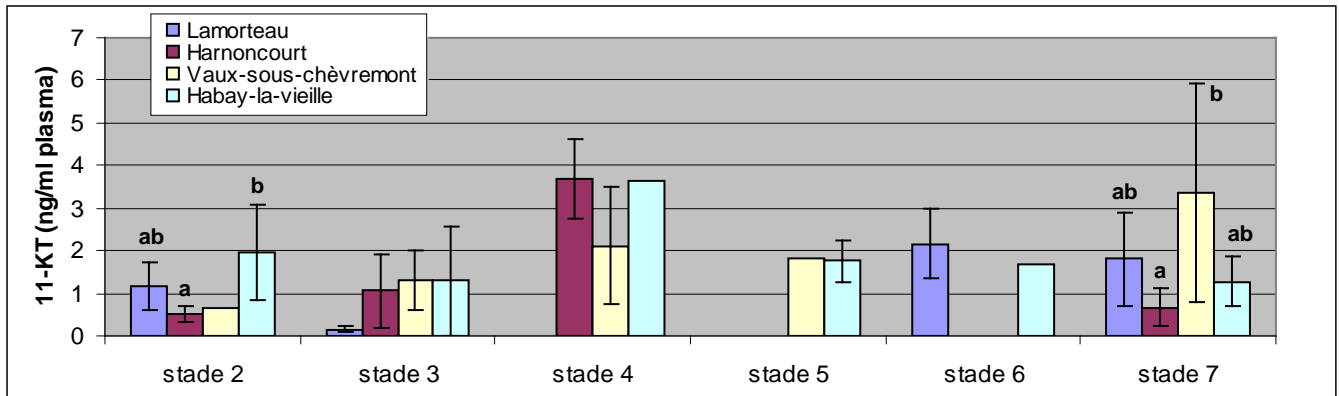


Fig. 58 : Comparaison des concentrations en 11-KT chez les femelles des différents sites, en fonction du stade de maturité ovarien.

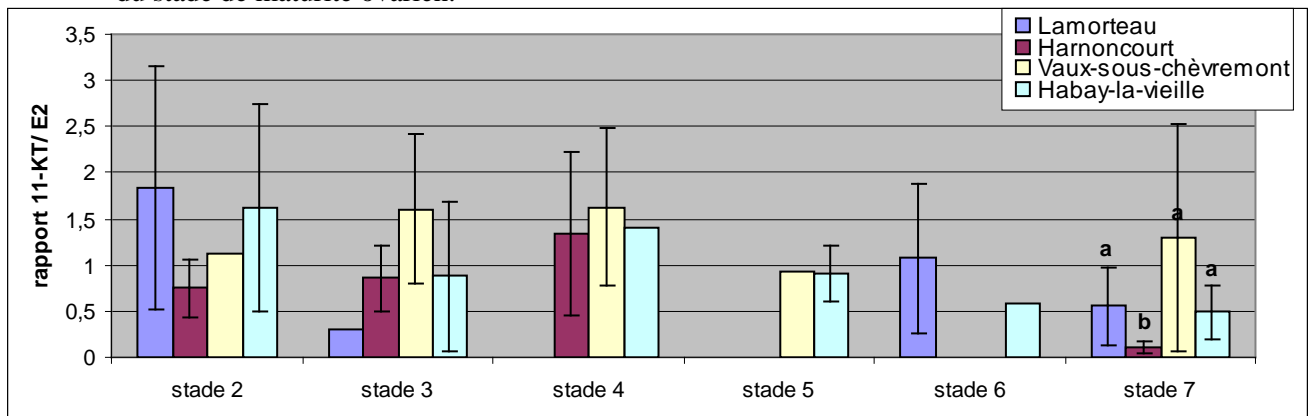


Fig.59 : Comparaison du rapport 11KT/E2 chez les femelles. Au sein de chaque stade, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

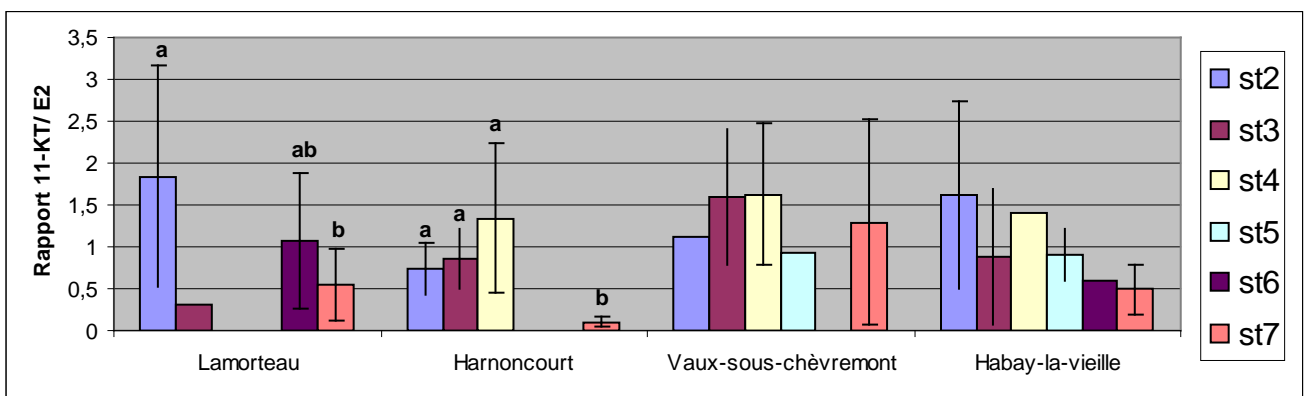


Fig.60 : Comparaison du rapport 11KT/E2 chez les femelles. Au sein de chaque station, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

En interponte, les concentrations en E2 retrouvées chez les individus prélevés à Harnoncourt (7.6 ng/ml plasma) sont significativement supérieures à celles de la Rulle. La figure 56 permet de nous représenter l'évolution des concentrations en fonction des stades ovariens pour chaque station. Dans tous les sites échantillonnés, les teneurs en E2 augmentent selon le degré de maturation de l'ovaire, ainsi, les valeurs atteintes au stade 7 (interponte) sont significativement supérieures à celles présentes au stade 2 et cela, pour tous les sites. Les stations de Vaux-Sous-Chèvremont et d' Habay-La-Vieille semblent, néanmoins, montrer une augmentation plus modérée qu'à Lamorteau et Harnoncourt, pour laquelle les valeurs atteintes au stade 3 sont déjà significativement supérieures aux stades précédant.

Concentration en ALP.

La figure 57 représente les concentrations en ALP des femelles prélevées sur chaque site, pour un même état de maturation ovarien. Les résultats des analyses statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre sites quelque soit le degré de maturation de l'ovaire. Globalement, les valeurs d'ALP, tous sites confondus, restent inférieures à 50µg/ml plasma pendant la prévitellogenèse (jusqu'au stade 3). A partir de la vitellogenèse proprement dite, les valeurs d'ALP augmentent progressivement pour atteindre ~120 µg/ml plasma au stade 5, en vitellogenèse avancée. Pendant le stade d'interponte (stade 7), les valeurs d'ALP pour l'ensemble des stations est plus ou moins égale à 150µg/ml plasma.

Concentration en 11-KT.

Comme pour l'E2, les différences entre sites n'existent que pour les stades 2 et 7 (fig.58). En effet, en prévitellogenèse précoce, les valeurs de 11-KT présentent à la Rulle (1.9 ng/ml plasma) sont significativement supérieures à celles d'Harnoncourt (0.5 ng/ml plasma), les autres stations présentant des valeurs intermédiaires. En interponte, par contre, c'est à la Vesdre qu'on observe des valeurs significativement supérieures à celles d'Harnoncourt.

Rapport 11-KT/E2.

La figure 59 illustre la comparaison du rapport 11-KT/E2 des femelles entre sites, au même stade ovarien. On peut remarquer que les valeurs de ce rapport sont nettement plus basses chez les femelles, celles-ci présentent en effet des valeurs de concentration plus faibles en 11-KT et à l'inverse des concentrations en E2 plus importantes. Globalement les valeurs les plus importantes se situe entre 1,5 et 2 et sont présentes pour les stades ovariens s'étalant de la prévitellogenèse précoce (stade 2) à la vitellogenèse précoce (stade 4), notamment à Lamorteau et Habay-La-Vieille. Dans le cas de stade de maturité plus avancés, les valeurs du rapport restent souvent inférieures à 1.

Les analyse statistiques n'ont révélé aucune différence significative entre les différentes stations pour les stades de maturité compris entre le stade 2 et la maturation finale (stade 6). Néanmoins, en interponte, les femelles présentes à Harnoncourt montrent un rapport en 11-KT/E2 significativement par rapport aux autres sites.

L'évolution de ce rapport, calculé pour chaque stade ovarien au sein d'un même site est représentée à la figure 60. Aucune différence significative n'est apparente à Vaux-Sous-Chèvremont et Habay-La-Vieille alors que les stations de Lamorteau et d'Harnoncourt présentent une nette diminution du rapport 11KT/E2 au stade d'interponte (stade 7) par rapport aux autres stades à Harnoncourt et au stade 2, à Lamorteau.

3.3.2) Mâles

a) 17- β oestradiol.

Comme il a l'été mentionné plus haut les valeurs d'E2 chez les mâles sont relativement faibles et ne présentent pas des valeurs supérieures à 2ng/ml de plasma. Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif de la date d'échantillonnage ($p < 0,001$), du site ($p < 0,001$) et également un effet significatif de l'interaction du site et de la date sur les concentrations en E2 chez les mâles ($p < 0,05$).

-Un test post hoc de Scheffe a révélé une certaine évolution parmi les différences entre sites, au cours du temps (fig.61). En effet, aucune différence significative ne s'observe entre stations au début mars (D2) et fin avril (D4), alors qu'avant la période de reproduction, les individus prélevés à Habay-La-Vieille, sur la Rulle, possèdent des concentrations supérieures (~2ng/ml plasma) aux individus des autres stations (~0.6 ng/ml plasma). On observe également des différences au niveau de Lamorteau où les valeurs en E2 sont supérieures à celles de Vaux-Sous-Chèvremont, sur la Vesdre en fin mars (D3) et à celles d'Harnoncourt en fin mai (D5).

-Des différences dans les profils de concentration sont également manifestes parmi les stations étudiées (fig.62). Les profils sont relativement semblables entre Lamorteau et Harnoncourt où les niveaux d'E2 augmentent progressivement jusqu'en D3 pour atteindre des valeurs de 1,6 et 1.2 ng/ml plasma, respectivement. Parallèlement, le profil de concentrations en E2 à la Rulle ne présente pas de différences significatives entre les 5 dates pour lesquelles les valeurs varient entre 1.3 et 2 ng/ml plasma. Les valeurs d'E2 semblent significativement supérieures sur la Vesdre en D4. Néanmoins, ce niveau de concentration n'est représenté que par 1 individu.

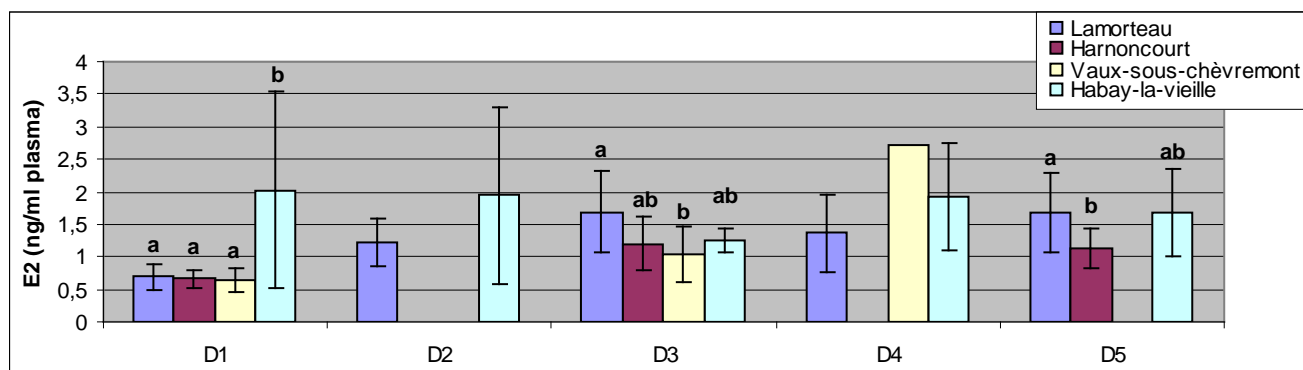
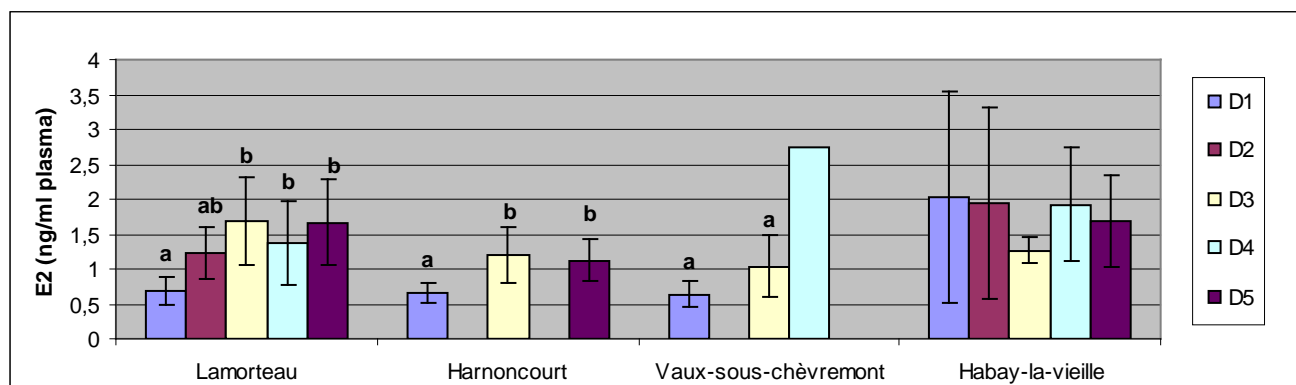


Fig.61 : Comparaison des concentrations plasmatiques en E2 chez les mâles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).



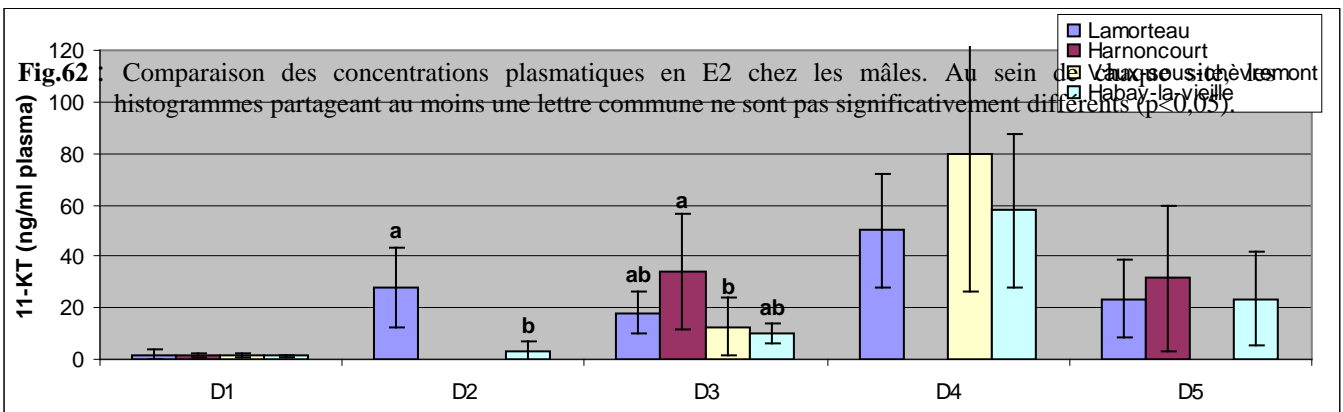


Fig.63 : Comparaison des concentrations plasmatiques en 11-KT chez les mâles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

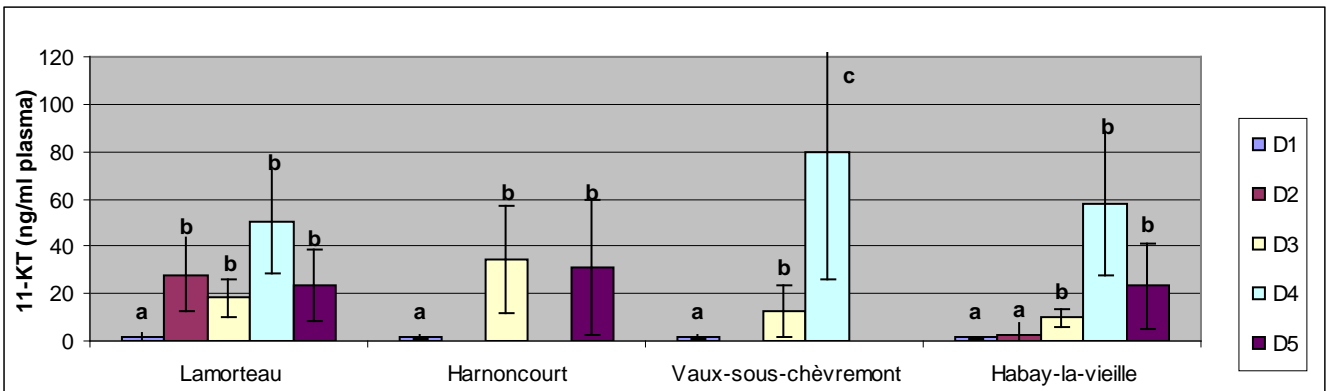


Fig.64 : Comparaison des concentrations plasmatiques en 11-KT chez les mâles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

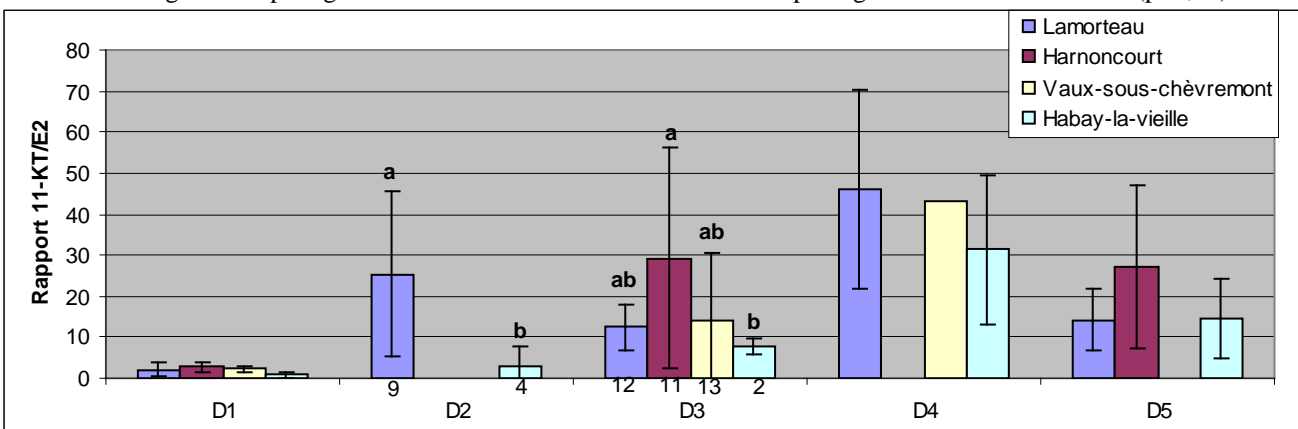


Fig.65 : Comparaison du rapport 11KT/E2 chez les mâles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

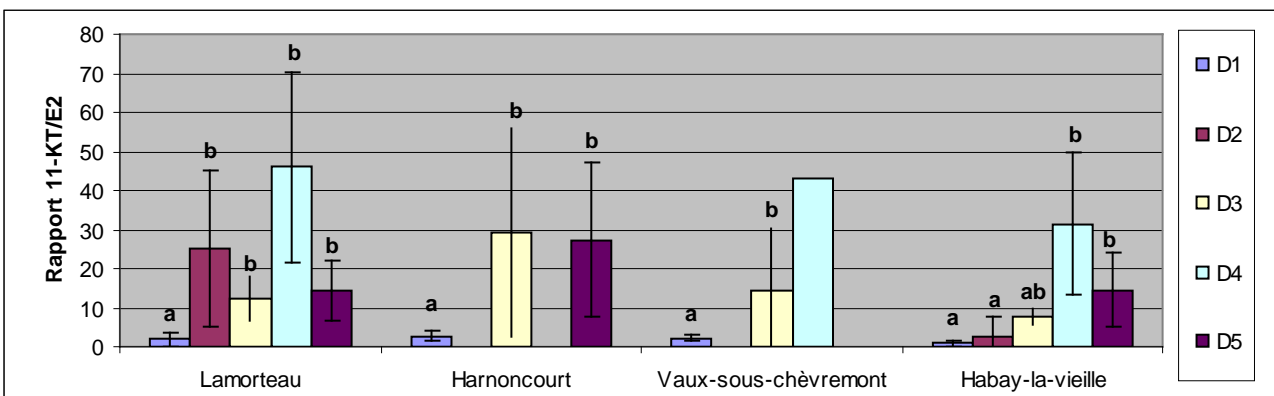


Fig.66 : Comparaison du rapport 11KT/E2 chez les mâles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

b) 11-kétotestostérone.

Notons que les niveaux de concentration pour cette hormone montre une amplitude importante, de ~ 1.5 ng/ml plasma (pour l'ensemble des sites échantillonnés en fin novembre) à ~ 80 ng/ml plasma pour des valeurs collectées à Vaux-Sous-Chèvremont en D4 (en fin avril). Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif de la date d'échantillonnage ($p < 0,001$) mais également de l'interaction du site et de la date sur les concentrations en 11KT chez les mâles ($p < 0,001$).

- Le fait que le MGL ne révèle pas un effet significatif du site se vérifie bien après la visualisation des profils de concentrations en 11-KT à chaque date (fig.63). En effet, aucune différence significative au niveau des concentrations en 11-KT n'est apparente entre les différentes stations, exception faite au début mars (D2) où les valeurs obtenues à Lamorteau (~ 28 ng/ml plasma) sont significativement supérieures à celles de la Rulle, à Habay-La-Vieille (~ 3 ng/ml plasma) et en fin mars (D3) où les concentrations des individus prélevés à Harnoncourt sont supérieures à celles des poissons capturés à Vaux-Sous-Chèvremont, sur la Vesdre.
- L'évolution des concentrations en 11-KT évolue également différemment selon la station étudiée (fig.64). Les valeurs de 11-KT voient leurs niveaux augmenter dès D2 à Lamorteau et se stabiliser jusqu'en fin mai (D5), alors que les concentrations en cette hormone augmentent seulement sur la Rulle à partir de D3 et se stabilisent jusqu'en D5. La station d'Harnoncourt adopte le même profil bien qu'aucun échantillon n'ait été collecté au début mars. Les valeurs de 11-KT des poissons prélevés sur la Vesdre augmentent, par contre, significativement tout au long de la période de reproduction (de D1 à D5).

c) Rapport 11-KT/ E2

La figure 65 représente les profils de différences au niveau du rapport 11-KT/E2 chez les mâles à chaque date de prélèvement. On peut remarquer que ces profils coïncident avec ceux qui représentent les différences de concentrations en 11-KT entre les mâles provenant de stations différentes (fig.63). En effet, les valeurs de concentrations en 11-KT, qui peuvent présenter des pics jusqu'à 80 ng/ml plasma sont nettement supérieures à celle de l'oestradiol qui elles, ne dépassent pas les 2.5 ng/ml plasma. Le rapport 11-KT/E2 est dans ce cas peu influencé par les valeurs de E2. Bien que les valeurs en 11-kétostérone pour chaque station soient faibles (~ 1.5 ng/ml plasma) lors de la campagne de pêche effectuée en fin novembre (D1), on n'observe aucune différence significative du rapport 11-KT/E2 entre sites. La figure 66 illustre l'évolution du rapport 11-KT/E2 au sein de chaque station, ces profils suivent naturellement ceux de l'évolution de la concentration en 11-KT pour chaque site (fig.64), pour les mêmes raisons qui viennent d'être expliquées. Notons que tout comme la concentration en 11-KT, le rapport en cette hormone sur celle de l'E2 montre une amplitude importante variant pour Lamorteau de ~ 2 en fin novembre à ~ 46 en période de reproduction (D4).

d) Concentrations plasmatiques en ALP

Les valeurs d'ALP observées chez les mâles sont représentées à la figure 67. Ces valeurs varient de 10,9 $\mu\text{g/ml}$ à $\sim 60 \mu\text{g/ml}$ de plasma. Cependant elles restent plus faibles que chez les femelles dont les concentrations atteignent des pics avoisinant 150 à 200 $\mu\text{g/ml}$ de plasma. Les résultats du modèle linéaire généralisé ont révélé un effet hautement significatif de la date d'échantillonnage ($p < 0,001$) mais également de l'interaction du site et de la date sur les concentrations en ALP chez les mâles ($p < 0,01$).

- Bien que les résultats du modèle linéaire généralisé ne montre pas d'effet du site sur la concentration en ALP chez les mâles, un test post hoc de Scheffe a révélé des différences significatives entre les sites avant la période de reproduction, fin novembre (fig.67). En effet, on trouve des valeurs en ALP de 37 et 53 $\mu\text{g/ml}$ plasma à Harnoncourt et Habay-La-Vieille, respectivement ; alors que les concentrations en ALP ne dépassent pas les 20 $\mu\text{g/ml}$ plasma sur les autres sites à la même date. Aucune autre différence significative n'a été remarquée entre les différentes stations, pour chaque date.
- La figure 68 représente les différents profils d'évolution des concentrations en ALP au sein d'un même site. Deux types de profils se présentent parmi les 4 stations étudiées. Le premier correspond aux sites d'Harnoncourt et d'Habay-La-Vieille, pour lesquels aucune différence significative entre les valeurs d'ALP n'a été observée au cours des campagnes de pêches effectuées. Le second correspond aux stations de Lamorteau et la Vaux-Sous-Chèvremont, pour lesquelles on observe un pic d'ALP en fin mars.

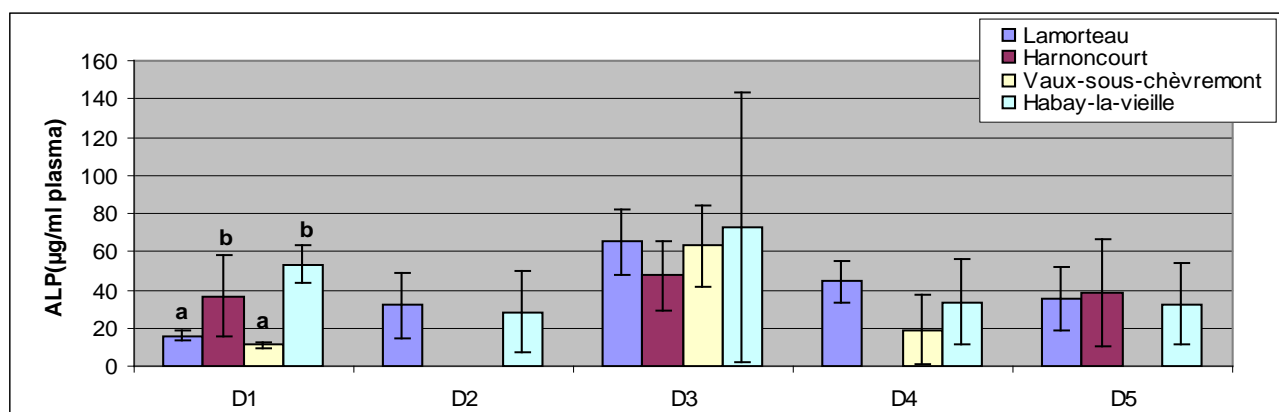


Fig.67 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ALP chez les mâles. Au sein de chaque date, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

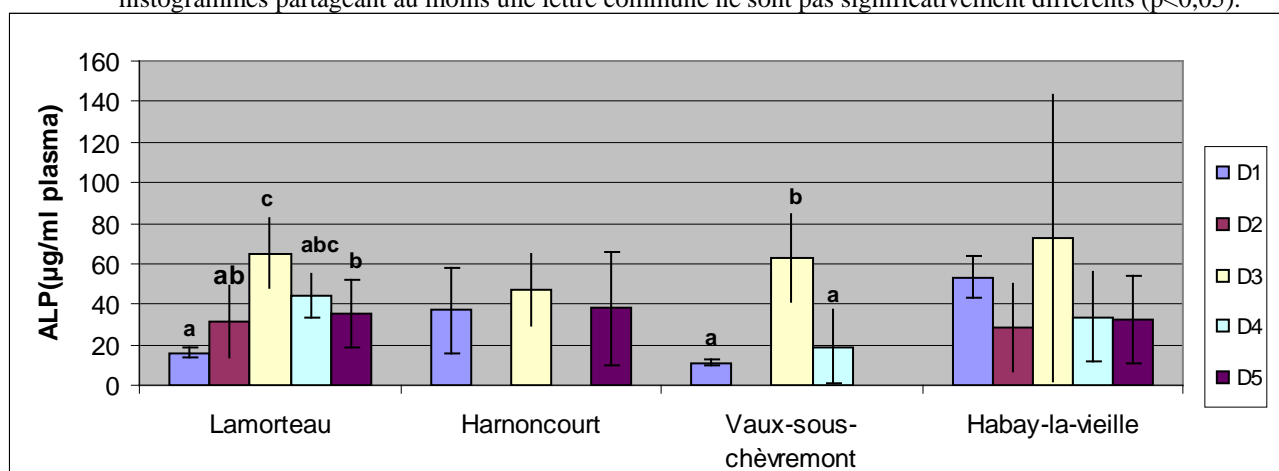


Fig.68 : Comparaison des concentrations plasmatiques en ALP chez les mâles. Au sein de chaque site, les histogrammes partageant au moins une lettre commune ne sont pas significativement différents ($p < 0,05$).

Discussion des résultats

1) Présentation des résultats

Il est clair que les résultats obtenus au cours de ce type d'étude et la fiabilité des discussions autour de ceux-ci sont largement conditionnés par l'échantillonnage réalisé. Ainsi, nous restons conscients que les relations que nous allons mentionnées entre les différentes variables étudiées doivent rester des hypothèses émises avec réserves. En effet, nous ne possédons que des données pour un nombre restreint de paramètres.

Signalons enfin qu'en étudiant les paramètres physiologiques du goujon en période de reproduction, nous nous exposons au phénomène qu'Atrill et Deplege (1997) appelle : le conflit fidélité-mobilité. Le paramètre de fidélité correspond à la présence du poisson étudié dans une zone relativement limitée. Le goujon répond à ce dernier critère, cependant, comme la plupart des poissons, on observe une certaine migration chez cette espèce vers les zones de fraie, en période de reproduction. Ce phénomène pourrait expliquer la faible présence de ce téléostéen rencontré à certaines dates, notamment sur la Vesdre à Vaux-Sous-Chèvremont et le Ton à Harnoncourt. De plus ces migrations peuvent conduire au passage de sites sains vers des zones plus altérées, notamment en aval des rejets d'égouts et vice-versa. On a fréquemment pu observer sur le terrain la présence du goujon à cet endroit.

2) Concentration en PCBs dans les muscles et activité EROD des goujons

Les concentrations les plus élevées en PCBs ont été mesurées dans les muscles de goujons prélevés sur la Vesdre, à Vaux-Sous-Chèvremont, ce qui coïncide avec les résultats de Thomé et al. (2003) qui ont retrouvé des concentrations importantes en PCBs dans les muscles des chevaines (~200 ng/g de poids frais) pour ce même site. Néanmoins, les valeurs obtenues chez les goujons sont beaucoup moins importantes (36,2 ng/g poids frais). Par ailleurs, la valeur de la concentration totale des 7 traceurs (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180) présents dans les muscles des goujons capturés sur ce site (23,6 ng/g de poids frais) est nettement inférieure à la norme belge qui fixe les teneurs maximales en PCBs dans les poissons à 75 ng/g de poids frais, arrêté royal du 6 mars 2002 (MB 16/04/2002). Les concentrations plus faibles en PCBs chez le goujon s'expliquent essentiellement par sa durée de vie relativement courte (4 à 5 ans maximum), cette caractéristique lui accorde un temps d'exposition plus court et par conséquent une bioaccumulation moins importante.

En ce qui concerne les activités EROD, on observe une différence entre les sexes, les mâles montrant globalement des valeurs (jusqu'à 80 pmoles/min*mg de protéines) plus importantes que les femelles, celles-ci ne dépassant pas 16 pmoles/min*mg de protéines. Burgeot et al. (1998) et Kime (1999) mentionnaient eux aussi une différence entre sexe dont les principales causes seraient une influence des stéroïdes sexuels, principalement l'oestradiol, sur l'activités des monooxygénases hépatiques (Kime, 1999). Contre toutes attentes, les valeurs d'activité EROD les plus élevées, aussi bien chez les femelles que chez les mâles se situent sur la Rulle, à Habay-La-Vieille, station choisie au départ comme site de référence. Les activités atteignent, respectivement, des valeurs de 15 et 81.2 pmoles/min*mg de protéine chez les femelles et les mâles alors que les concentrations en PCBs sur ce site sont relativement faibles (7.6 ng/g poids frais), ce qui suggère l'existence d'autres inducteurs de l'activité EROD.

3) Mâles

3.1) Indicateurs morphologiques et histopathologiques

Il est reconnu que l'allocation énergétique attribuée aux gonades des poissons mâles est plus faible que chez les femelles, le poids des testicules dépassant rarement 3% du poids du corps. Globalement, les valeurs de RGS obtenues dans le cadre de ce travail, chez les goujons mâles, correspondent aux résultats publiés dans une étude de (Kestemont, 1989) qui décrit un RGS variant de 0,9 à 2,4. Dans le cas de Lamorteau, on ne peut certifier que les différences de RGS observées pour les mâles sont dues à une pollution environnementale. En effet, pour cette station, le facteur thermique joue un rôle important dans la maturation des individus. Contrairement aux autres sites, les mâles présentent des valeurs de RGS déjà significativement supérieures au début mars où la température de l'eau atteint des valeurs de 11°C. Rappelons que ce site se trouve en aval de l'usine de pâte à papier Burgo Ardenne dont les rejets provoquent une augmentation de température de 5°C par rapport au site en amont, Harnoncourt. Notons que, globalement, les RGS observés à Vaux-Sous-Chèvremont ne présentent pas de différences significatives. Néanmoins, l'interprétation des différences de RGS doit être nuancée. En effet, la manipulation des poissons sur le terrain peut provoquer le réflexe de spermiation chez les individus les plus matures et donc augmenter la variabilité des valeurs de RGS au sein d'une population. La variabilité importante du RGS à Vaux-Sous-Chèvremont au début avril illustre ce phénomène. Notons qu'aux faibles valeurs de RGS obtenues à Habay-La-Vieille au début mars sont associées des concentrations plasmatiques en E2 élevées. Ce point sera développé dans le chapitre traitant des variations plasmatiques en stéroïdes.

Bien que les analyses histologiques chez les mâles aient été réalisées de manière qualitative, cette méthode se révèle essentielle d'une part dans la détermination exacte du stade de maturité et d'autre part dans l'évaluation des effets de polluants environnementaux, plus précisément de composés oestrogéniques. L'analyse des coupes histologiques des gonades confirme les résultats du calcul du RGS. Elles révèlent une différence de maturation sexuelle des individus entre les stations. En effet, la maturation finale, caractérisée par l'apparition de spermatozoïdes, est observée dès le début du mois de mars pour les individus présents à Lamorteau, en fin mars à Harnoncourt et en fin avril pour les stations de Vaux-Sous-Chèvremont et Habay-La-Vieille. L'analyse des structures ovocytaires au sein des testicules a révélé différents degrés d'intersexualité selon les stations, généralement représentée par quelques ovocytes protoplasmiques (souvent <6) dispersés aléatoirement. L'incidence de ce phénomène varie de 5% pour les mâles à Habay-La-Vieille à environ 10% pour ceux présents dans les autres stations. Ces observations, qui, a priori, semblent importantes, sont comparables aux résultats d'une étude réalisée par (Van Aerle *et al.*, 2001). Cette étude visait à démontrer les perturbations sexuelles chez les goujons exposés à des effluents de boues d'épuration. Les auteurs ont ainsi pu montrer que l'incidence d'intersexualité chez ce téléostéen varie de 6% dans les sites de référence à 15% dans les sites les plus contaminés. Les goujons prélevés dans ces derniers sites présentaient des testicules comprenant des ovocytes primaires et secondaires dont la proportion pouvait dépasser 50%. Dans le cadre de notre mémoire, aucune différence significative n'a été observée au niveau du degré de maturation et des niveaux en stéroïdes plasmatiques entre les mâles touchés et les individus sains prélevés à la même station et à la même date d'échantillonnage. Ceci signifie que le degré d'intersexualité observé ne semble pas influencer outre mesure la maturation gonadale et la stéroïdogénèse.

3.2) Indicateurs biochimiques et endocriniens

3.2.1) La 11-Kétotestostérone

Rappelons que, chez les poissons mâles, la 11-ketotestostérone est l'hormone prédominante responsable pour les caractères sexuels secondaires, le comportement et le développement gonadal alors que la testostérone est sécrétée par les deux sexes, bien que ses fonctions soient encore peu claires. Il est peu probable que les différences de concentration en 11-KT observées entre les stations étudiées soient attribuables à un impact de polluants. La principale différence de concentration se situe au début mars, entre la station d'Habay-La-Vieille et de Lamorteau où la température de l'eau était de 11°C et 5°C, respectivement. Par ailleurs, l'analyse histologique des testicules de mâles prélevés à cette période à Lamorteau a révélé la présence de spermatozoïdes alors que les mâles prélevés à Habay-La-Vieille ne présentaient que des spermatogonies A et B. Cette différence de maturation signifie que la température présente à Lamorteau était suffisante pour stimuler l'hypothalamus et ainsi permettre, par le biais d'hormones gonadotropes, la sécrétion de 11-KT. Cette hypothèse explique la présence de concentrations en 11-KT plus élevées sur les autres stations à partir de fin mars où les températures de l'eau pour chaque station sont proches de 10°C. Cette augmentation de 11-KT s'accompagne de l'apparition de stades de maturation plus avancés : spermatozoïdes à Harnoncourt, spermatides à Vaux-Sous-Chèvremont et spermatocystes de type zygotène à Habay-La-Vieille.

3.2.2) Concentration en 17 β -oestradiol et ALP

Globalement, les concentrations en 17 β -oestradiol mesurées chez les mâles (ne dépassant pas les 2,5 ng/ml plasma) sont beaucoup plus faibles que chez les femelles (dont les valeurs peuvent atteindre 8ng/ml plasma). Néanmoins, on peut remarquer que de faibles valeurs en E2 chez les femelles peuvent induire la production de vitellogénine. En effet, à Vaux-Sous-Chèvremont, on remarque que le passage de 0.73ng/ml plasma fin novembre à 1.47ng/ml plasma fin mars est suivi d'une augmentation d'ALP de 26,98 à 95,55 μ g/ml plasma pour ces dates respectives. De telles concentrations en E2 sont présentes chez les mâles bien qu'elles n'induisent pas des valeurs d'ALP aussi importantes. Les résultats des concentrations en 17 β -oestradiol et ALP présentes chez les mâles seront traités ensemble, afin de prendre en compte les interactions entre ces substances.

Dans l'ensemble, aucune différence significative n'est apparue entre les sites au cours de nos campagnes de pêches, excepté en fin novembre où les valeurs d'ALP sont significativement supérieures pour les stations d'Harnoncourt et d'Habay-La-Vieille. Par ailleurs, à cette date, l'analyse histologique nous a montré que tous les individus mâles se trouvaient au même stade de maturité, possédant des testicules non matures, caractérisées par la seule présence de spermatogonies A et B. Cette période précédant la reproduction est particulièrement intéressante pour comparer l'effet potentiel de perturbateurs endocriniens. A ce moment, chez les cyprinidés, une faible température de l'eau et une photopériode décroissante empêche l'augmentation de GtH (hormone gonadotrope) et donc ne permet pas le déroulement de la spermatogenèse, ce qui se traduit, normalement, par de faibles teneurs en stéroïdes.

Différentes hypothèses peuvent être émises pour expliquer les valeurs importantes d'ALP à Harnoncourt et Habay-La-Vieille à la fin du mois de novembre. Les mâles prélevés sur le site d'Habay-La-Vieille présentent, en plus des valeurs élevées en ALP, des concentrations en E2 significativement supérieures aux autres stations (~2ng/ml plasma) en fin novembre et début mars. L'induction de l'ALP chez ces individus semble donc essentiellement due à cette concentration élevée en E2 endogène. A nouveau, plusieurs raisons pourraient expliquer cette concentration anormalement élevée en E2. La première serait la surexpression de l'activité aromatase, qui convertit la testostérone en 17 β -oestradiol. En effet, Scholz et Gutzeit (2001) ont récemment mis en évidence l'induction du gène de l'aromatase au niveau du testicule chez le médaka, *Oryzias latipes*, exposé à une concentration de 10ng/l d'éthynylestradiol. La seconde hypothèse correspond simplement à une concentration anormalement élevée en testostérone qui pour une activité aromatase normale aboutit à une concentration plus importante en E2. Comme l'espèce choisie n'offre malheureusement pas une quantité de sang suffisante pour le dosage de la testostérone, seule la mesure du rapport 11KT-E2 a été effectué pour cette station à cette date. Celui-ci reflète indirectement la balance existante entre l'activité aromatase et la 11- β hydroxylase qui convertit la testostérone en E2 et en 11-kétotestostérone, respectivement. Aucune différence significative n'a été observée entre les stations à ce moment, ce qui penche en la faveur de la deuxième hypothèse selon laquelle la concentration excessive en E2 proviendrait d'une concentration anormalement élevée en testostérone. Dans le cas d'Habay-La-Vieille, il est donc possible qu'une perturbation enzymatique existe lors de la biosynthèse de la testostérone. A l'inverse, les valeurs d'ALP importantes observées à Harnoncourt avant la période de reproduction, en fin novembre, ne s'accompagnent pas d'une concentration anormalement élevée en oestradiol endogène, ce qui suggère cette fois une contamination par des composés oestrogéniques.

4) Femelles

4.1) Indicateurs morphologiques et histopathologiques

Comme l'analyse en composante principale l'avait prédit, il existe une certaine corrélation entre les valeurs d'E2, d'ALP, de RGS et le diamètre des ovocytes les plus avancés. En effet, les mécanismes qui influencent les valeurs de ces paramètres sont intimement liés. Rappelons que le foie, activé par l'oestradiol, va synthétiser de la vitellogénine. Cette protéine va ensuite être incorporée dans l'ovocyte en maturation qui, par conséquent, augmentera de volume. Parallèlement à l'augmentation du diamètre des ovocytes, on observe une augmentation des valeurs de RGS. Les valeurs de ces deux derniers paramètres seront donc traitées ensembles dans ce chapitre.

Chez les poissons, l'investissement énergétique affecté aux ovaires est généralement beaucoup plus élevé que celui affecté aux testicules. Dans le cadre de cette étude, les mâles présentent un RGS maximum de 2.4, alors les femelles présentent des valeurs maximales de 12.7 pour la station de Lamorteau. Ces valeurs correspondent aux résultats observés par (Kestemont, 1987) qui mesurait des valeurs de RGS pouvant atteindre 14% du poids corporel chez les goujons femelles. Tout comme les mâles, l'évolution différente mesurée chez les femelles à Lamorteau est plus attribuable à une différence de maturation ovarienne qu'à une perturbation endocrinienne, ou autre. La température de l'eau à cette station présente en moyenne ~3°C de plus que les autres sites. Ainsi, pour cette station, les RGS des femelles voient leurs valeurs passer de 2,8 en fin novembre à 12,7 au début mars, où la température est déjà de 11°C. Ces observations confirment les résultats publiés par Kestemont (1987) qui

signalait que, contrairement aux mâles dont la spermatogenèse pouvaient se dérouler en période hivernale, les températures basses provoquent un arrêt de la maturation ovarienne chez les femelles, l'augmentation de la température provoquant une brusque augmentation de leur RGS. Néanmoins, pendant la période hivernale, en fin novembre, on observe des valeurs significativement supérieures à Harnoncourt et Vaux-Sous-Chèvremont, qui s'expliquent, en fait, par une présence, à ce moment, d'ovocytes en prévitellogenèse avancée plus importante dans ces stations. De plus, l'interprétation des différences de RGS observées entre sites doit être nuancée. Comme chez les mâles, la manipulation du poisson sur le terrain peut provoquer, en période de reproduction, la perte d'œufs, ce qui peut influencer les valeurs finales de RGS. D'autre part, en période de reproduction, des femelles présentes sur un même site peuvent avoir pondu récemment et d'autres être en période de maturation finale. Ces différences individuelles apportent généralement une variabilité importante dans le calcul du RGS moyen.

Pour comprendre la dynamique ovarienne et pouvoir interpréter les résultats obtenus, il est nécessaire de connaître le type d'ovogenèse auquel le goujon s'apparente. Kestemont (1987) décrit chez le goujon une distribution d'ovocytes de type groupe-synchrone au début de la gamétogenèse, avec prédominance d'ovocyte du type protoplasmique puis l'ovaire du goujon change progressivement pour aboutir à une distribution totalement asynchrone des ovocytes en fin de vitellogenèse. L'évolution des proportions d'ovocytes présents dans les ovaires des femelles prélevées dans chaque station explique bien les différences de RGS et de diamètres des ovocytes qui existent entre les sites. En effet, on observe la présence des stades de maturation les plus avancés, ovocytes en vitellogenèse avancée (stade 5) et même l'apparition de GVBD à différentes périodes selon la station étudiée. Parallèlement aux valeurs de RGS élevées, on observe l'apparition de maturation finale dès le début mars à Lamorteau, en fin avril à Vaux-Sous-Chèvremont et fin mai à Habay-La-Vieille alors que les femelles capturées à Harnoncourt ne présentent pas de signes de ponte récente, bien que le stade 5 soit présent fin mai.

A priori, des différences au niveau du recrutement des ovocytes semblent se présenter entre sites. Les stations de Lamorteau et d'Habay-La-Vieille présentent le même type de recrutement qui consiste en une diminution des ovocytes protoplasmiques pendant la période de reproduction, Kestemont (1987) signalait déjà ce phénomène dans son étude sur la dynamique ovarienne du goujon. Pour comprendre ce phénomène, il faut tenir compte du caractère continu que présente l'ovogenèse. En fait, cette diminution résulte d'un recrutement de ces ovocytes protoplasmiques en ovocytes plus matures. La différence thermique entre Lamorteau et Habay-La-Vieille attribue une maturation plus rapide chez les femelles à Lamorteau puisque les proportions en ovocytes protoplasmiques les plus faibles se retrouvent au début mars pour cette station et fin mai à Habay-La-Vieille, ces périodes correspondent à la période de ponte. Dans le cas de Lamorteau, à partir du début mars, le recrutement des ovocytes les plus matures (stade 5) qui permet l'apparition des pontes se fait au détriment des ovocytes pévitellogéniques (stades 2 et 3) et principalement des ovocytes en vitellogénèse précoce (stade 4). Théoriquement, pour des conditions de température et d'alimentation favorable, lorsque la photopériode diminue, ce stock d'ovocytes matures s'épuise et les femelles arrivent en période de post ponte. Ce stade ultime n'a cependant pas été observé à Lamorteau, mais on peut facilement concevoir l'apparition de la période de régression dans le mois qui a suivi la dernière campagne de pêches (à la mi-juin, par exemple). Malgré la différence de température observée entre ces deux sites, la fécondité des individus ne semble pas être altérée ; en effet, on observe des proportions en ovocytes vitellogéniques semblables entre ces stations (6.8 % à Lamorteau, au début mars et 6.2 % à Habay-La-Vieille, fin mai).

Dans le cas de Vaux-Sous-Chèvremont et d'Harnoncourt, l'interprétation des résultats est plus difficile car aucun poisson n'a été pêché au début mars pour les deux stations ainsi qu'en fin avril à Harnoncourt et fin mai à Vaux-Sous-Chèvremont. Cependant, on peut observer que, pour ces stations, le recrutement des ovocytes protoplasmiques en ovocytes prévitellogéniques est inexistant, l'apparition des stades les plus matures (en vitellogenèse précoce et avancée) provient essentiellement du stock d'ovocytes prévitellogéniques. Les proportions de ces ovocytes avant la période de reproduction sont, néanmoins, plus importantes à Vaux-Sous-Chèvremont (19.1%) et Harnoncourt (16.22%) alors qu'à Lamorteau et Habay-La-Vieille, elles sont égales à 14.3% et 11.2%, respectivement. Un stock relativement élevé à Vaux-Sous-Chèvremont permet d'obtenir en période de reproduction, fin avril, une proportion d'ovocytes matures égale à 5.1%. Pour Harnoncourt, où le stock d'ovocytes prévitellogéniques au début de la période de reproduction est plus faible, on observe des proportions plus faibles d'ovocytes en vitellogenèse (2.6%). Il faut cependant nuancer notre interprétation car si aucun signe d'ovulation n'a été observé à ce moment, il se pourrait que certaines femelles aient pondu quelques temps auparavant. Il semble donc que, pour les sites d'Harnoncourt et de Vaux-Sous-Chèvremont, des problèmes se situent au niveau du recrutement des ovocytes protoplasmiques en ovocytes prévitellogéniques. Il est peu probable que la température et la photopériode jouent un rôle à ce niveau car ces facteurs montrent des profils normaux pour ces deux stations. Dans le cas d'Harnoncourt et de Vaux-Sous-Chèvremont un stock trop faible en ovocytes prévitellogéniques pourrait aboutir à une diminution de la proportion en ovocytes matures et donc de la fécondité de ces femelles.

4.2) Indicateurs biochimiques et endocriniens

Les valeurs du RGS et les analyses histo-morphométriques ont révélé des différences de maturation entre stations essentiellement liées à des facteurs environnementaux, notamment d'ordre thermique. Il est normal que ces différences de maturation gonadale s'accompagnent de profils différents en stéroïdes sexuels. Pour éviter de comparer des variations stéroïdiennes dues à des processus physiologiques naturels se présentant à des moments différents selon le site étudié, l'interprétation des sécrétions hormonales et de la concentration en protéines vitellogénique s'effectuera en fonction des stades de maturité rencontrés chez les femelles prélevées dans les différentes stations.

Une étude de (Rinchar *et al.*, 1993) décrit précisément les changements saisonniers en stéroïdes plasmatiques chez les goujons femelles. Si les concentrations en E2 sont faibles durant la prévitellogenèse, sa concentration augmente ensuite durant l'accumulation des globules de vitellus et reste à des valeurs élevées pendant la vitellogenèse. Lors de la maturation finale, juste avant la formation de la GVBD, les niveaux d'E2 diminuent. En interponte, on observe cette fois des concentrations à nouveau très élevées. Ces téléostéens sont des pondéreux multiples et présentent un développement ovarien asynchrone et après l'ovulation, leurs ovaires contiennent encore des ovocytes à différents stades de maturation, capables de synthétiser cette hormone. Cette concentration élevée pendant la période de reproduction joue le rôle de soutien hormonal nécessaire pour le recrutement des ovocytes. Des concentrations élevées en E2 et en vitellogénine ont également été observées chez des poissons à pontes multiples comme l'ablette *Alburnus alburnus* et la brème bordelière *Blicca bjoerkna* (Rinchar *et al.*, 1997). Les profils de concentration en E2 observés dans ce travail suivent globalement l'évolution naturelle de cette hormone, décrite précédemment par ces différentes études. En effet, on remarque des faibles valeurs en prévitellogenèse, ne dépassant pas les 2 ng/ml de plasma pour l'ensemble des stations alors que les valeurs les plus

importantes se situent en interponte (entre 3 et 8 ng/ml plasma). Cependant, on peut observer des différences entre sites pour ces 2 stades ovariens. En interponte, les valeurs d'E2 retrouvées dans le plasma des femelles capturées à Harnoncourt sont significativement supérieures à celles présentes à Habay-La-Vieille. Signalons qu'à cette période, les femelles d'Harnoncourt présentent des ovaires dont les ovocytes les plus avancés se trouvent en vitellogenèse avancée (stade 5), ce type de maturation correspond à une concentration élevée en E2 plasmatique. Cette hypothèse est renforcée par un faible rapport 11-KT/E2, ce qui suggère une activité aromatasase importante. A cette même période, les valeurs d'E2 mesurées à Lamorteau présentent une variabilité importante. Cette variabilité s'explique facilement par le fait que le stade d'interponte est présent dès le mois de mars pour cette station. Un nombre plus important d'individus s'est donc retrouvé en maturation finale où les concentrations sont plus faibles et en période de vitellogenèse avancée où les concentrations sont plus élevées. En prévitellogenèse, la différence entre stations se situe à Habay-La-Vieille, pour laquelle on retrouve des concentrations plasmatique élevées en E2. Parallèlement, comme il l'a été observé chez les individus mâles, le rapport 11-KT/E2 est élevé à ce moment, ce qui suggère une concentration élevée en testostérone. Il semble donc que la perturbation affectant la stéroïdogénèse de la testostérone chez les mâles agit également chez les femelles. Signalons enfin que pour chaque stade ovarien décrit, aucune différence significative entre sites n'est apparente au niveau des concentrations en ALP.

Conclusions et perspectives

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes penché sur l'étude de l'impact des xénobiotiques sur la reproduction du goujon, plus particulièrement les effluents d'usine papetières (BKME) ainsi que les PCBs. Pour ce faire, plusieurs stations ont été choisies, suivant de type de pollution potentielle. Ainsi, la station de Lamorteau située sur le Ton, en aval de l'usine de pâte à papier Burgo-Ardenne a été comparée avec celle d'Harnoncourt, située en amont du rejet de cette industrie. Le site de Vaux-Sous-Chèvremont sur la Vesdre a été choisi d'après les concentrations élevées en PCBs retrouvées dans les muscles des chevaines en 2003. La station d'Habay-La-Vieille, sur la Rulle a été choisie comme site de référence.

Les résultats de nos analyses révèlent une perturbation de la fonction reproductive chez le goujon différente selon la station échantillonnée.

A Lamorteau, l'impact de l'industrie Burgo-Ardenne correspond essentiellement à une « pollution thermique ». En effet, les rejets de l'industrie augmentent la température de l'eau à Lamorteau de 5°C par rapport à Harnoncourt. Cette augmentation de température provoque l'apparition précoce de la période sexuelle, les premiers signes de ponte étant observés au début mars. Cependant, pour un même stade de maturation aucune altération des concentrations en stéroïdes sexuels et ALP n'a été observée chez les individus mâles et femelles. Parallèlement, aucune pathologie n'a été rencontrée au niveau des gonades pour les individus des deux sexes.

Les activités EROD sont faibles pour les individus présents à Harnoncourt. Cependant, des concentrations élevées en ALP et faibles en E2 rencontrées chez les mâles, avant la période de reproduction, suggèrent la présence de composés oestrogéniques dans cette station. Par ailleurs les femelles semblent présenter une perturbation de la dynamique ovarienne : en effet l'apparition des ovocytes au stade de la vitellogenèse avancée semble provenir essentiellement du stock d'ovocytes en prévitellogenèse, le recrutement des ovocytes protoplasmiques en ovocytes plus matures étant inexistant. Un faible stock d'ovocytes en prévitellogenèse avant la période de reproduction pourrait aboutir à une diminution de la fécondité des femelles.

L'activité EROD importante rencontrée chez les individus présents sur la Vesdre, à Vaux-Sous-Chèvremont reflète bien les concentrations en PCBs plus élevées dans les muscles des goujons prélevés sur le site. Ces concentrations sont cependant nettement moins importantes que dans les muscles des chevaines. Aucune perturbation endocrinienne et biochimiques n'ont pu être observées pour cette station bien que les femelles présentent le même type de perturbation de la dynamique ovarienne que les femelles présentes à Harnoncourt.

Les résultats les plus inattendus se retrouvent à Habay-La-Vieille, sur la Rulle où les activités EROD, présentes aussi bien chez les mâles que chez les femelles, sont les plus importantes. Parallèlement, on a pu observer des concentrations anormalement élevées en E2 et 11-KT aussi bien chez les femelles que chez les mâles, ce qui suggère la présence de testostérone anormalement élevée, probablement due à une perturbation lors de sa stéroïdogénèse. Les faibles quantités de sang prélevées n'ont malheureusement pas permis de doser la testostérone.

Un suivi temporel des concentrations en stéroïdes sexuels et ALP s'avère essentiel dans la compréhension des mécanismes physiologiques impliqués dans le processus de la reproduction. Néanmoins la fiabilité et l'exactitude de l'interprétation des résultats présentés dans le cadre de ce mémoire seraient certainement augmentées si un nombre plus important de paramètres physiologiques avaient été utilisés, notamment la concentration en testostérone et l'activité aromatasase. Il s'est avéré que la période précédant la reproduction, en fin novembre, est particulièrement intéressante pour comparer l'effet potentiel de perturbateurs

endocriniens puisqu'à ce moment les concentrations en stéroïdes sont normalement faibles pour l'ensemble des individus. La variabilité des concentrations en hormones due à des phénomènes physiologiques naturels, lié à la période de reproduction est pratiquement absente.

L'utilisation de l'histologie des gonades s'est révélé être un outils indispensable pour la compréhension et l'interprétation des résultats. Ainsi chez les femelles, l'analyse histologique des gonades permet d'attribuer un état de maturation pour chaque individu. La comparaison des concentrations en stéroïdes et ALP des femelles, pour le même stade de maturité, devient alors possible. La comparaison des femelles dont le stade ovarien correspond à la prévitellogenèse précoce est particulièrement intéressante car ce stade est normalement associé à de faibles teneurs en stéroïdes. L'analyse histologique permet également d'avoir un aperçu de l'impact direct des polluants sur la structure des gonades, l'intersexualité, l'atrésie, la dynamique ovarienne,...

Il aurait été intéressant de confronter les résultats des différents biomarqueurs utilisés pour le paramètre de la reproduction (concentration stéroïdienne, ALP, histopathologie) avec des niveaux d'organisation supérieurs. Cette méthode permettrait de mieux comprendre les mécanismes de la perturbation considérée. Ainsi, à Lamorteau, les femelles ne semblent pas présenter de perturbations de la dynamique ovarienne alors que nos observations sur le terrain suggéraient la présence plus importante de grands individus. L'analyse de type fréquence-taille de la structure de population de goujon serait un bon indicateur d'une éventuelle perturbation à ce niveau. En effet, la faible présence de jeunes individus dans cette population pourrait être due à une forte mortalité au niveau des stades précoces où les poissons sont particulièrement sensibles aux polluants.

Un biomarqueur propre au paramètre de la reproduction, complémentaire à l'évaluation des concentrations en stéroïdes, ALP et histopathologie des gonades, qui permettrait d'intégrer une pertinence écologique plus importante serait l'étude de la viabilité des gamètes. Kime et Nash (1999) précisaient déjà que si le perturbateur endocrinien pouvait agir sur l'hypothalamus, l'hypophyse, les gonades ou le foie, le résultat final aboutirait à une diminution de la quantité et/ou de la qualité des gamètes. On peut facilement imaginer prélever des géniteurs de stations potentiellement altérées et calculer la survie des œufs (Kime et Nash, 1999), le taux de fertilisation, le taux d'éclosion et à plus long terme la survie des larves. Ces valeurs pourraient être comparées à celles de poissons provenant de sites différents ou de poissons traités avec un type de polluant potentiellement présent (par ex : PCB sur la Vesdre). La méthode CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) pourrait fournir de bonnes indications sur les effets des perturbateurs endocriniens sur la mobilité et la morphologie du sperme de l'espèce étudiée. Ces mesures pourraient prédire ainsi la capacité de fertilisation du sperme de géniteurs mâles exposés.

Le choix du goujon comme espèce sentinelle doit être nuancé. Ainsi, il est largement répandu dans nos rivières et permet donc d'obtenir un jeu de données statistiquement valables. C'est une espèce tolérante que l'on retrouve encore dans les sites altérés. Typiquement benthique, elle est susceptible d'accumuler par voie alimentaire des polluants adsorbés sur les sédiments. Malgré cela, elle ne vit pas très longtemps (4 à 5 ans), ce qui ne lui permet pas d'accumuler une quantité importante de toxiques, notamment les PCBs. Sa petite taille représente des avantages et des inconvénients. En effet, si elle ne permet pas d'obtenir une quantité de matériel biologique importante, elle peut cependant représenter un atout dans le cas d'un élevage en laboratoire. En effet, l'exposition à des doses croissantes de

polluants, susceptibles d'être présents sur le terrain, et le suivi de plusieurs paramètres nous permettrait de mieux comprendre le mode d'action de ces polluants et la sensibilité des indicateurs étudiés.

Références bibliographiques

- Adams, S. M., Crumby, W. D., Greeley, M. S., Ryon, M. G. and Schilling, E. M. "Relationships between physiological and fish population responses in a contaminated stream." *Environmental Toxicology and Chemistry*. **11**: 1549-1557.(1992a).
- Adams, S. M., Crumby, W. D., Greeley, M. S., Shugart, L. R. and Saylor, C. F. "Responses of Fish Populations and Communities to Pulp Mill Effluents: A holistic Assessment." *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **24**: 347-360.(1992b).
- Adams, S. M., Greeley, M. S. and Ruyon, M. G. "Evaluating Effects of Contaminants on Fish Health at Multiple Levels of Biological Organization: Extrapolating from Lower to Higher Levels." *Human and Ecological Risk Assessment* **6**(1): 15-27.(2000).
- Afonso, L. O. B. and Wassermann, G. J. "Sex reversal in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) using a nonsteroidal aromatase inhibitor." *Journal of Experimental Zoology* **290**: 177-181.(2001).
- Akhtar, M., Lee-Robichaud, P., Akhtar, M. E. and Wright, J. N. "The Impact of Aromatase Mechanism on Other P450s." *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* **61**(3-6): 127-132.(1997).
- Amiard, J. C., Craquet, T. and Lagadic, L. Les biomarqueurs parmi les méthodes d'évaluation de la qualité de l'environnement.in Lagadic, L., Craquet, T., Amiard, J. C. and Ramade, F. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier*, Paris. 307p.(1998).
- Arukwe, A. "Cellular and Molecular Responses to endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction." *Marine Pollution Bulletin* **42**(8): 643-655.(2001).
- Arukwe, A. and Goksoyr, A. "Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation:oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption." *Comparative Hepatology* **2**(4): 1-21.(2003).
- Arukwe, A., Knudsen, F. R. and Goksoyr, A. "Fish Zona Radiata (Eggshell) protein: A Sensitive Biomarker for Environmental Estrogens." *Environmental Health Perspectives* **105**(4): 418-422.(1997).
- Arukwe, A., Kullman, S. W. and Hinton, D. E. "Differential biomarker gene and protein expressions in nonylphenol and estradiol-17 β treated juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **129**: 1-10.(2001).
- Atrill, M. J. and Depledge, M. H. "Community and population indicators of ecosystem health : targeting links between levels of biological organisation ." *Aquatic toxicology* **38**: 183-197.(1997).
- Bayley, M., Junge, M. and Baatrup, E. "Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and reduced sperm count in adult males." *Aquatic toxicology* **56**: 227-239.(2002).
- Bierbenstein, U., Berbner, T., Islinger, M. and Braunbeck, T. "Immunohistochemical localization of vitellogenin in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using immunofluorescence." *The science of the Total Environment* **233**: 67-75.(1999).

- Burgeot, T. and Galgani, F. Application de l'EROD chez les poissons marins dans un programme pluridisciplinaire de surveillance de la mer du Nord.in Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J. C. and Ramade, F. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier*, Paris. p33-55.(1998).
- Celander, M. Impact of stress on animal toxicology.in Balm.P.H.M. Stress Physiology in Animals *Sheffield Academic Press*, England. 284p.(1999).
- Celius, T., Mathews, J. B., Giesy, J. P. and Zacharewski, T. "Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real-time PCR after in vivo treatment with estradiol-17 β or α -zearalenol." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **75**: 109-119.(2000).
- Celius, T. and Walther, T. B. "Oogenesis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) occurs by zonagenesis preceding vitellogenesis in vivo and in vitro." *Journal of Endocrinology* **158**: 259-266.(1998).
- Crain, D. A. and Guillette, L. J. "Endocrine-Disrupting contaminants and reproduction in vertebrate wildlife." *Reviews in Toxicology* **1**: 47-70.(1997).
- Craquet, T. and Lagadic, L. Conséquences d'atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structuration des communautés et des écosystèmes.in Lagadic, L., Craquet, T., Amiard, J. C. and Ramade, F. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier*, Paris. 307p.(1998).
- Damstra, T., Barlow, S., Gergman, A., Kavlock, R. and Van der Kraak, G. "Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors." *World Health Organization*.(2002).
- Descy, J. P. and Darchambeau, F. "Evaluation de la qualité biologique de l'eau: des microalgues aux poissons." *Ann Med Milit Belg* **13**: 151-158.(1999).
- Devlin, H. R. and Nagahama, Y. "Sex determination and sex differentiation in fish;: an overview of genetic , physiological, and environmental influences." *Aquaculture* **208**: 191-364.(2002).
- Donohoe, R. M. and Curtis, R. L. "Estrogenic activity of chlordane, o,p'-DDT and o,p'-DDE in juvenil rainbow trout : induction of vitellogenesis and interaction with hepatic estrogen binding sites." *Aquatic toxicology* **36**: 31-52.(1996).
- Eggens, M. L., Opperhuizen, A. and Boon, J. P. "Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea." *Chemosphere* **33**(8): 1579-1596.(1996).
- Folmar, L. C., Gardner, G. R., Schreiber, M. P., Magliulo-Cepriano, L., Mills, L. J., Zarooigan, G. E., Gutjarh-Gobell, R. E., Haebler, R., Horowitz, D. J. B. and Denslow, S. P. "Vitellogenin-induced pathology in male summer flounder(*Paralichthys dentatus*)." **51**: 431-441.(2001).
- Gelinas, D., Pitoc, G. A. and Callard, G. V. "Isolation of a goldfish brain cytochrome P450 aromatase cDNA: mRNA expression during the seasonal cycle and after steroid treatment ." *Molecular and Cellular Endocrinology* **138**: 81-93.(1998).
- Gercken, J. and Sordyl, H. "Intersex in feral marine and freshwater fish from northeastern Germany." *Marine Environmental Research* **54**: 651-655.(2002).

- Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen G.M., A. and Bowmer, T. "Feminisation of young male of common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-ter-pentylphenol during sexual differentiation." *Aquatic toxicology* **43**: 77-92.(1998a).
- Gimeno, S., Komen, H., Jobling, S., Sumpter, J. and Bowmer, T. "Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis." *Aquatic toxicology* **43**: 93-109.(1998b).
- Goodbred, S. L., Gilliom, R. J., Gross, T. S., Denslow, S. P., Bryant, L. W. and Schoeb, T. R. "Reconnaissance of 17 β -Estradiol, 11-ketotestosterone, vitellogenin, and Gonad Histopathology in Common Carp of United States Streams: Potential for Contaminant-Induced Endocrine Disruption." *Geological Survey* **47**: 96-627.(1997).
- Halm, S., Pounds, N., Maddix, S., Rand-Weaver, M., Supter, S. P., Hutchinson, T. H. and Tyler, C. R. "Exposure to exogenous 17 β -oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*)." *Aquatic toxicology* **60**: 285-299.(2002).
- Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Igushi, T. and Fujita, K. "Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay." *Marine Environmental Research* **49**: 37-53.(2000).
- Hiramatsu, N., Ichikawa, N., Fukada, H., JFujita, T., Sullivan, C. V. and Hara, A. "Identification and Characterisation of Proteases Involved in Specific Proteolysis of Vitellogenin and Yolk Proteins in Salmonids." *Journal of Experimental Zoology* **292**: 11-25.(2002).
- Hugla, J. L. and Thome, J. P. "Effects of Ploychlorinated Biphenyls on Liver Ultrastructure, Hepatic Monooxygenases, and Reproductive Success in the Barbel." *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **42**: 265-273.(1999).
- Indarto, D. and Izawa, M. "Steroid Hormones and Endocrine Disruptors: Recent Advances in Receptor-Mediated Actions." *Yonago Acta Medica* **44**: 1-6.(2001).
- Janssen, P. A. H., Lambert, J. G. D. and Goos, H. J. T. "The annual ovarian cycle and the influence of pollution on vitellogenesis in the flounder, *Pleuronectes flesus*." *Journal of fish Biology* **47**: 509-523.(1995).
- Kestemont, P. "Etude du cycle reproducteur du gougon, *Gobio gobio* L. 1. Variation saisonnières dans l'histologie de l'ovaire." *Sonderdruck aus Journal of Applied Ichthyology* **3**: 145-157.(1987).
- Kestemont, P. "Etude du cycle reproducteur du gougon, *Gobio gobio* L. 2. Variation saisonnière dans l'histologie des testicules." *J.Appl.Ichtyol.* **5**: 111-121.(1989).
- Khan, I. A., Mathews, S., Okuzawa, K., Kagawa, H. and Thomas, P. "Alteration in the GNRH-LH system in relation to gonadal stage and Aroclor 1254 exposure in Atlantic croaker." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **129**: 251-259.(2001).
- Khan, I. A. and Thomas, P. "Disruption of Neuroendocrine Control of Luteinizing Hormone Secretion by Aroclor 1254 Involves Inhibition of Hypothalamic Tryptophan Hydroxylase Activity." *Biology of Reproduction* **64**: 955-964.(2001).
- Kime, D. E. Endocrine disruption in fish. Kluwer Academic Publishers, 396p (1998)
- Kime, D. E. and Nash, J. P. "Gamete viability as an indicator of reproductive endocrine disruption in fish." *The science of the Total Environment* **233**: 123-129.(1999).

- Kime, D. E., Nash, J. P. and Scott, A. P. "Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics." *Aquaculture* **177**: 345-352.(1999).
- Knappen, D., Bervoets, L., Verheten, E. and Blust, R. "Resistance to water pollution in natural gudgeon (*Gobiogobio*) populations may be due to genetic adaptation." *Aquatic toxicology*: article in press.(2004).
- Kovacs, T. G., Martel, P. H. and Voss, R. H. "Assessing the biological status of fish in a river receiving pulp and paper mill effluents." *Environmental Pollution* **118**: 123-140.(2002).
- Lagadic, L., Amiard, J. C. and Craquet, T. Biomarqueurs et évaluation de l'impact écologique des polluants.in Lagadic, L., Craquet, T., Amiard, J. C. and Ramade, F. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier*, Paris. p299-305.(1998).
- Lam, P. K. S. and Gray, J. S. "The use of biomarkers in environmental monitoring programmes." *Marine Pollution Bulletin* **46**: 182-186.(2003).
- Larsson, D. G. J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A. H., Olsson, P. E. and Forlin, L. "Ethinylestradiol- an undesired fish contraceptive?" *Aquatic toxicology* **45**: 91-97.(1999).
- Lee, C., Na, J. G., Lee, K. and Park, K. "Choriogenin mRNA induction in male medaka, *Oryzias latipes* as a biomarker of endocrine disruption." *Aquatic toxicology* **61**: 233-241.(2002).
- Loomis, A. K. and Thomas, P. "Binding Characteristics of Estrogen Receptor (ER) in Atlantic Croaker (*Micropogonias Undulatus*) testis: Different affinity for Estrogens and Xenobiotics from Hepatic ER." *Biology of Reproduction* **61**: 51-60.(1999).
- McLachlan, J. A. "Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals." *Endocrine Reviews* **22**(3): 319-341.(2001).
- McMaster, M. E., Van der Kraak, G. and Munkittrick, K. R. "Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles." *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **112**(2): 169-178.(1995).
- Mills, L. J., Gutjarh-Gobell, R. E., Haerbler, R. A., Horowitz, D. J. B., Jarayaman, S., Pruell, R. J., McKinney, R. A., Gardner, G. R. and Zaroogian, G. E. "Effects of estrogenic (o,p'-DDT; octylphenol) and anti-androgenic (p,p'-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*)." *Aquatic toxicology* **52**: 157-176.(2001).
- Monosson, E. "Reproductive and developmental effects of PCBs in fish:a synthesis of laboratory and field studies." *Reviews in Toxicology* **3**: 25-75.(1999/2000).
- Monteiro, P. R. R., Reis-Henriques, M. A. and Coimbra, J. "Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus*)." *Aquatic toxicology* **48**: 549-559.(2000).
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X. and Nagahama, Y. "Gonadal Sex Differentiation in Teleost Fish." *The Journal of Experimental Zoology*. **281**: 362-372.(1998).
- Navas, J. M. and Segner, H. "Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the aryl hydrocarbon receptor." *Aquatic toxicology* **51**: 79-92.(2000).

- Noaksson, E., Linderhoth, M., Bosveld, T. C. A., Norrgren, L., Zeburhr, Y. and Balk, L. "Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump." *The science of the Total Environment* **305**: 87-103.(2003).
- Pelissero, C., Lenczowski, M. J. P., Chinzi, D., Davail-Cuisset, B., Sumpter, J. P. and Fostier, A. "Effects of Flavonoids on aromatase activity, an in vitro study." *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* **57**(3-4): 215-223.(1996).
- Piferrer, F. "Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish." *Aquaculture* **197**: 229-281.(2001).
- Rinchar, J., Kestemont, P. and Heine, R. "Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. II. Sex steroid and plasma protein phosphorus concentrations." *Journal of fish Biology* **50**: 169-180.(1997).
- Rinchar, J., Kestemont, P., Kuhn, E. R. and Fostier, A. "Seasonal Changes in Plasma Levels of Steroid Hormones in an Asynchronous Fish the Gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae)." *General and Comparative Endocrinology* **92**: 168-178.(1993).
- Rinchar, J., Poncin, P. and Kestemont, P. "Croissance ovocytaire et regulation stéroïdienne chez les poissons à ponte unique et multiples: une revue." *Annls limnol.* **34**(2): 211-225.(1998).
- Satoh, K., Nagai, F. and Aoki, N. "Several Environmental Pollutants Have Binding Affinities for Both Androgen Receptor and Estrogen Receptor-a." *Journal of Health Science* **47**(5): 495-501.(2001).
- Scholz, S. and Gutzeit, H. O. "Lasting Effects of Xeno-and Phytoestrogens on Sex Differentiation and Reproduction of Fish." *Environmental Science* **8**(1): 57-73.(2001).
- Scholz, S., Kordes, C., Hammann, J. and Gutzeit, H. O. "Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparaison of gene expression and protein levels." *Marine Environmental Research* **57**: 235-244.(2004).
- Schultz, I. R., Skillman, A. D., Blanton, M. L. and Nagler, J. J. "Fish screening assays for endocrine disruption." *Detail review paper for United States Environmental Protection Agency. Batelle, Ohio. n° 68-w-01-023. 3-5, task 12.* (2003).
- Schwainger, J. "Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors." *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **8**: 231-240.(2001).
- Simpson, M. G., Parry, M., Kleinkauf, A., Swarbreck, D., Walker, P. and Leah, R. T. "Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from aUK estuary impacted by endocrine disrupting chemicals." *Marine Environmental Research* **50**: 283-287.(2000).
- Solé, M., Porte, C. and Barcelo, D. "Vitellogenin Induction and other Biochemical Response in Carp, *Cyprinus Carpio*, After Experimental Injection with 17 a-Ethynylestradiol." *Arch.Environ.Contam.Toxicol.* **38**: 494-500.(2000).
- Tchoudakov, A., Kishida, M., Wood, E. and Callard, G. V. "Promoter characteristics of two cyp19 genes differentially expressed in the brain and ovary of teleost fish." *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* **78**: 427-439.(2001).
- Thome, J. P., Bertand, A., Brose, F., Carabin, O., De Pauw, E., Dykmans, C., Eppe, G., Gaspar, P., Leroy, A., Louvet, M., Maghuin-Rogister, G., Marneffe, Y., Massart, A.

- C., Phillipart, J. C. and Rimbaut, G. Evaluation du niveau de contamination des rivières par les PCBs et les "dioxines". LEAE, (2003).
- Todorov, J. R., Elskus, A. A., Schlenk, D., Ferguson, P. L., Brownawell, B. J. and McElroy, A. E. "Estrogenic responses of larval sunshine bass (*Morone saxatilis* x *M. Chrysops*) exposed to New York city sewage effluent." *Marine Environmental Research* **54**: 691-695.(2002).
- Tollefesen, K. E. "Interaction of Estrogen mimics, singly and in combination , with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquatic toxicology* **56**: 215-225.(2002).
- Trant, J. M., Lerhter, J., Gregory, T., Nunez, S. and Wunder, J. "Expression of Cytochrome P450 Aromatase in the Channel Catfish, *Ictalurus punctatus*." *J.Steroid Biochem.Molec.Biol.* **61**(3-6): 393-397.(1997).
- Triebskorn, R., Böhmer, J., Braunbeck, T., Honnen, W., Köhler, H. R., Lehmann, R., Oberemm, A., Schwainger, J., Segner, H., Schüürmann, G. and Traunspurger, W. "The project VALIMAR (VALIdation of bioMARKers for the assessment of small stream pollution) : objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment." *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* **8**: 161-178.(2001).
- Tyler, C. R., Nagler, J. J., Pottinger, T. G. and Turner, M. A. "Effects of unilateral ovariectomy on recruitment and growth of follicles in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." *Fish Physiology and biochemistry* **13**(4): 309-316.(1994).
- Van Aerle, R., Nolan, M., Jobling, S., Christiansen, L. B., Sumpter, J. and Tyler, C. R. "Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters." *Environmental Toxicology and Chemistry.* **20**(12): 1841-1847.(2001).
- Van der Oost, R., Beyer, J. and Vermeulen, N. P. E. "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment : a review." *Environmental Toxicology and Pharmacology* **13**: 57-149.(2003).
- Van der Oost, R., Lopes, S. C. C., Komen, H., Satumalay, K., Van den Bos, R., Heida, H. and Vermeulen, N. P. E. "Assessment of Environmental Quality Inland Water Pollution Using Biomarker Responses in Caged Carp (*Cyprinus carpio*) : Use of a Bioactivation :: Detoxification Ratio as a Biotransformation Index (BTI)." *Marine Environmental Research* **46**(1-5): 315-319.(1998).
- Vasseur, P. and Cossu-Leguille "Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety." *Environment International* **28**: 711-717.(2003).
- Vos, G. J., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J. V., Brandt, I. and Vethaak, A. D. "Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Spaecial Reference to the European Situation." *Critical Reviews in Toxicology* **30**(1): 71-133.(2000).
- Weibel, E. R. Stereological methods, vol I. Academic Press,London. 415p. (1979)